

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

Einfluss der Organtemperatur auf den mikrovaskulären Ischämie- Reperfusionsschaden der Leber

Dissertation

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

vorgelegt von
Benjamin Luchting
aus Frankfurt am Main

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Krombach

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. L. Gerbes

Mitbetreuung durch den promovierten

Mitarbeiter: PD. Dr. P. Biberthaler

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2007

Meiner Mutter

1	<i>EINLEITUNG</i>	6
	1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber	6
	1.1.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	7
	1.1.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	8
	1.1.3 Kapilläres Perfusionsversagen	9
	1.1.4 Apoptoseinduktion	10
	1.1.5 Einfluss der Organtemperatur	11
2	<i>ZIELSETZUNG</i>	12
3	<i>MATERIAL UND METHODEN</i>	13
	3.1 Vorbemerkungen	13
	3.2 Modell	13
	3.2.1 Versuchstiere	13
	3.2.2 Narkose	14
	3.2.3 Mikrochirurgische Technik	14
	3.2.3.1 Arterielle Blutdruckmessung	14
	3.2.3.2 Reversible Leberischämie	15
	3.2.3.3 Organtemperatur während der Ischämie	15
	3.2.3.4 Reperfusion	16
	3.2.4 Intravitalmikroskopie	16
	3.2.4.1 Technisches Setup	16
	3.2.4.2 Mikrozirkulatorische Parameter	17
	3.2.4.2.1 Sinusoidale Perfusion	18
	3.2.4.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	18
	3.2.5 Leberenzyme	19
	3.2.6 Evaluierung der Apoptose	19
	3.2.6.1 TUNEL-Färbung	19
	3.2.6.2 Caspase-3-Aktivität	20
	3.2.7 Elektronenmikroskopie	20
	3.3 Versuchsprotokolle	22
	3.3.1 Protokoll „Modelletablierung“	22
	3.3.1.1 Versuchsgruppen	22
	3.3.1.2 Versuchsablauf	22
	3.3.2 Protokoll „moderate Ischämietemperaturen“	23
	3.3.2.1 Versuchsgruppen	23
	3.3.2.2 Versuchsablauf	23
4	<i>STATISTIK</i>	24
5	<i>ERGEBNISSE</i>	24
	5.1 Modelletablierung	24
	5.1.1 Makrohämodynamik	24
	5.1.2 Temperatur von Leberlappen und Mediastinum	25
	5.1.3 Mikrozirkulation	26
	5.1.3.1 Intravitalmikroskopie	26
	5.1.3.2 Sinusoidale Perfusionsrate	27
	5.1.3.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	28
	5.1.4 Leberenzyme	29

5.2	Analyse moderater Ischämietemperaturen	30
5.2.1	Makrohämodynamik	30
5.2.2	Temperatur von Leberlappen und Mediastinum	30
5.2.3	Mikrozirkulation	31
5.2.3.1	Sinusoidale Perfusionsrate	31
5.2.3.2	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	32
5.2.3.2.1	Rollende Leukozyten	32
5.2.3.2.2	Permanent adherente Leukozyten	33
5.2.4	Leberenzyme	34
5.2.5	Evaluierung der Apoptose	35
5.2.5.1	TUNEL-Färbung	35
5.2.5.2	Anzahl TUNEL-positiver Zellen	37
5.2.5.3	Caspase-3-Bestimmung	38
5.2.6	Histologie	39
5.2.7	Elektronenmikroskopie	41
6	<i>DISKUSSION</i>	42
6.1	Material und Methoden	42
6.1.1	Modell	42
6.1.1.1	Chirurgische Präparation	43
6.1.1.2	Einstellen der Organtemperatur	43
6.1.1.3	Intravitalmikroskopie	44
6.1.1.4	Leberenzyme	44
6.1.1.5	Apoptose	45
6.2	Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber	46
6.3	Diskussion der Ergebnisse	47
6.3.1	Etablierung eines Tiermodells	47
6.3.2	Analyse moderater Ischämietemperaturen	49
7	<i>SCHLUSSFOLGERUNG</i>	53
8	<i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	54
9	<i>REFERENZEN</i>	56
10	<i>DANKSAGUNG</i>	67
11	<i>LEBENS LAUF</i>	69
12	<i>PUBLIKATIONS LISTE</i>	70

1 Einleitung

1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber

Der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) der Leber hat seine besondere klinische Bedeutung bei Transplantationen, Leberresektionen und hämorrhagischem Schock. Eine vollständige Ischämie und damit ein zeitlich begrenzter Verlust der nutritiven Versorgung sind bei Transplantationen unvermeidbar. Auch in der Tumorchirurgie wird beispielsweise bei Leber-Teilresektionen durch Abklemmen des Ligamentum hepatoduodenale, dem sogenannten Pringle-Manöver, die Blutzufuhr zur Leber reversibel und vollständig unterbrochen. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass dem hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden eine entscheidende Bedeutung für die Induktion und Ausprägung postoperativer Organinsuffizienz bzw. Transplantatdysfunktion zukommt. Je nach Dauer der Ischämie und der Temperatur des ischämischen Organs kommt es bei anschließender Reperfusion zur Ausbildung des Reperfusionsschadens. Das primäre Target des Ischämie-Reperfusionsschadens stellt die Mikrozirkulation dar ⁴³. Der mikrovaskuläre Schaden ist charakterisiert durch sinusoidales Perfusionsdefizit, gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie Verlust der endothelialen Integrität und Ödembildung, welche in Kombination zur Organdysfunktion führen ^{36;46}. Aktuelle Untersuchungen geben auch Hinweise darauf, dass der programmierte Zelltod, die so genannte Apoptose, einen wichtigen Teil des Schädigungsmusters nach Ischämie und Reperfusion darstellt ^{12;53;57;59;68}. Sowohl für das Perfusionsversagen und die gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, als auch für die Induktion des

programmierten Zelltods wird die initiale Entstehung und Wirkung freier Sauerstoffradikale nach Ischämie und Reperfusion verantwortlich gemacht ^{15;17}.

1.1.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Als initialer Mechanismus für die Induktion des Reperfusionsschadens wurde die Bildung von freien Sauerstoffradikalen durch die endotheliale Xanthinoxidase identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass sich in der Leber eine besonders hohe Konzentration an Xanthinoxidase befindet ²⁵. In diesem Kontext wurde sowohl nach warmer als auch nach kalter Ischämie eine Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies beschrieben ³¹. Durch die Unterbrechung der nutritiven Versorgung kommt es zu einem Mangel an Sauerstoff und einem anschließenden Verbrauch energiereicher Phosphate von ATP über Inosin zu Xanthin. Unter physiologischen Bedingungen würde das Xanthin mittels der Xanthindehydrogenase zu Hypoxanthin und anschließend zu Harnsäure abgebaut werden. Während der Ischämie kommt es aber vermutlich zu einer Umwandlung der Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase ²⁰. Beide Enzyme katalysieren während der Reperfusion den Abbau zu Harnsäure, allerdings nutzt die Xanthinoxidase O₂ statt NAD⁺ als Elektronenakzeptor und führt deswegen zur Entstehung von Superoxidanionen. Mittels enzymatischer Katalyse durch die Superoxiddismutase werden die biochemisch relativ trägen Superoxidradikale in der so genannten Haber-Weiß-Reaktion zu Wasserstoffperoxid reduziert ²¹. Unter Katalyse von freiem Eisen, der so genannten Fenton-Reaktion, bilden sich aus dem akkumulierten Wasserstoffperoxid hochreaktive Hydroxyl-Radikale ⁷⁸. Diese Radikale können einerseits durch Lipidperoxidation zu einer direkten Schädigung der Phospholipidmembranen mit Folge einer endothelialen Permeabilitätsstörung (“capillary leak”) führen, andererseits direkt eine inflammatorische Reaktion

triggern. Aktivierte Leukozyten sind ebenfalls in der Lage reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren, indem sie über ein NADPH-Oxidasesystem molekularen Sauerstoff zu Superoxidanionen reduzieren und durch die Sezernierung von Myeloperoxidase die Bildung von hypochloriger Säure aus Wasserstoffperoxid und Chlorid katalysieren ^{5;62}. Neben den neutrophilen Granulozyten spielen besonders auch ortständige Zellen wie beispielsweise die Kupfferzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies ^{18;71;77}.

1.1.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Der Bildung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies wird eine zentrale Bedeutung für die postischämische Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zugeschrieben. Durch intrazelluläre Sensoren aktiviert vermitteln hypoxie- oder redoxsensitive Transkriptionsfaktoren innerhalb der Leberendothelzellen die Expression von Effektorgenen. In den vergangenen Jahren wurde die durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B vermittelte Signaltransduktionskaskade weiter aufgeklärt ^{40;44}. Unter physiologischen Bedingungen bildet NF- κ B Heteropolymere mit einer Klasse inhibitorischer Proteine, den I κ Bs. Im Rahmen der Zellaktivierung kommt es zur Phosphorylierung und zur anschließenden Dissoziation und Degradation des I κ B. Nach Abspaltung des I κ B kann NF- κ B in den Zellkern übertreten und daraufhin die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) und proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) induzieren ^{8;44}. Zusätzlich führt die Stimulation durch reaktive Sauerstoffspezies zu einer Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin (CD62P). Gespeichert in Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen und α -Granula von Thrombozyten wird P-Selektin innerhalb weniger Minuten nach

Stimulation mobilisiert, auf der äußeren Plasmamembran exprimiert ²⁴ und stellt daraufhin ein bedeutsames Adhäsionsmolekül für die initiale Interaktion von Leukozyten mit dem postischämischen Endothel dar. Zwei verschiedene charakteristische Formen der Interaktion nach Reperfusion werden beschrieben ¹. Einerseits gibt es eine lockere Verbindung zwischen Leukozyten und Endothelzelle, das sogenannte *Tethering* und das darauf folgende *Rolling* als primäre Form der Interaktion. Diese Form der Interaktion wird hauptsächlich über Selektine (P-Selektin, E-Selektin, L-Selektin) mediiert ⁵². Die andere Art der Interaktion ist die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel, das so genannte *Sticking*. Diese permanente Adhärenz wird hauptsächlich durch Integrine (CD11/CD18) und die zur Familie der Immunoglobine gehörenden Adhäsionsrezeptoren (ICAM-1, VCAM-1) mediiert ³⁴. Die gesteigerte Adhäsion von Leukozyten, insbesondere im Bereich postsinusoidaler Venolen, scheint daraufhin unmittelbar zu dem Gewebeschaden nach Ischämie und Reperfusion beizutragen ²⁷. Darüber hinaus sind die Leukozyten in der Lage, die physiologische endotheliale Barrierefunktion durch die Ausschüttung zytotoxischer Degranulationsprodukte zu zerstören.

1.1.3 Kapilläres Perfusionsversagen

Die Pathomechanismen, welche zu einem kapillaren Perfusionsversagen führen, sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Als ursächlich wird eine Endothelzell dysfunktion diskutiert ^{37;43}. Hauptsächlich durch die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies kommt es zu einer Beeinträchtigung der Endothelzellintegrität ^{5;15}. Eine daraus resultierende gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität bewirkt eine verstärkte Extravasation von Plasma im Kapillarbett. Es wird vermutet, dass die daraufhin folgende Veränderung der rheologischen

Eigenschaften durch Anstieg des lokalen mikrovaskulären Hämatokrits und der Blutviskosität eine Zunahme des Strömungswiderstandes bewirkt und damit zu einer Reduktion der Fließgeschwindigkeit führt ⁴⁷. Die gleichzeitig ablaufende Entstehung eines interstitiellen Ödems bewirkt eine Erhöhung des interstitiellen Drucks, kann dadurch zu einer zusätzlichen Beeinträchtigung der kapillaren Reperfusion führen und im Sinne eines Circulus vitiosus den Reperfusionsschaden weiter verstärken ⁴⁵. Ob die gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Reperfusion im Sinne eines “capillary plugging” eine Rolle bei dem kapillaren Perfusionsversagen spielt, wird schon lange Zeit diskutiert, scheint aber eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

1.1.4 Apoptoseinduktion

Zu dem schon seit vielen Jahren untersuchten Phänomen des Ischämie-Reperfusionsschadens haben jüngere Veröffentlichungen gezeigt, dass auch die Apoptose eine Rolle bei dem Zelltod nach Ischämie und Reperfusion zu spielen scheint ^{12;23}. Apoptose beschreibt den Vorgang des programmierten Zelltodes und ist beteiligt an einem weiten Spektrum von biologischen und pathophysiologischen Prozessen. Physiologischerweise spielt sie eine entscheidende Rolle bei der embryonalen Entwicklung und der kontinuierlichen Zellerneuerung von adulten Geweben und Organen durch die Erhaltung eines Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelluntergang ^{14;38}. Neben dieser physiologischen Apoptose können aber auch zahlreiche Schädigungsmechanismen einen programmierten Zelltod hervorrufen. Hierzu zählen oxidativer Stress, radioaktive Strahlung, physikalischer Schaden, mitochondriale Dysfunktion oder Ligand-Rezeptor-Interaktionen nach Ischämie-Reperfusion ^{14;17;19;38;59}. Auch die Rolle von Thrombozyten für eine

Apoptoseinduktion ist Gegenstand vieler aktueller Untersuchungen^{12;64}. Der am besten charakterisierte Rezeptor mit seinem anschließenden Signaltransduktions-Pathway ist CD95L (APO-1/FasL)⁴⁹. CD95-induzierte Apoptose wird durch eine intrazelluläre Enzymkaskade von "cysteinyll aspartate-spezifische proteinases", den Caspasen, mediiert^{16;48}. In diesem Zusammenhang scheint der Caspase-3 eine zentrale Rolle für die Ausbildung der Effekte zuzukommen. Es konnte aufgezeigt werden, dass Caspase-3 direkt eine apoptosespezifische Endonuklease aktivieren kann⁷². Sie führt letztendlich zu einer systematischen Degradation von Reperaturenzymen, Strukturproteinen und der DNA. Am Ende dieser noch nicht vollständig aufgeklärten Vorgänge präsentiert sich eine apoptotische Zelle hauptsächlich durch morphologische Veränderungen mit Kernschrumpfung mit DNA-Fragmentierung, durch Phospholipidveränderungen in der Zellmembran und durch Zellschrumpfung¹⁴.

1.1.5 Einfluss der Organtemperatur

Eine hypotherme Konservierung von Organen bei Transplantationen oder ein gezieltes topisches Abkühlen von Organen während Ischämie ist eine in der klinischen Routine angewandte Methode zum Schutz der Organe vor ausgeprägten Ischämie-Reperfusionsschäden^{4;11;31;70}. Den theoretischen Hintergrund dafür bietet unter anderem die van Hoff'sche Gleichung, welche eine Abnahme der Enzymaktivität um das 1,6-4 fache bereits durch eine Reduzierung der Temperatur um 10°C beschreibt. Das führte dazu, dass Transplantate bei möglichst niedrigen Temperaturen gelagert werden^{26;79}. Um Kristallisationsphänomene, welche schon bei Temperaturen etwas über dem Gefrierpunkt auftreten können, zu vermeiden, wurde eine Temperatur von 4°C gewählt. Dieses Verfahren ermöglicht eine Organkonservierung beispielsweise

bei Nieren von bis zu 24 Stunden, ohne größere Schäden in Kauf nehmen zu müssen. In der zu Beginn meiner Arbeit aktuellen Literatur im Jahre 1998 haben zahlreiche Arbeitsgruppen diesen positiven Effekt einer ausgeprägten Hypothermie bestätigen können ^{3;9;11;22;35}. Darüber hinaus ist aber auch der protektive Effekt einer milden Hypothermie an verschiedenen Organen beschrieben worden ^{29;70;76;80}. Dem gegenüber ergaben sich allerdings auch Hinweise darauf, dass durch eine Hypothermie ein zusätzlicher Schaden zu dem schon bestehenden Ischämie-Reperfusionsschaden induziert werden kann. Dabei haben Rauen et al eine kälteinduzierte Apoptose von Hepatozyten und Leberendothelzellen durch eine Kühlung auf 4°C beobachtet ⁵⁶. Bei Fibroblasten wurde eine kälteinduzierte Apoptose nach einem Kälteschock durch den Kontakt mit Eiswasser beschrieben ⁶⁵ und bereits die milde Kühlung auf nur 10°C bewirkte eine Apoptoseinduktion in Keimzellen ⁶. Darüber hinaus haben Selzner und Mitarbeiter eine Beeinträchtigung der Leberregeneration nach Hypothermie beschrieben ⁶³. Jüngste Arbeiten wiederum zeigen eine Reduktion des oxidativen Stresses nach hypothermer Ischämie ⁶⁶. Letztendlich existierte aber bislang keine systematische Untersuchung zur Klärung der Fragestellung, welchen Einfluss verschiedene Organtemperaturen während der Ischämie auf das Ausmaß des mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionsschadens ausüben.

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war, die dynamischen Veränderungen der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation nach unterschiedlichen Ischämietemperaturen in einem Tiermodell systematisch zu analysieren.

3 Material und Methoden

3.1 Vorbemerkungen

Die im Folgenden vorgestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden in der Zeit von Januar 1999 bis Oktober 2000 nach Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 211-2531-66/98) am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.2 Modell

Ziel des ersten Abschnitts der Arbeit war, ein neues Tiermodell zur systematischen Untersuchung der Frage zu entwickeln, welchen Einfluss die Organtemperatur während der Ischämiephase auf das Ausmaß des mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionsschadens der Leber ausübt. Das Tiermodell sollte eine reversible Ischämie des linken Leberlappens mit anschließender *in situ* Reperfusion erlauben, wobei die Organtemperatur während der Ischämie unter Konstanthaltung der Körpertemperatur und Makrohämodynamik genau eingestellt wird. Zur dynamischen *in vivo* Analyse der Mikrozirkulation bedurfte es der Möglichkeit einer intravitalmikroskopischen Darstellung und letztendlich sollte durch Gewinnung von Blut- und Gewebeproben die Bestimmung weiterer Parameter des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens möglich sein.

3.2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere verwendeten wir weibliche, 6-8 Wochen alte C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sultzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 20-25g. Die Tiere wurden bei kontrolliertem Tag/Nachtzyklus in Gruppen von drei bis

fünf Tieren in Makrolon-Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und einem Standardfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland).

3.2.2 Narkose

Unter Spontanatmung wurden die Tiere in Inhalationsnarkose mit einem Gemisch aus Isofluran (Forene®, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und N₂O bei einer inspiratorischen Sauerstofffraktion von 0,35 operiert. Nach Narkoseeinleitung durch Inhalation von 5 Vol.% Isofluran wurde die Allgemeinanästhesie während des gesamten Versuchsablaufs mit 1,0-2,0 Vol.% Isofluran aufrechterhalten.

3.2.3 Mikrochirurgische Technik

3.2.3.1 Arterielle Blutdruckmessung

Zur kontinuierlichen Messung der Makrohämodynamik und zur Applikation von Fluoreszenzmarkern wurden bei allen Versuchstieren unter Verwendung eines Operationsmikroskopes (Leitz, Wetzlar, Deutschland) jeweils die linke Arteria carotis und die Vena jugularis freipräpariert und Polyethylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Portex, Lythe, Großbritannien) implantiert. Während des gesamten Versuchverlaufs wurde der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) 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) kontinuierlich gemessen und durch die Volumensubstitution mit Ringer-Laktat (RL, 0,2 ml/h, Perfusor V, B. Braun, München, Deutschland) über den Venenkatheter konstant gehalten.

3.2.3.2 Reversible Leberischämie

Nach Fixierung der Versuchstiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte wurde die Bauchhöhle durch eine Längslaparotomie eröffnet. Daraufhin wurde die Blutversorgung des linken Leberlappens, der im Gegensatz zur menschlichen Leber in komplette Lappensegmente unterteilt ist, mittels Gefäßclip (Länge 6 mm, Medicon, Tuttlingen, Deutschland) durch reversibles Abklemmen des zuführenden Gefäße-Nerven-Bündels vollständig unterbrochen.

3.2.3.3 Organtemperatur während der Ischämie

Um die Temperatur des ischämischen Leberlappens zu adjustieren, wurde dieser zunächst in eine speziell dafür entwickelte Polyethylenschale ausgelagert (Dicke 0,3 mm, 25x15x5 mm, Institut für Chirurgische Forschung, München, Deutschland). Diese Schale ermöglichte es, selektiv nur den ischämischen Leberlappen durch Superfusion einer temperierten Kochsalzlösung auf die zu untersuchende Temperatur während der Ischämie zu erwärmen oder abzukühlen. Eine in die Schale integrierte Absaugvorrichtung verhinderte dabei ein Überlaufen der Kühlflüssigkeit in den Situs und somit die potentielle Auskühlung des Körperkerns. Die Organtemperatur wurde mittels einer intraparenchymal eingebrachten Temperatursonde (EB 1801, Durchmesser 0,5 mm, Ebro Electronic, Ingolstadt, Deutschland) permanent gemessen und über den Zufluss der temperierten Spüllösung konstant gehalten. Die Messung der Körperkerntemperatur erfolgte durch eine intramediastinal eingebrachte Temperatursonde (Durchmesser 2 mm, Effenberger, München, Deutschland), da es sich in Vorversuchen gezeigt hat, dass eine rektale Temperaturmessung in diesem Modell ungeeignet ist. Aufgrund des weit eröffneten Abdomens und des

Kontaktes von Rektum mit der Polyethylenschale würden die Messwerte je nach eingestellter Organtemperatur beeinflusst werden.

3.2.3.4 Reperfusion

Nach einer 90-minütigen Ischämie wurde der hepatische Blutfluss des linken Leberlappens durch Entfernen des Gefäßclips wiederhergestellt und der Leberlappen für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ausgelagert.

3.2.4 Intravitalmikroskopie

3.2.4.1 Technisches Setup

Um die Mikrozirkulation des reperfundierten Leberlappens darzustellen, wurde dieser auf eine spezielle Halterung ausgelagert, welche mit einer aus Plastilin vorgeformten Auflagefläche ausgestattet war. Die konkave Auflagefläche wurde entsprechend der konvexen Form der Leberunterseite angefertigt und ermöglichte eine verformungsfreie Lagerung des Leberlappens mit möglichst waagrecht Leberoberfläche. Die Oberfläche des Leberlappens konnte dadurch ohne Druck mit einem Objektträger zur intravitalmikroskopischen Darstellung der Mikrozirkulation bedeckt werden. Ein Austrocknen der Leberoberfläche wurde durch kontinuierliche Superfusion mit Kochsalzlösung verhindert. Der so ausgelagerte Leberlappen wurde mit Hilfe eines Leitz-Orthoplan-Mikroskops (Leitz) mit einer Ploemo-Pak Lichtquelle (Leitz) und einer 100 Watt HBO Quecksilberlampe (Osram GmbH, München, Deutschland) untersucht. Alle intravitalmikroskopischen Analysen wurden in Epilluminationstechnik durchgeführt. Durch das Umschalten zwischen den Filterblöcken I2/3 (Anregung 450-490 nm; Emission: 525 nm, Leitz) und N2 (Anregung 530-560 nm; Emission: 580 nm, Leitz) wurde die Darstellung der mittels zweier unterschiedlicher

Fluoreszenzfarbstoffe selektiv gefärbten mikrovaskulären Gefäße und Blutzellen erreicht. Mit Hilfe eines 25x Wasserimmersionsobjektives (W 25x/0,6; Leitz) wurde eine 500-fache Vergrößerung erzielt. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mittels einer charge-coupled device (CCD)-Videokamera (FK 6990, Cohu, Prospective Measurements, San Diego, USA) auf einem Bildschirm (Diagonale: 33 cm; Sony, München, Deutschland) wiedergegeben und für eine spätere quantitative Auswertung mittels einer Videoanlage (S-VHS Panasonic AG 7330, Matsushita Electric, Tokyo, Japan) aufgezeichnet. Zur Plasmakontrastierung der hepatischen Mikrozirkulation wurde als Plasmamarker 0,1 ml 5% Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-markiertes Dextran (M_r 150.000; Sigma-Aldrich) verwendet. Zur Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde den Tieren zusätzlich jeweils vor den Messungen Rhodamin-6G (0,1 ml 0,2%, M_r 479, Sigma-Aldrich) intravenös appliziert. In dieser Dosierung reichert sich Rhodamin-6G in Cytochrom-reichen Zellen wie etwa zirkulierenden neutrophilen Granulozyten an und ermöglicht eine Visualisierung durch das Intravitalmikroskop.

3.2.4.2 Mikrozirkulatorische Parameter

Als funktioneller Parameter wurde zuerst die sinusoidale Perfusionsrate in den oberflächlichen Sinusoiden bestimmt. Zur Quantifizierung der inflammatorischen Reaktion wurde daraufhin die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postsinusoidalen Venolen untersucht. Die quantitative Auswertung der auf Video aufgezeichneten mikrozirkulatorischen Parameter wurde off-line mit Hilfe des Computer Assisted Microcirculation Analysis System, CAMAS® (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) angefertigt⁸¹.

3.2.4.2.1 Sinusoidale Perfusion

Nach Applikation des Plasmamarkers FITC-Dextran wurde die sinusoidale Perfusionsrate in 8-10 Leberazini bestimmt. Das Ergebnis errechnete sich aus der Anzahl perfundierter Sinusoide geteilt durch die Gesamtzahl der Sinusoide eines Azinus.

3.2.4.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

In 8-10 postsinusoidalen Venolen mit einem mittleren Durchmesser von 30 μm wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bestimmt. Nach der Applikation von Rhodamin-6G, welches alle zirkulierenden Leukozyten anfärbt, wurden unter Verwendung des N2-Filterblocks von jeder postsinusoidalen Venole 20 Sekunden lange Videosequenzen eines definierten Gefäßsegments von 100 μm Länge aufgezeichnet. Bei der quantitativen off-line-Analyse wurde dann zwischen rollenden und adhärenen Leukozyten unterschieden. Alle Leukozyten, die innerhalb des 20-Sekunden-Intervalls mit einer deutlich reduzierten Geschwindigkeit eine zuvor definierte Linie passierten, wurden als rollende Leukozyten gezählt. Die Ergebnisse sind in der Dimension Anzahl der Zellen pro 20 Sekunden angegeben. Leukozyten die länger als 20 Sekunden an einem Ort des Gefäßendothels ohne Positionsänderung verharrten, galten als adhären. Unter Annahme einer zylindrischen Form der postsinusoidalen Venolen ist mit Hilfe des Gefäßdurchmessers die Fläche des untersuchten Gefäßabschnitts berechnet worden und die Ergebnisse als Anzahl der permanent adhärenen Leukozyten pro Endothelzelloberfläche angegeben.

3.2.5 Leberenzyme

Im Anschluss an die letzte intravitalmikroskopische Messung wurde den Tieren arterielles Blut zur Bestimmung der Lebertransaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) im Blutplasma entnommen. Die Blutproben wurden in einem EDTA-beschichteten Probengefäß gesammelt und bei 2000x g für 10 min zentrifugiert (Routina 35R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Anschließend wurde das Blutplasma abpipettiert und bis zum Zeitpunkt der Messung bei -80°C eingefroren. Die Enzymaktivitäten wurden spektrophotometrisch (Hitachi 917, Roche-Boehringer, Mannheim, Deutschland) entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie in [IU/L] bestimmt. Zur Standardisierung wurden die Ergebnisse der Enzymaktivität auf ein Gesamteiweiß von 4,92 [g/dl] normiert.

3.2.6 Evaluierung der Apoptose

Die Anwesenheit apoptotischer Leberzellen wurde mittels immunhistologischer Färbung von DNA-Fragmenten durch TUNEL-Färbung und durch die photometrische Bestimmung der Aktivität des spezifischen Apoptose-Induktors Caspase-3 im Lebergewebe untersucht.

3.2.6.1 TUNEL-Färbung

Die Induktion von Apoptose wurde morphologisch anhand von DNA-Strang-Brüchen identifiziert. Bei der TUNEL-Methode (Terminal Deoxynucleotidyltransferase-Mediated dUTP Nick End Labeling) werden die freien 3'-OH-Enden immunhistochemisch angefärbt⁵⁵. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide an die freien 3'-OH-Termini durch eine

Transferase polymerisiert. Der Nachweis des eingebauten Fluoreszeins erfolgt durch einen peroxidase-markierten monoklonalen Antikörper und nachfolgender Enzymreaktion. Das Lebergewebe wurde dafür in 4% Paraformaldehyd (pH 7,4) fixiert, in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom geschnitten. Die 6 µm dicken Schnitte wurden dann durch die TUNEL Methode gefärbt (in situ cell detection kit, Boeringer Mannheim Co., Deutschland) und anschließend die Anzahl TUNEL-positiver Zellen unter 400-facher Vergrößerung eines Lichtmikroskops in jeweils 10 Gesichtsfeldern ausgezählt. Die Ergebnisse sind in [%] angegeben.

3.2.6.2 Caspase-3-Aktivität

Ergänzend zur morphologischen Darstellung mittels TUNEL-Analyse wurde die Aktivität des spezifischen Apoptose-Induktors Caspase-3 im Lebergewebe photometrisch bestimmt. Die bei -80°C konservierten Gewebeprobe n wurden in 1ml Lysepuffer (HEPES 25 mM, MgCl₂ 5mM, EGTA 1mM, DTT 1mM; pH 7,5) homogenisiert. Nach Zentrifugation (5 min, 10000x g) zur Entfernung von Zelltrümmern wurde die Eiweißkonzentration mittels BRADFORD-Methode unter Verwendung einer Ovalbumin-Standardlösung bestimmt. Die Aktivität der Caspase-3 wurde über die Umsetzung des spezifischen Substrats Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Alexis Co., Läu felfingen, Schweiz) photometrisch (Anregung: 390 nm; Emission: 460 nm; FLUOstar®, Offenburg, Deutschland) gemessen und die Ergebnisse in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Als Kontrolle wurde eine Standardkurve durch die serielle Verdünnung von Cumarin generiert.

3.2.7 Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden pro Versuchsgruppe vier Tiere gesondert nach dem gleichen Operationsprotokoll operiert, allerdings ohne Applikation von Fluoreszenzmarkern und intravitalmikroskopische

Untersuchungen, um deren etwaigen Einfluss auszuschließen. Zur Anfertigung elektronenmikroskopischer Bilder wurde die Leber am Ende der Reperfusionphase präpariert. Über den zuvor implantierten Halsgefäßkatheter wurde die Leber zuerst mit heparinierter Kochsalzlösung (5 ml) blutleer gespült und anschließend mit 10 ml Karnowski Lösung (25ml 8%er Paraformaldehydsg., 10ml 25 %ige Glutaraldehydsg., Sörensenpuffer) perfundiert. Um die kanalikulären Strukturen möglichst gut von Blutbestandteilen zu befreien, zur Verbesserung des Kontrastes der Aufnahmen und zur Vermeidung eines möglichen Schadens durch zu hohen Perfusionsdruck, wurde kurz vor Perfusionsbeginn der distale Rand des zu perfundierenden Leberlappens vorsichtig abgeschnitten (ca. 2mm) wodurch ein entlastender Abfluss geschaffen wurde. Die anschließend entnommene Leber wurde in kleine Gewebeblöcke geschnitten und für 2h in Sörensen-Puffer mit 2 % Osmium Tetroxide (pH 7,4, Zimmertemperatur) fixiert. Daraufhin wurde das Gewebe dehydriert, bei 6°C für 24h in Epon Monomerlösung (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingebettet, mittels Diamantmesser (Reichert & Jung Ultramicrotome, München, Deutschland) zugeschnitten (Schichtdicke 50 nm) und schließlich mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Die Präparate sind daraufhin mit Hilfe eines Transmissionselektronenmikroskops bei 80 kV Beschleunigungsspannung (Zeiss EM 900, Germany) untersucht worden.

3.3 Versuchsprotokolle

Entsprechend den unter 2. genannten Zielen wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche Versuchsprotokolle verwendet:

1. zur Modelletablierung
2. zur Analyse der protektiven Wirkung moderater Ischämietemperaturen

3.3.1 Protokoll „Modelletablierung“

3.3.1.1 Versuchsgruppen

Zur Modelletablierung wurde eine Versuchsgruppe nach normothermer Ischämie mit 37°C und der maximalen Hypothermie von 4°C Ischämietemperatur untersucht und mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe verglichen. Als Kontrolltiere dienten schein-operierte Tiere (n=7) bei denen nach identischer Laparotomie weder eine Ischämie noch eine Temperierung des Organs vorgenommen wurde, sondern der Gefäßclip lediglich für zwei Sekunden die Blutzufuhr des linken Leberlappens unterbrochen hat, um dann sofort wieder entfernt zu werden. Um auszuschließen, dass ein Setzen des Gefäßclips oder das eröffnete Abdomen per se die Mikrozirkulation beeinträchtigt, wurden zusätzliche Versuchsgruppen untersucht, bei denen direkt nach erfolgter Laparotomie intravitalmikroskopische Aufnahmen angefertigt wurden.

3.3.1.2 Versuchsablauf

Bei der Bestimmung der Untersuchungszeiten ergaben Vorversuche (n=5) nur geringe Unterschiede der Parameter der Mikrozirkulation zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen nach 60-minütiger Ischämie. Demgegenüber zeigten sich nach 90-minütiger Ischämie deutliche Unterschiede zwischen den

verschiedenen Temperaturgruppen. Die Ischämiezeit wurde daraufhin auf 90 min festgelegt. Die Reperfusionzeit wurde von anfänglich 360 min Reperfusion und vier Messzeitpunkten auf 240 min und Messungen nach 30, 120 und 240 min begrenzt und entspricht damit auch vielen bislang publizierten Studienprotokollen. Das Experiment begann somit mit einer 30-minütigen Operation, gefolgt von einer 90-minütigen Leberischämie und intravitalmikroskopischen Messungen jeweils 30 min, 120 min und 240 min nach dem Beginn der Reperfusion. Im Anschluss an die Untersuchungen wurden die Tiere durch Vertiefung der Narkose getötet und Blut-Gewebeproben entnommen.

3.3.2 Protokoll „moderate Ischämietemperaturen“

3.3.2.1 Versuchsgruppen

Um zu untersuchen, ob sich ein protektiver Effekt bereits bei moderaten Ischämietemperaturen bemerkbar macht, wurden die Temperaturen zwischen maximaler Kühlung auf 4°C und normothermer Ischämie systematisch analysiert. Die Temperaturgruppen wurden in 11°C-Schritten gestaffelt: 37°C, 26°C, 15°C und 4°C Organtemperatur während der Ischämie. Da die deutlichsten Veränderungen im Bereich einer milden Hypothermie zwischen 37°C und 26°C vermutet wurden, wurde eine zusätzliche Versuchsgruppe zwischen 37°C und 26°C bei 31,5°C analysiert.

3.3.2.2 Versuchsablauf

Der zeitliche Verlauf des Experiments entsprach dem der Etablierungsversuche. Er begann mit einer halbstündigen Operation, gefolgt von einer 90-minütigen Ischämie und intravitalmikroskopischen Messungen jeweils 30 min, 120 min und 240 min nach Beginn der Reperfusion.

4 Statistik

Alle erhobenen Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des Software Pakets Sigma StatTM (Jandel Corporation, St. Rafael, CA, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Test auf statistische Unterschiede hin überprüft. Ab einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als signifikant gewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Modelletablierung

5.1.1 Makrohämodynamik

Zur Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen ist eine unbeeinträchtigte Makrohämodynamik Voraussetzung. Der mittlere arterielle Blutdruck betrug bei den Versuchsgruppen während des gesamten Versuchs über 70 mmHg ohne signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tab.1).

MAP [mmHg]	Sham	37°C	4°C
30 min	84 \pm 1	85 \pm 3	86 \pm 3
240 min	79 \pm 4	74 \pm 1	77 \pm 3

Tab. 1: Mittlerer arterieller Blutdruck 30 min/240 min nach Reperfusion, MW \pm SEM, n=7

5.1.2 Temperatur von Leberlappen und Mediastinum

Der ischämische Leberlappen konnte in beiden Temperaturgruppen innerhalb weniger Sekunden auf die gewünschte Temperatur eingestellt werden. Dabei betrug bei beiden Versuchsgruppen die Mediastinaltemperatur zwischen 30°C und 31°C (Tab. 2). Wie eingangs beschrieben erfolgte die Temperaturmessung intramediastinal, da eine rektale Messung durch das weit eröffnete Abdomen und die Spülflüssigkeit verfälscht werden würde. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die in unserem Modell intramediastinal gemessenen Temperaturen von 30°C-31°C in einer Körperkerntemperatur von 35°C bis 37°C entsprachen.

Temperatur [°C]	Sham	37°C	4°C
Organ	n.g.	37±0,1	4±0,1
Körper	30±0,2	32±0,8	29±0,1

Tab. 2: Temperatur Organ/Körper während Ischämie, MW±SEM, n=7

5.1.3 Mikrozirkulation

5.1.3.1 Intravitalmikroskopie

Während der Reperfusionsphase erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation. Abbildung 1 zeigt eine typische Leberarchitektur in 200-facher Vergrößerung mit einem markierten, sechseckigen Leberläppchen, Portalgefäßen, den Sinusoiden und einer Zentralvene in der Mitte.

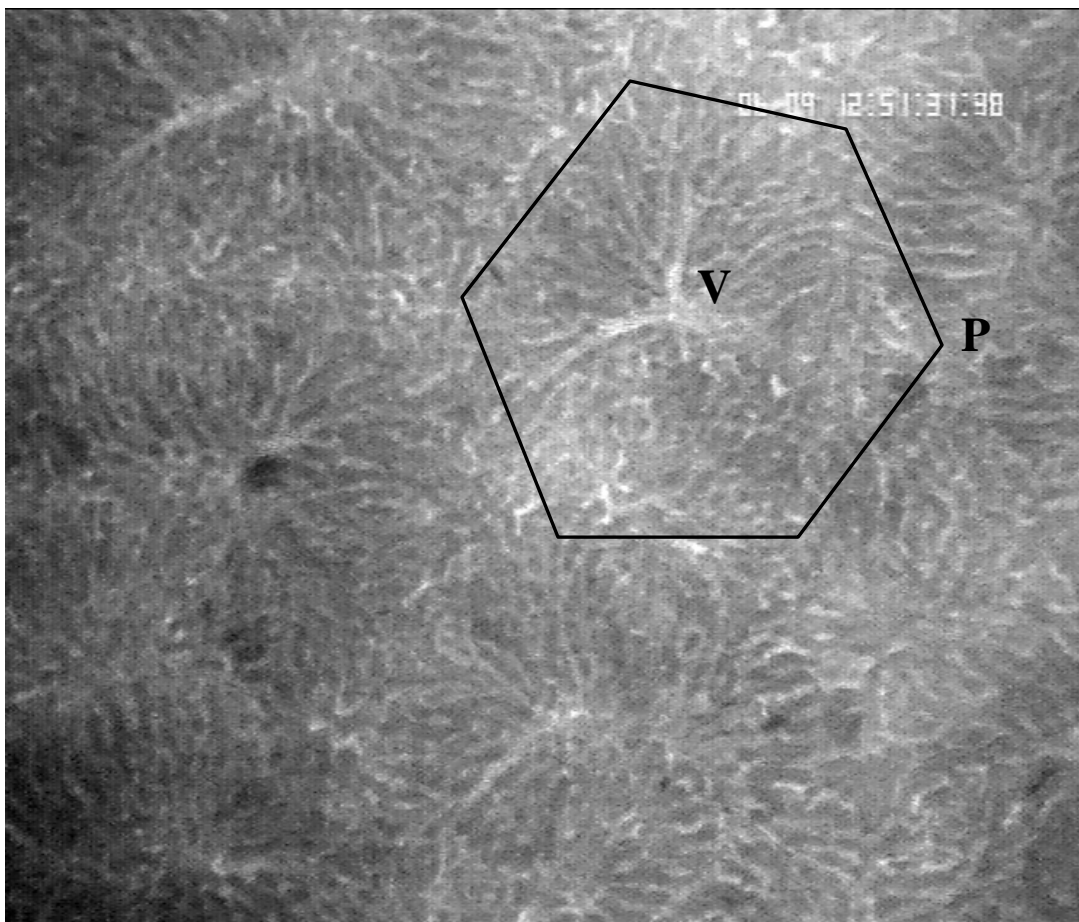


Abb 1. Intravitalmikroskopische Darstellung der hepatischen Mikrozirkulation in 200-facher Vergrößerung. Mittels Sechseck markiert zeigt sich ein typisches Leberläppchen, mit sechs begrenzenden Portalgefäßen (P) und einer Zentralvene in der Mitte (V).

5.1.3.2 Sinusoidale Perfusionsrate

Bei den schein-operierten Tieren präsentierte sich zum ersten Messzeitpunkt 30 min nach Reperfusion eine homogene Perfusion mit einer durchschnittlichen Perfusionsrate von $93\pm 1\%$. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich 120 min nach Reperfusion eine leichte Abnahme der sinusoidalen Perfusionsrate. Zum letzten Messzeitpunkt, 240 min nach Reperfusion, war die sinusoidale Perfusionsrate auf $84\pm 2\%$ reduziert. Nach normothermer Ischämie war bereits 30 min nach Reperfusion eine signifikante Abnahme der Perfusionsrate im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren zu verzeichnen, mit weiterer Reduzierung zu den späteren Messzeitpunkten. Durch die intraischämische Hypothermie von 4°C ist es gelungen, die postischämische Perfusionsrate signifikant zu verbessern (Abb. 2).

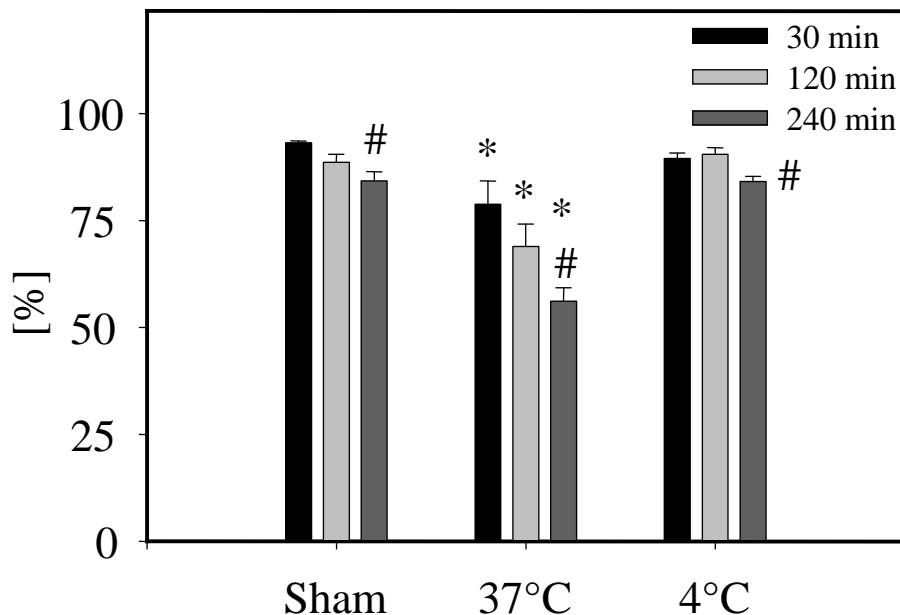


Abb.2. Sinusoidale Perfusionsrate, $MW\pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Sham, # $p < 0,05$ 240 min vs. 30 min, $n=7$

5.1.3.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die quantitative Analyse der Leukozytenadhärenz ergab eine starke Zunahme der Anzahl adhärenter Leukozyten nach normothermer Ischämie verglichen mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe. Nach hypothermer Ischämie blieb ein Anstieg der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion vollständig aus (Abb. 3).

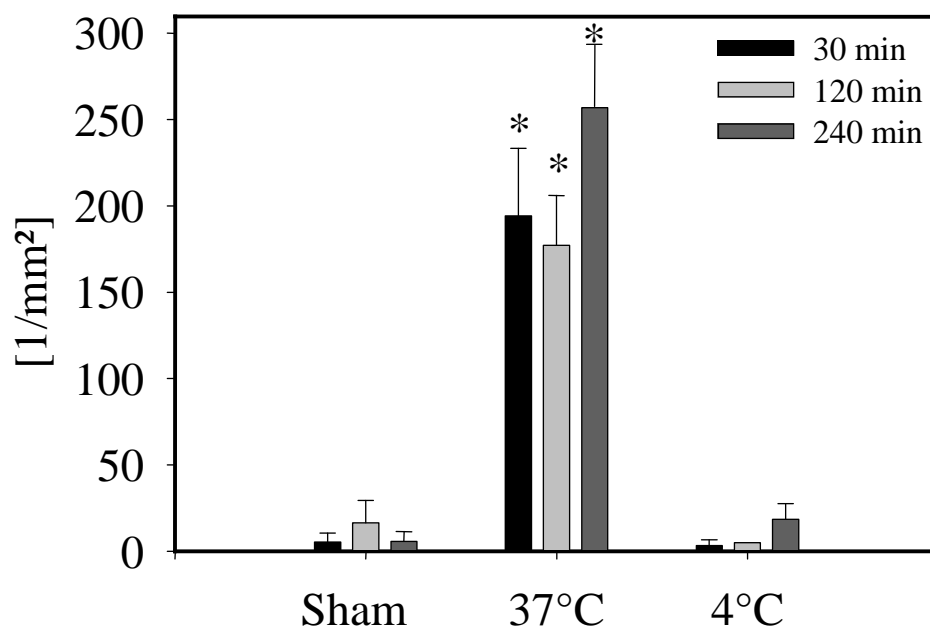


Abb. 3. Anzahl permanent adhärenter Leukozyten in postsinusoidalen Venolen, $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Sham, $n=7$

5.1.4 Leberenzyme

Die Serumaktivitäten der Leberenzyme AST/GOT und ALT/GPT wurden als Marker des hepatozellulären Schadens untersucht. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der intravitalmikroskopischen Untersuchung zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität nach normothermer Ischämie auf 6189 ± 353 IU/l AST/GOT und 1186 ± 250 IU/l ALT/GPT, verglichen mit den Werten der schein-operierten Tiere von 507 ± 48 IU/l AST/GOT und 139 ± 45 IU/l ALT/GPT. Dieser Anstieg konnte durch die Kühlung des Leberlappens auf 4°C verhindert werden (Abb. 4).

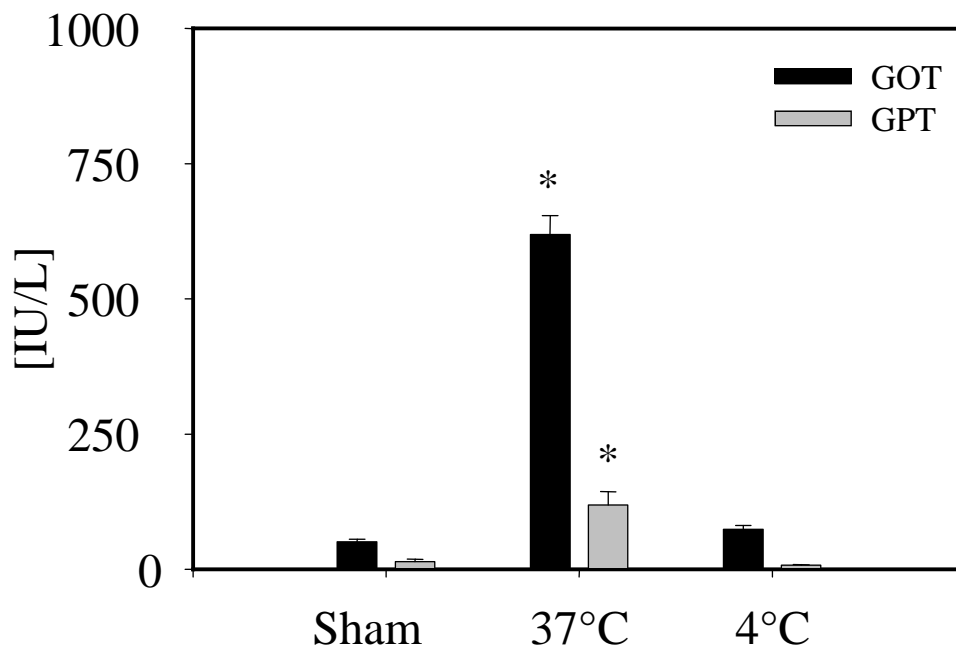


Abb. 4. Serumaktivitäten der Leberenzyme $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Sham, $n=7$

5.2 Analyse moderater Ischämietemperaturen

5.2.1 Makrohämodynamik

Sowohl bei den Temperaturgruppen als auch bei den sham-operierten Tieren waren über den gesamten Verlauf des Experiments keine signifikanten Veränderungen des mittleren arteriellen Blutdrucks zu verzeichnen. Sowohl 30 min als auch 240 min nach Reperfusion betrug dieser bei allen Versuchsgruppen über 70 mmHg (Tab. 3).

MAP [mmHg]	Sham	37°C	31,5°C	26°C	15°C	4°C
30 min	84±1	85±3	84±3	87±2	89±4	86±3
240 min	79±4	74±1	74±1	79±2	78±4	78±3

Tab. 3: Mittlerer arterieller Blutdruck 30 min/240 min nach Reperfusion, MW±SEM, n=7

5.2.2 Temperatur von Leberlappen und Mediastinum

Der ischämische Leberlappen konnte bei allen Temperaturgruppen innerhalb weniger Sekunden auf die gewünschte Temperatur eingestellt werden und die Ergebnisse wiesen nur einen minimalen Standardfehler auf. Ebenso war die Mediastinaltemperatur über den gesamten Versuchsablauf konstant. Sie betrug bei allen Versuchsgruppen zwischen 30°C und 31°C ohne signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Temperaturgruppen (Tab. 4).

Temperatur [°C]	Sham	37°C	31,5°C	26°C	15°C	4°C
Organ	n.g.	37±0,1	31±0,0	26±0,1	15±0,1	4±0,1
Körper	30±0,2	32±0,8	31±0,2	30±0,3	29±0,4	29±0,1

Tab. 4.: Organ/Körpertemperatur während der Ischämie, MW±SEM, n=7

5.2.3 Mikrozirkulation

5.2.3.1 Sinusoidale Perfusionsrate

Nach normothermer Ischämie und Ischämietemperaturen von 31,5°C zeigte sich bereits 30 min nach Reperfusion eine signifikante Reduktion der sinusoidalen Perfusionsrate. Diese Einschränkung der Mikrozirkulation konnte bereits durch die moderate Hypothermie von 26°C vollständig verhindert werden. Eine weitere Reduzierung der Organtemperatur auf 15°C oder 4°C bewirkte denselben protektiven Effekt und konnte die Perfusionsraten auf dem Niveau der Sham-operierten Tiere halten. Bei der Betrachtung der Reperfuionszeiten zeigte sich bei allen Versuchsgruppen eine leichte, nach 240 min auch signifikante Reduktion der Perfusionsraten (Abb. 5).

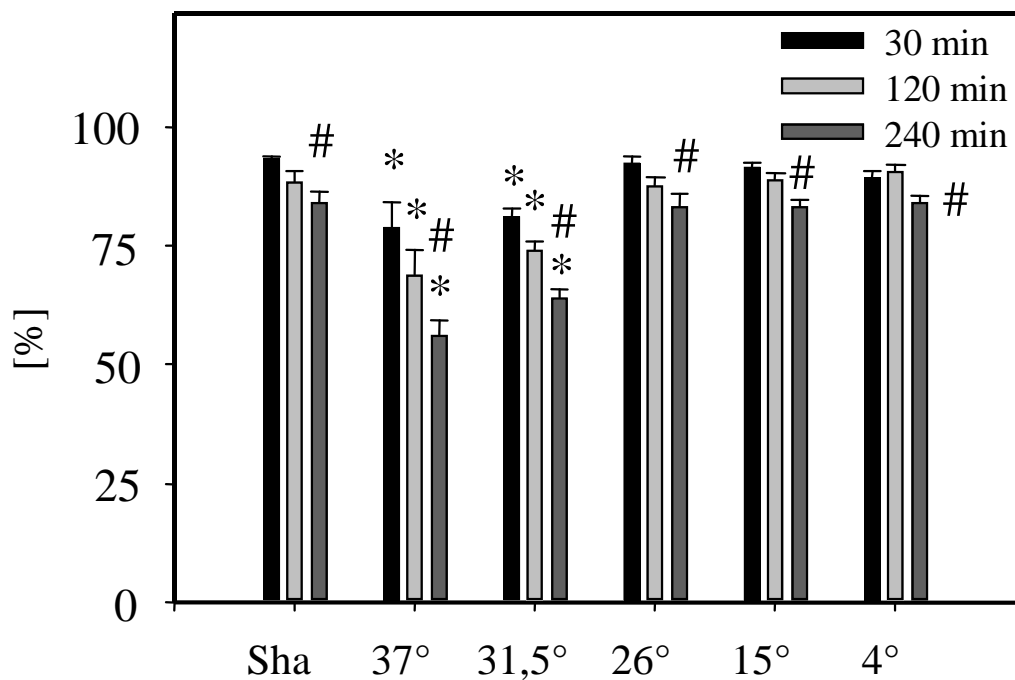


Abb. 5. Sinusoidale Perfusionsrate, $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Sham, # $p < 0,05$ 240 min vs. 30 min, $n=7$

5.2.3.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

5.2.3.2.1 Rollende Leukozyten

Nach normothermer Ischämie und Ischämie bei 31,5°C war eine massive Zunahme der Anzahl rollender Leukozyten zu beobachten. Bereits die Kühlung des ischämischen Organs auf 26°C konnte diesen Anstieg weitgehend verhindern. Auch eine weitere Reduzierung der Organtemperatur auf 15°C oder 4°C konnte ein postischämisches Rolling verhindern. Betrachtet man das Leukozytenrolling nach verschiedenen Reperfusionzeiten, erkennt man keine signifikante Veränderung zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten (Abb. 6).

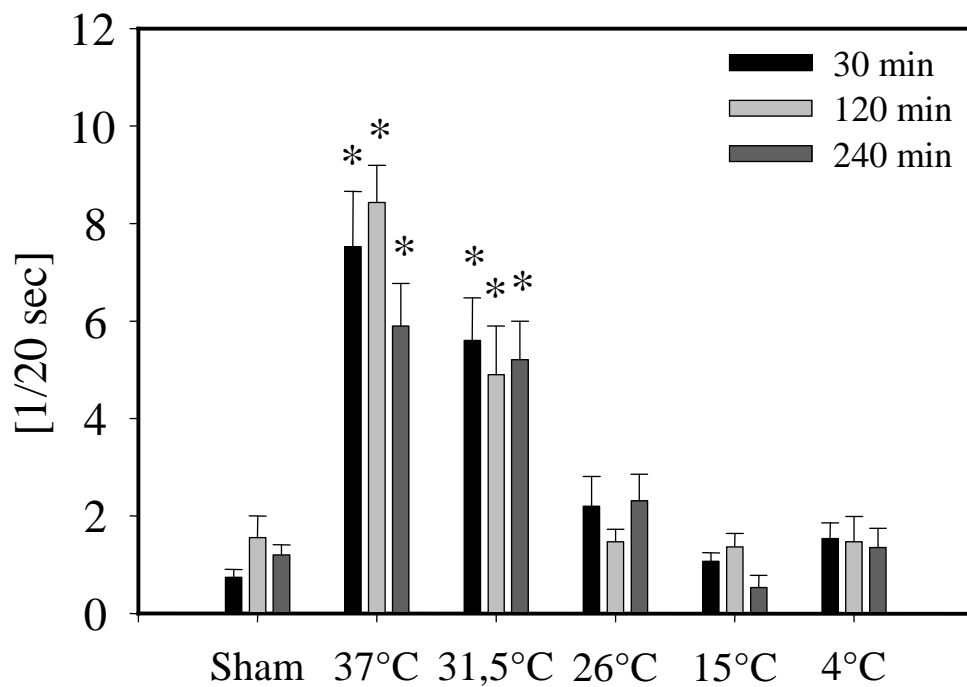


Abb. 6. Anzahl rollender Leukozyten in postsinusoidalen Venolen, $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Sham, $n=7$

5.2.3.2.2 Permanent adherente Leukozyten

Ebenso zeigte sich bei der Leukozytenadherenz bei der 37°C- und 31,5°C-Gruppe eine starke Zunahme der Anzahl fest adhärenter Leukozyten, verglichen mit den Ergebnissen der Shamgruppe. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Anzahl rollender Leukozyten bewirkt die Abkühlung des ischämischen Organs auf 26°C, 15°C und 4°C eine signifikante Reduktion der Anzahl adhärenter Leukozyten nahezu vollständig auf das Niveau der Shamgruppe. Statistisch zeigte sich auch hier kein eindeutiger Einfluss der Reperfusionzeit auf das Ergebnis (Abb. 7).

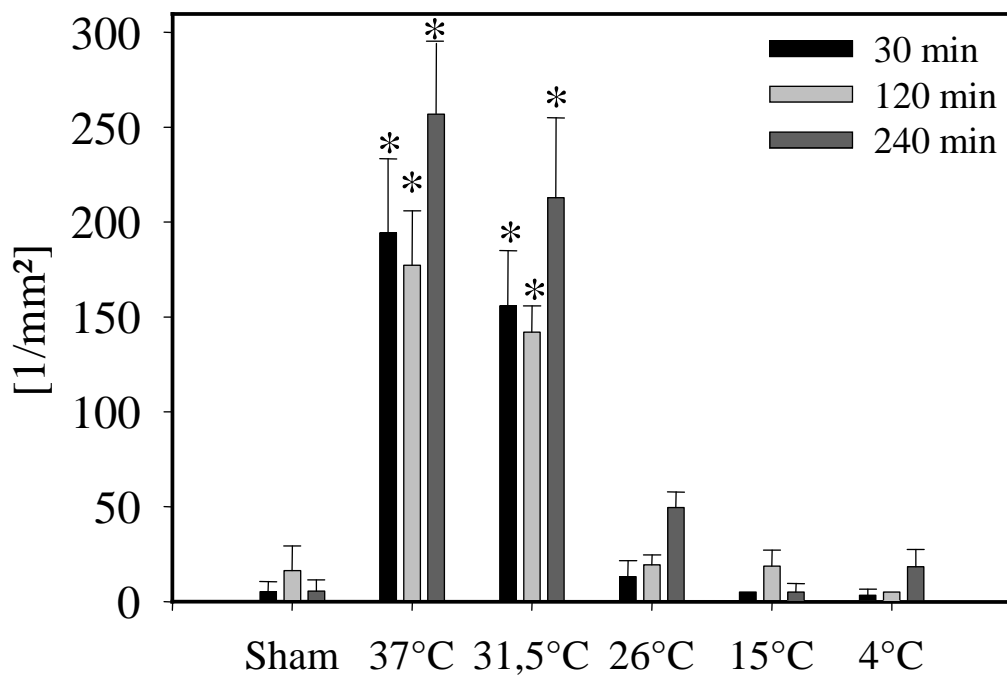


Abb. 7. Anzahl permanent adhärenter Leukozyten in postsinusoidalen Venolen, $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Sham, $n=7$

5.2.4 Leberenzyme

Im Anschluss an die letzte intravitalmikroskopische Messung wurde den Versuchstieren Blut zur Bestimmung der Lebertransaminasen AST/GOT und ALT/GPT im Blutserum entnommen. Bestätigend zu den Ergebnissen der intravitalmikroskopischen Analyse zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität nach normothermer Ischämie auf 6189 ± 353 IU/l AST/GOT und 1186 ± 250 IU/l ALT/GPT verglichen mit den Werten der Shamgruppe von 507 ± 48 IU/l AST/GOT und 139 ± 45 IU/l ALT/GPT. Dieser Anstieg konnte schon durch die Kühlung auf 26°C auf das Niveau der Shamgruppe reduziert werden. Auch bei den Organtemperaturen von 15°C oder 4°C blieb ein Anstieg der Enzymaktivität aus (Abb. 8).

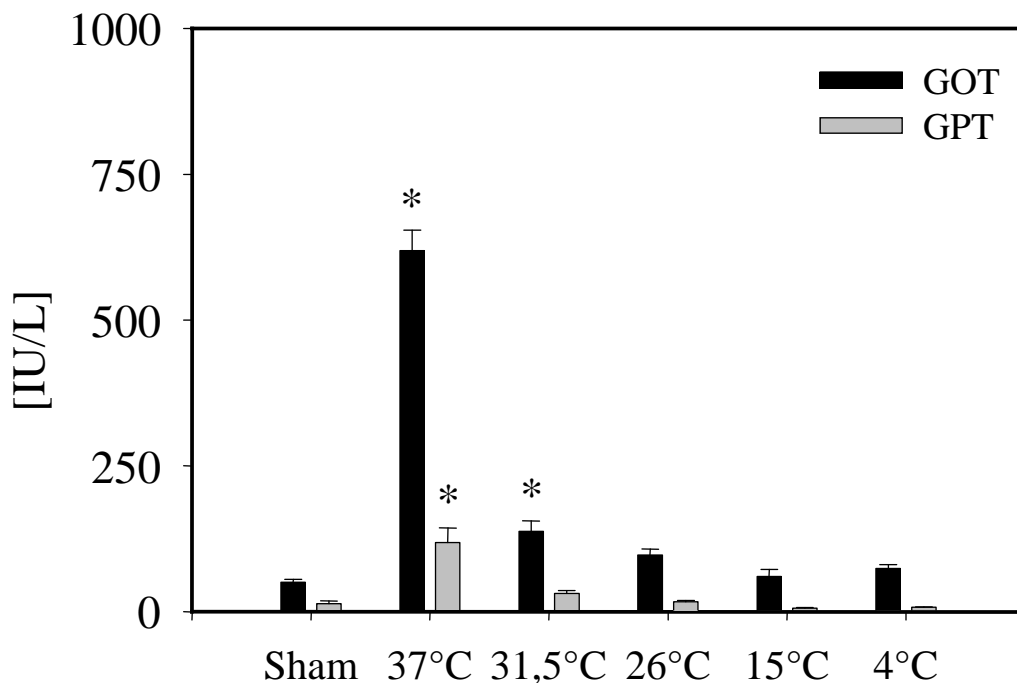


Abb. 8. Serumaktivitäten der Leberenzyme GOT und GPT, $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Sham, $n=7$

5.2.5 Evaluierung der Apoptose

5.2.5.1 TUNEL-Färbung

Mittels TUNEL-Färbung von Gewebeschnitten wurden Anzahl, Typ und Lokalisation apoptotischer Zellen untersucht. Alle rot eingefärbten Zellkerne weisen auf DNA-Strangbrüche hin und galten als TUNEL positiv. In den histologischen Präparaten war es bei 400facher Vergrößerung gut möglich, Endothelzellen von Hepatozyten zu unterscheiden. Dabei zeigte sich, dass postischämische Apoptose in diesem Versuchsansatz größtenteils in Parenchymzellen induziert wurde (Abb. 9, Abb. 10).

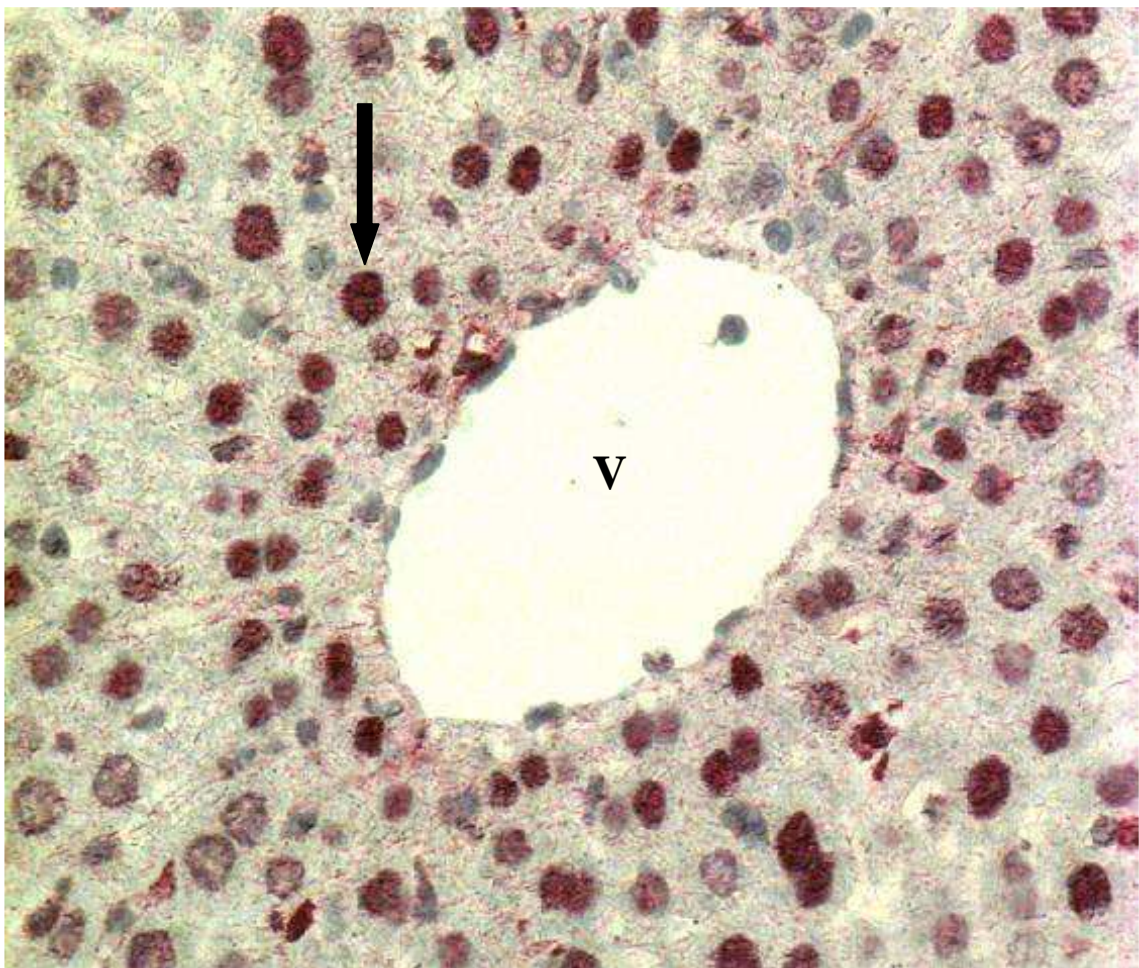


Abb. 9. TUNEL-Färbung in 400-facher Vergrößerung nach 37°C Ischämietemperatur mit Zentralvene (V) in der Mitte und zahlreichen TUNEL-positiven Zellen (Pfeil).

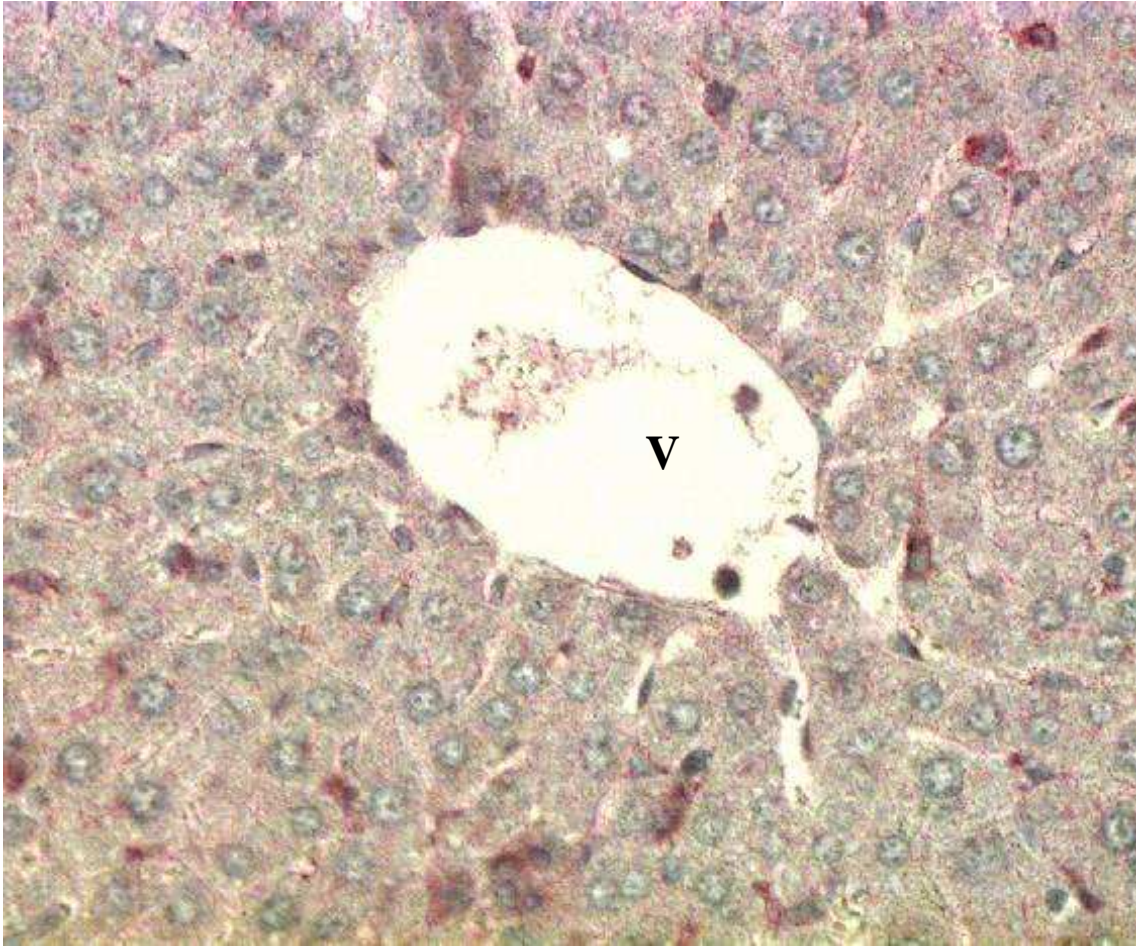


Abb. 10. TUNEL-Färbung in 400-facher Vergrößerung nach 26°C Ischämietemperatur mit Zentralvene (V) in der Mitte. TUNEL-positive Zellen sind nicht zu erkennen.

5.2.5.2 Anzahl TUNEL-positiver Zellen

Die quantitative Analyse ergab einen hohen Anteil TUNEL-positiver Zellen nach normothermer Ischämie. Durchschnittlich 17% der Zellen färbten sich durch den TUNEL-Assay, wohingegen bereits die milde Hypothermie von 31,5°C eine DNA-Fragmentierung vollständig verhindern konnte. Auch bei den anderen hypothermen Versuchsgruppen zeigten sich keine Hinweise auf DNA-Strangbrüche (Abb. 11).

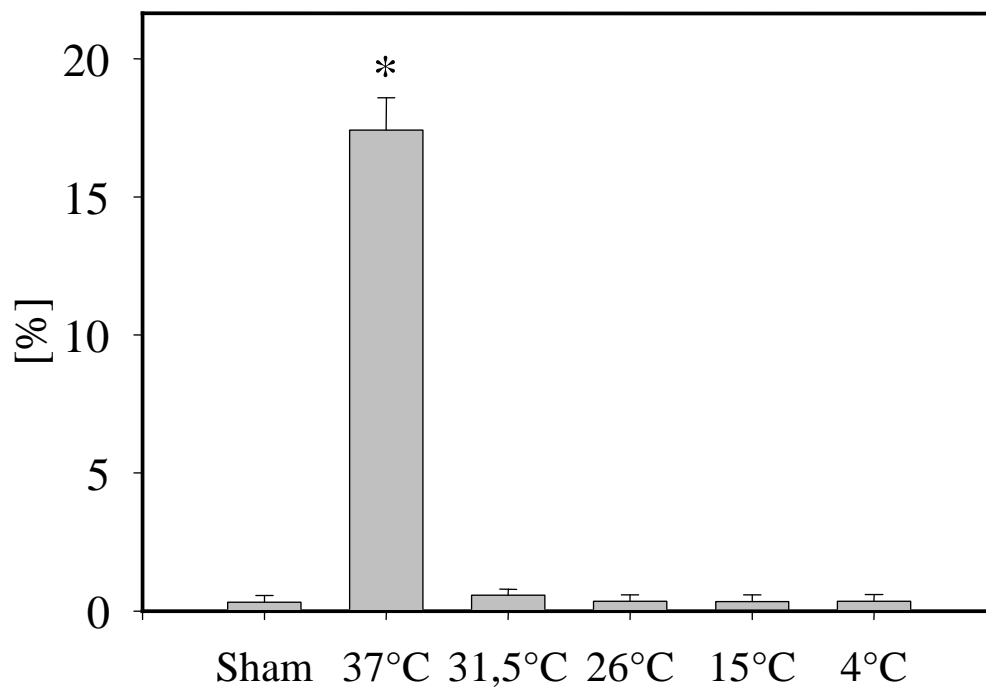


Abb. 11. Anzahl TUNEL-positiver Zellen im Gewebe in %, $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Sham, $n=7$

5.2.5.3 Caspase-3-Bestimmung

Eine postischämische Apoptoseinduktion wurde zusätzlich durch die photometrische Bestimmung der Aktivität von Caspase-3 im Lebergewebe untersucht. Analog zu den Ergebnissen der TUNEL-Färbung wies auch die Aktivität des spezifischen Apoptose-Induktors Caspase-3 einen massiven Anstieg nach normothermer Ischämie auf, welcher bereits durch die milde Hypothermie von 31,5°C vollständig unterblieb (Abb. 12).

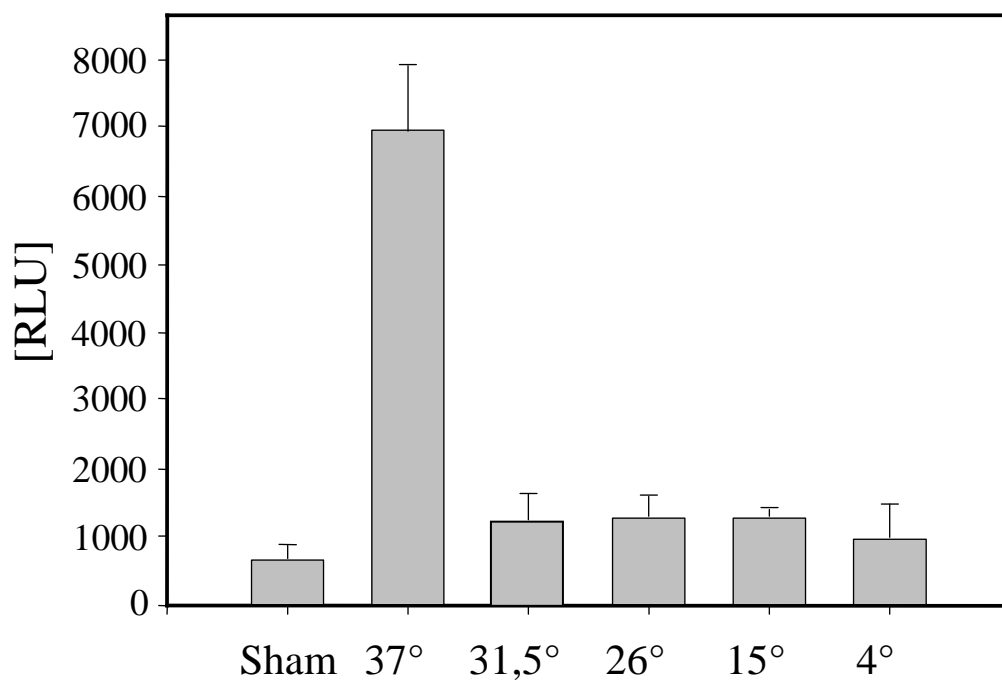


Abb. 12. Caspase-Aktivität im Gewebe, MW+SEM, n=3

5.2.6 Histologie

In der Histologie präsentierte sich bei den sham-operierten Tieren eine physiologische Zellstruktur mit intakten Hepatozyten. Nach normothermer Ischämie zeigte sich hingegen eine Degeneration von Hepatozyten mit Ödembildung und unterschiedlich großen Vakuolen. Nach hypothermer Ischämie und Reperfusion ergab sich wiederum das Bild einer intakten Leberzellstruktur (Abb. 13-15).

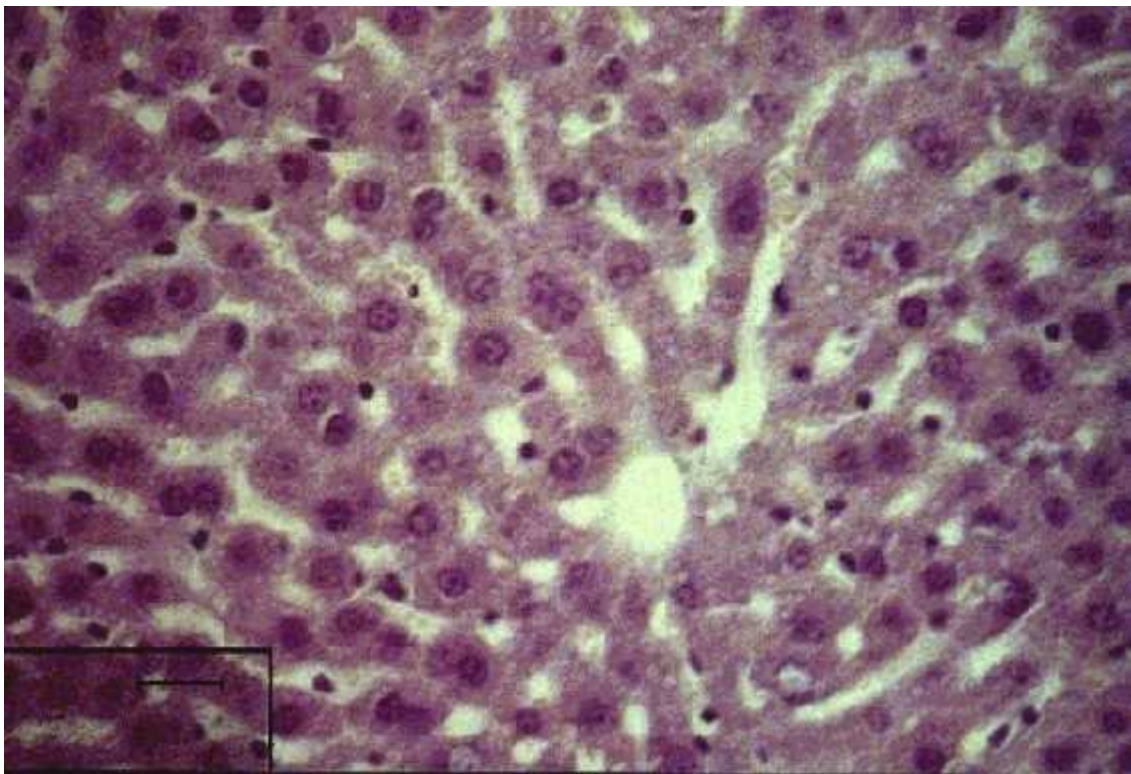


Abb. 13. Histologie, HE-Färbung, Shamgruppe mit physiologischer Zellstruktur und intakten Hepatozyten, Balkenlänge 100µm.

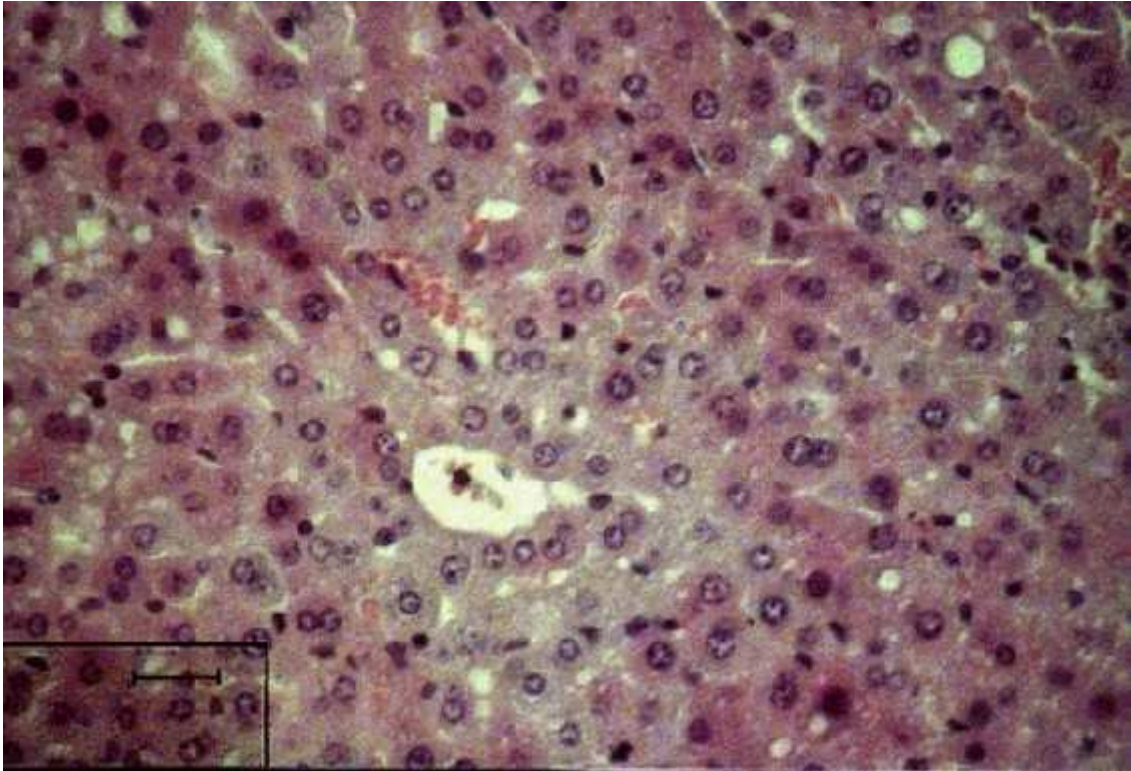


Abb. 14. Histologie, HE-Färbung, normotherme Ischämie mit Degeneration der Hepatozyten, Ödembildung und unterschiedlich großen Vakuolen, Balkenlänge 100 μ m.

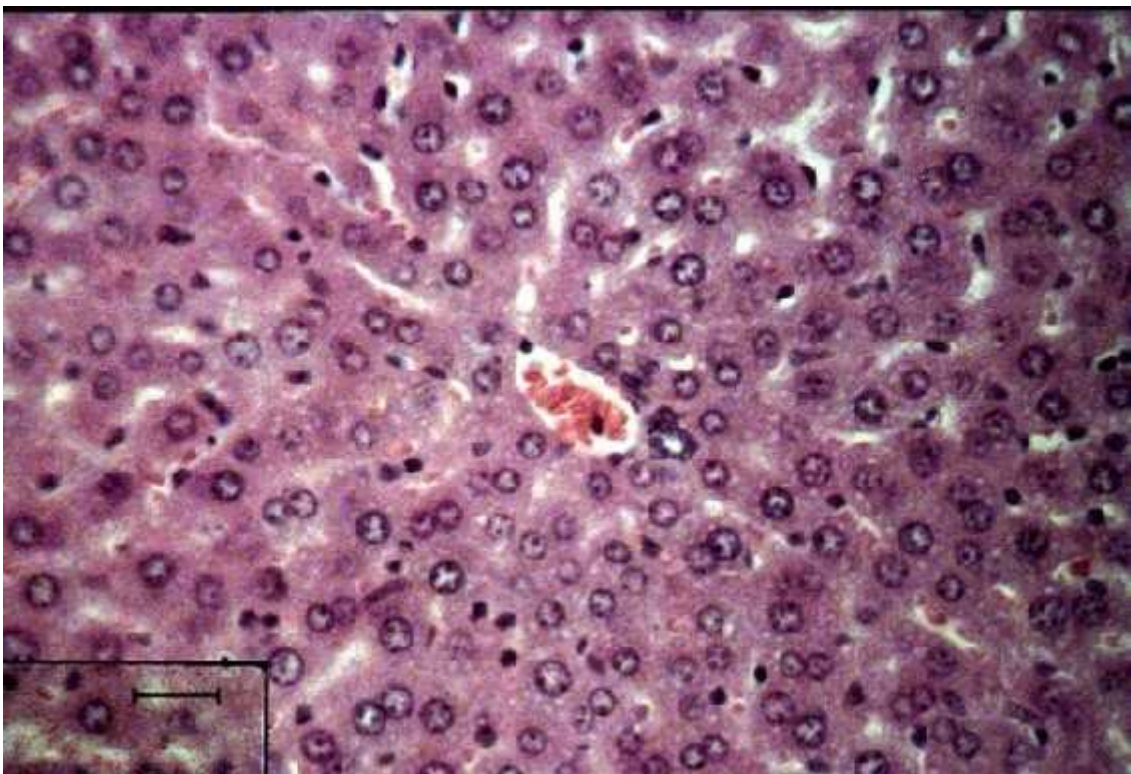


Abb. 15. Histologie, HE-Färbung, milde Hypothermie mit 26°C Organtemperatur mit intakter Leberzellstruktur, Balkenlänge 100 μ m.

5.2.7 Elektronenmikroskopie

In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der sham-operierten Tiere und allen hypothermen Versuchsgruppen fand sich eine physiologische Leberstruktur mit intakten Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen. Auch intrazelluläre Organellen, wie z.B. das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien waren intakt ohne Zeichen einer Schwellung. Im Gegensatz dazu fand sich bei den Aufnahmen nach normothermer Ischämie eine nahezu vollständige Zerstörung der Leberarchitektur, mitochondriale Schwellung und Vakuolisierung (Abb. 16).

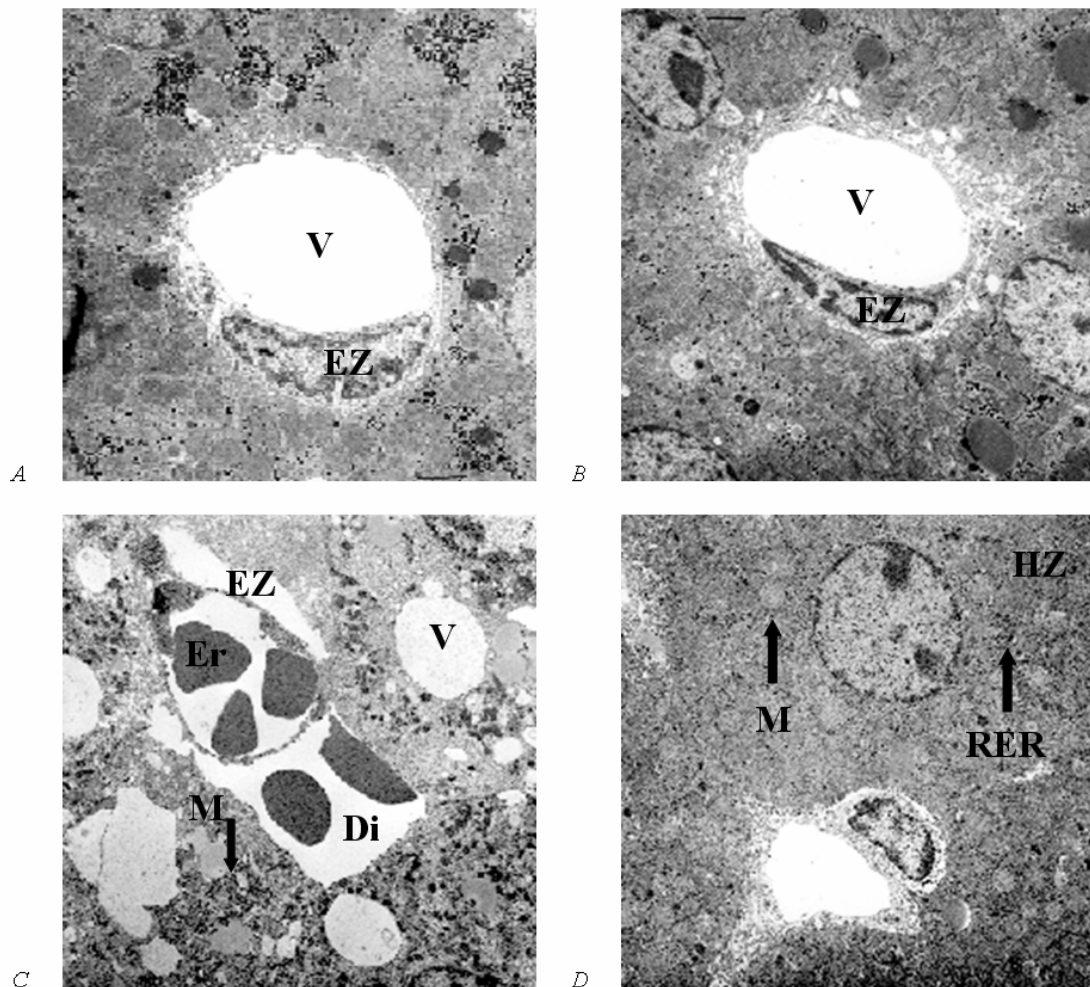


Abb. 16. Elektronenmikroskopische Aufnahmen in 6000-facher Vergrößerung mit normalen Leberzellen, rauem endoplasmatischem Retikulum (RER), intakten Mitochondrien (M) und gespeichertem Glycogen bei sham-operierten Tieren (A), sowie nach Hypothermie von 4°C (B) und 26°C (D). Nach normothermer Ischämie (C) zeigt sich ein desintegriertes Parenchym, große Vakuolen und ausgetretene Erythrozyten (Er) in den Disse'schen Raum (Di). Die Cristae der Mitochondrien sind nicht erkennbar.

6 Diskussion

6.1 Material und Methoden

6.1.1 Modell

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Organtemperaturen während einer Ischämie auf das Ausmaß des mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionsschadens der Leber stand bisher kein geeignetes Modell zur Verfügung. Die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation nach isolierter reversibler Lobärischämie ist ein etabliertes Verfahren und in der Literatur mehrfach beschrieben^{7;61;82}. Um aber eine hypotherme Ischämie von bis zu 4°C zu erreichen, sind bislang nur Transplantationsmodelle mit hypothermer Konservierung, mit isolierter Perfusion oder *in vitro* Versuche beschrieben^{35;41;54}. Transplantationsmodelle haben den entscheidenden Nachteil der besonders an Mäusen anspruchsvollen Operationstechnik. Bei Gefäßanastomosen derart kleiner Gefäße beeinflussen Operationstrauma, etwaige Anastomoseninsuffizienzen- bzw. Stenosen oder auftretenden Thrombosen nicht unerheblich die Ausprägung des Ischämie-Reperfusionsschadens. Da die Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens durch komplexe Interaktion verschiedenster Systeme und Mechanismen charakterisiert ist, welche von einem intakten Gesamtorganismus abhängig sind, ist ein Tiermodell besser geeignet als beispielsweise die Untersuchung mittels Zellkulturen. Das Versuchsprotokoll wurde mit einer 90-minütigen Ischämie, anschließender 240-minütigen Reperfusion und Messzeitpunkten nach 30, 120 und 240 min so festgelegt, dass die Ergebnisse mit vielen bislang publizierten Studien vergleichbar sind.^{60;74;75}

6.1.1.1 Chirurgische Präparation

Das operative Verfahren und die reversible hepatische Ischämie mit anschließender intravitalmikroskopischer Untersuchung stellt ein in der Literatur vielfach beschriebenes Verfahren dar, welches eine komplikationsarme Möglichkeit zur Analyse der Lebermikrozirkulation bietet. Vergleiche von sham-operierten Tieren mit Versuchstieren einer Kontrollgruppe ohne Wartezeit und Anlage eines Gefäßclips haben gezeigt, dass keiner der erhobenen Parameter durch mögliche operative Einflüsse verändert wurde. Obwohl das Abdomen während der vierstündigen Reperfusionphase eröffnet blieb, zeigte sich keine gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Etwaige Flüssigkeitsverluste wurden durch Bedecken des ausgelagerten Darmes mit Cellophanfolie minimiert und mittels kontinuierlicher Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (0,2 ml/h/g Körpergewicht) substituiert.

6.1.1.2 Einstellen der Organtemperatur

Das Tiermodell sollte eine genaue Temperierung des ischämischen Organs ermöglichen, ohne eine Veränderung der anderen Parameter hinnehmen zu müssen. Durch die Temperierung der Spüllösung auf jeweils maximal 1,5°C oberhalb bzw. unterhalb der erwünschten Organtemperatur konnte der Leberlappen innerhalb weniger Sekunden genau ($\pm 0,2^\circ\text{C}$) auf jede beliebige Temperatur zwischen 4°C und 37°C eingestellt werden. Nach anschließender Reperfusion waren intravitalmikroskopische Aufnahmen der Mikrozirkulation problemlos möglich. Bei den Körperkerntemperaturen fanden sich auch zwischen der 4°C und der 37°C Versuchsgruppe keine signifikanten Unterschiede. Damit ist es uns gelungen, ein *in vivo* Modell zu etablieren, welches die Analyse des

Einflusses verschiedener Ischämietemperaturen auf die hepatische Mikrozirkulation der Maus ermöglicht.

6.1.1.3 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie ist ein schon seit vielen Jahren und auch an vielen anderen Organen etabliertes Verfahren zur Visualisierung und quantitativer Analyse lebender Zellen und ihrer Wechselwirkung in der Mikrozirkulation^{2;28;39;42;46;51}. Sie ermöglicht die Darstellung selektiv markierter Blutbestandteile wie etwa Leukozyten und Blutplasma durch die Verwendung spezieller Filtersätze und Farbstoffe. Durch eine computerunterstützte, quantitative *ex vivo* Auswertung konnten die intravitalmikroskopischen Untersuchungszeiträume maximal kurz gehalten werden und damit ein etwaiger phototoxischer Effekt auf ein Minimum reduziert werden^{58;67}. Auch der Vergleich mit den Kontrolltieren hat ergeben, dass weder der operative Eingriff noch die verwendeten Fluoreszenzmarker oder die intravitalmikroskopischen Messungen einen entscheidenden Einfluss auf den mikrovaskulären Reperfusionsschaden ausüben.

6.1.1.4 Leberenzyme

Als Maß für einen hepatozellulären Schaden wurde im Anschluss an die intravitalmikroskopischen Messungen Blut zur Untersuchung der Lebertransaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) und Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) entnommen. Die Aspartat-Aminotransferase findet sich in relativ hoher Konzentration in Leber, aber auch in Myokard und Skelettmuskel. Während die Aspartat-Aminotransferase damit kein leberspezifisches Enzym ist, können Aktivitätsanstiege der Alanin-Aminotransferase als weitgehend spezifisch für Leberzellschäden angesehen

werden. Etwaige extrahepatische Ursachen für einen Anstieg der ALT/GPT-Aktivität sind in den meisten Fällen durch eine sekundäre Mitbeteiligung der Leber bedingt. Da die AST/GOT-Aktivität zu etwa 20% im Zytoplasma und zu 80% in den Mitochondrien, die ALT/GPT zu fast 100% im Zytoplasma lokalisiert ist, lässt sich durch die Bestimmung beider Aktivitäten eine Aussage über die Schwere des Leberzellschadens machen ¹⁰.

6.1.1.5 Apoptose

Jüngste Veröffentlichungen haben gezeigt, dass neben den nekrotischen Zellschäden nach Ischämie-Reperfusion auch die Apoptose eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschaden zu spielen scheint ^{12;23;53;57}. Während eine Freisetzung der intrazellulären Enzyme ALT/GOT und AST/GPT eher für einen nekrotischen Zellschaden nach einer entzündlichen Reaktion spricht, sprechen DNA-Fragmentierung und Caspase-3-Erhöhung für einen apoptotischen Zelltod. Die Markierung freier 3`OH-Enden mittels TUNEL-Färbung zur Identifizierung von DNA-Fragmenten ist alleine kein spezifischer Marker für den programmierten Zelltod, da es beispielsweise in späten Phasen der Nekrose ebenfalls zu DNA-Strangbrüchen und somit zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Durch die Kombination der Ergebnisse der TUNEL-Analyse mit einer Aktivitätssteigerung der hochspezifischen Caspase-3, welche eine entscheidende Rolle bei Endstrecke des regulierten Zelltodes spielt, lässt sich die Aussagekraft über eine abgelaufene Apoptose bekräftigen ⁵⁰.

6.2 Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber

In der Chirurgie der Leber spielen Organschäden, welche durch Ischämie und anschließende Reperfusion induziert werden, eine herausragende Rolle. Besondere klinische Bedeutung hat dies insbesondere in der Transplantationsmedizin, bei der eine vollständige Ischämie und damit ein zeitlich begrenzter Verlust der nutritiven Versorgung unvermeidbar sind. Auch in der Tumorchirurgie wird bei Leber-Teilresektionen durch Abklemmen des Ligamentum hepatoduodenale, dem so genannten Pringle-Manöver, die Blutzufuhr zur Leber reversibel und vollständig unterbrochen. Je nach Länge der Ischämie und der Temperatur des ischämischen Organs kommt es bei anschließender Reperfusion zu dem so genannten Reperfusionsschaden. Das primäre Target des Ischämie-Reperfusionsschaden stellt die Mikrozirkulation dar. Der Schaden ist durch ein sinusoidales Perfusionsversagen, eine gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, eine Beeinträchtigung der hepatozellulären Funktion und Integrität gekennzeichnet und kann ein funktionelles Leberversagen verursachen ⁶⁹. Zu diesen pathophysiologischen Vorgängen haben jüngste Veröffentlichungen gezeigt, dass auch die Apoptose eine entscheidende Rolle bei dem Zelltod nach Ischämie und Reperfusion zu spielen scheint ^{57;73}. Sowohl die Dauer der Ischämie als auch die Organtemperatur während der Ischämie haben einen nicht unerheblichen Einfluss auf das Ausmaß des mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionsschadens. Es wird versucht, die Ischämiedauer auf ein Minimum zu reduzieren, aber sowohl bei Transplantationen als auch bei Einsatz des Pringle-Manövers ist die Zeitdauer häufig nicht weiter reduzierbar. Im Gegensatz dazu lässt sich aber die Organtemperatur, insbesondere bei Organtransplantationen, beliebig einstellen. Eine gezielte Hypothermie des

ischämischen Organs während der Ischämie ist daher eine anerkannte Methode zur Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens^{30;31;35;66;70}. Es konnte vielfach demonstriert werden, dass eine Hypothermie während der Ischämie einen protektiven Einfluss ausüben kann^{9;26}. Eine systematische Analyse zu dem Einfluss verschiedener Organtemperaturen auf den hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden stand aber bisher aus.

6.3 Diskussion der Ergebnisse

6.3.1 Etablierung eines Tiermodells

Es ist gelungen, ein Tiermodell zu entwickeln, dass die zuvor gestellten Anforderungen erfüllt. Die Etablierungsversuche ergaben, dass mit Ausnahme der Organtemperatur, bei allen Versuchsgruppen gleiche Bedingungen herrschten. Als Voraussetzung für eine aussagekräftige Beurteilung der Mikrozirkulation betrug der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) zwischen 84-86 mmHg nach 30 min und 74-79 mmHg nach 240 min Reperfusion. Zwischen den Temperaturgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Bei Betrachtung der Temperaturen war es problemlos möglich den jeweiligen Leberlappen auf eine gewünschte Temperatur zwischen 4°C und 37°C einzustellen, ohne dass die Körpertemperaturen zwischen den verschiedenen Gruppen signifikante Unterschiede aufwiesen. Intramediastinal gemessen betragen sie zwischen 30°C und 31°C, was rektal gemessenen Werten von 35°C bis 37°C entspricht. Vorversuche haben ergeben, dass die Temperatur der Superfusionslösung direkt vor Auftreffen auf das Organ maximal 1,5°C über oder unter der Zieltemperatur betrug. Damit konnte bei allen Versuchsgruppen sowohl ein Überhitzen als auch ein Unterkühlen der Leberoberfläche ausgeschlossen werden. Die Blutzufuhr des linken Leberlappens konnte mittels Gefäßclips reversibel und vollständig

unterbrochen werden und der Leberlappen anschließend ohne Beeinträchtigung reperfundiert werden. Die vollständige Unterbrechung des arteriellen Zuflusses wurde in einigen Vorversuchen intravitalmikroskopisch überprüft. Das Intravitalmikroskop zeigte eine vollständige Stase in den Sinusoiden des ischämischen Leberlappens. Etwaige venöse Abflüsse wurden durch die intravitalmikroskopische Darstellung des Darmes nach Applikation eines Fluoreszenzmarkers in den ischämischen Leberlappen ausgeschlossen. Auch eine Stunde nach Ischämie und Applikation des Fluoreszenzmarkers war keine Signalverstärkung im Darmgewebe mittels Intravitalmikroskop zu verzeichnen, was als ein Hinweis für einen venösen Abfluss zu werten wäre. Vergleiche einer zusätzlichen Kontrollgruppe ohne jegliche Manipulation am Gefäß-Nerven-Bündel mit den sham-operierten Tieren demonstrierten, dass durch das kurze Setzen des Gefäßclips keine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation induziert wurde. Übereinstimmend mit vorhergegangenen Publikationen haben die ersten Ergebnisse gezeigt, dass sich nach 90-minütiger normothermer Ischämie ein ausgeprägter Ischämie-Reperfusionsschaden ausbildet ^{60;75;82} und dass eine Hypothermie von 4°C protektiv wirkt. Nach normothermer Ischämie kam es zu einer signifikanten Reduktion der sinusoidalen Perfusionsrate. Darüber hinaus ergaben sich ein massiver Anstieg der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und eine verstärkte Freisetzung der Leberenzyme GOT/GPT. Eine Hypothermie von 4°C bewirkte sowohl auf die mikrozirkulatorischen Parameter als auch auf die Enzymfreisetzung eine signifikante Reduktion. Diese Ergebnisse der Modelletablierung demonstrieren, dass sowohl der Versuchsaufbau als auch das Versuchsprotokoll eine systematische Analyse zur Klärung der Fragestellung erlauben.

6.3.2 Analyse moderater Ischämietemperaturen

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, den Einfluss verschiedener Organtemperaturen während der Ischämie auf das Ausmaß des mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber in einem Mäusemodell systematisch und *in vivo* zu analysieren. Nach der Modelletablierung mit nur zwei Ischämietemperaturen wurde im zweiten Teil der Arbeit der Einfluss moderater Hypothermie untersucht. Bei Betrachtung der Mikrozirkulation war bei den sham-operierten Tieren weder eine Beeinträchtigung der Perfusionsrate noch eine gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu erkennen. Die sinusoidale Perfusionsrate betrug 30 min nach Reperfusion noch $93\pm 1\%$. Nach 240 min betrug sie noch $84\pm 2\%$ und diese Ergebnisse korrelierten sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen^{13:69}. In den Versuchen zeigte sich nach normothermer Ischämie bereits 30 min nach Reperfusion eine Abnahme der Perfusionsrate um 15% und 240 min nach Reperfusion sogar um 34%, verglichen mit den scheinoperierten Tieren. Diese Beeinträchtigung der Mikrozirkulation nach normothermer Ischämie ging mit einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion einher. Sowohl die Anzahl rollender als auch die Anzahl permanent adhärenter Leukozyten stieg beinahe um das 40-fache des Ausgangswertes. Erstaunlicherweise ließen sich bei all diesen Parametern die Veränderungen bereits durch eine milde Hypothermie von 26°C nahezu vollständig verhindern. Auch die Aktivitäten der Leberenzyme AST/GOT und ALT/GPT zeigten eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit. Nach normothermer Ischämie zeigte sich ein 10-facher Anstieg der Enzymaktivitäten, wiederum verglichen mit den Ergebnissen der sham-operierten Tiere. Dieser Anstieg ließ sich bereits durch eine milde Hypothermie von 26°C verhindern. Der protektive Effekt einer milden Hypothermie wurde schon mehrfach beschrieben^{29:80}, interessanterweise bewirkte

aber in unserem Modell eine starke Abkühlung der Organe auf 4°C, nahezu den gleichen protektiven Effekt wie eine milde Hypothermie. Es zeigten sich außerdem keine Hinweise auf einen durch Kälte induzierten zusätzlichen Schaden. Entgegen der Erwartung sprechen diese Ergebnisse gegen einen linearen Zusammenhang zwischen Ischämietemperatur und dem Ausmaß des mikrovaskulären Schadens. In weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte diese nicht-lineare Temperaturabhängigkeit weiter untermauert werden. Untersuchungen zum Einfluss der Ischämietemperatur auf den postischämischen oxidativen Stress im Lebergewebe ergaben vergleichbare Ergebnisse. Bei Verwendung des hier etablierten Tiermodells konnte bereits durch die milde Hypothermie von 32°C eine signifikante Reduktion der postischämischen Lipidperoxidation und mRNA-Expression der antioxidativen Enzyme SOD-1 und HO-1 aufgezeigt werden³³. Zu den oben beschriebenen Schädigungsparametern nach Ischämie und Reperfusion erlangt der programmierte Zelltod mehr und mehr an Bedeutung. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben Hinweise dafür beschrieben, dass neben den klassischen hyperinflammatorischen Ereignissen, bei denen ein nekrotischer Zelltod in Vordergrund zu stehen scheint, auch die Apoptose ein Teil des Schädigungsmusters darstellt^{12;23;53;59}. Die Markierung von freien 3'-OH-Enden mittels TUNEL-Färbung alleine beschreibt lediglich das Vorliegen von DNA-Strangbrüchen im Zellkern, ohne spezifisch für eine abgelaufene Apoptose zu sein⁵⁵. Es können beispielsweise falsch positive Ergebnisse durch das Auftreten von DNA-Strangbrüchen in späten Phasen der Nekrose auftreten. Andererseits können fehlende oder inkomplette Strangbrüche oder aber eine sterische Hinderung der Transferase, beispielsweise durch Komponenten der extrazellulären Matrix, zu falsch negativen Ergebnissen führen. In Kombination

jedoch mit der photometrischen Messung der sehr spezifischen Caspase-3, weisen die Ergebnisse stark auf einen abgelaufenen programmierten Zelltod hin ⁴⁹. Während sich bei allen hypothermen Versuchsgruppen, einschließlich der sham-operierten Versuchstiere, keine Hinweise auf Apoptose 240 min nach Reperfusion ergaben, zeigte sich nach normothermer Ischämie und Reperfusion ein massiver Anstieg beider Parameter. Nahezu 17% der Zellen wiesen TUNEL-positive DNA-Strangbrüche auf, während bereits die Abkühlung des Organs auf 31,5°C während der Ischämie die Anzahl TUNEL-positiver Zellen auf unter 1% senkte. Vergleichbar mit den Ergebnissen der TUNEL-Analyse verhielten sich auch die Aktivitäten der Caspase-3. Auch bei diesem für Apoptose hochspezifischen Parameter zeigte sich ein massiver Anstieg nach normothermer Ischämie, welcher sich bereits durch milde Hypothermie von 31,5°C vollständig verhindern ließ. Übereinstimmend mit den mikrozirkulatorischen Ergebnissen gab es auch bei den Apoptoseparametern keine Hinweise auf einen durch Kälte induzierten Schaden. Bei Betrachtung der Ergebnisse der TUNEL-Analyse und der Caspase-3-Aktivität zeigten sich auch nach Kühlung auf 4°C keine Hinweise auf eine durch Kälte induzierte Apoptose. Beide Parameter lagen auf dem Niveau der sham-operierten Tiere. Sicherlich kann man die Ergebnisse dieses Versuchsprotokoll auch nur bedingt mit den in der Literatur beschriebenen vergleichen. Die Arbeitsgruppe von Rauen et al, beschreibt eine kälteinduzierte Apoptose von Hepatozyten und Leberendothelzellen durch eine Kühlung auf 4°C, allerdings in Zellkulturen und nach einer hypothermen Phase von 24 h Dauer ⁵⁶. Zur weiteren Überprüfung einer etwaigen zusätzlichen Organschädigung durch die starke Abkühlung müssten die Versuchsprotokolle auch sicherlich auf längere Ischämiezeiten ausgeweitet werden. Diese wären auch nötig um eine stärkere klinische Relevanz herzustellen, bei denen die Zeiten für kalte Ischämie, beispielsweise bei

Organtransplantationen, bei etwa 12 h bis 15 h liegen³. Die Frage, ob es sich bei der Zellschädigung nach Ischämie-Reperfusion um nekrotischen oder apoptotischen Zelltod handelt ist Gegenstand aktueller, kontroverser Diskussionen^{12;31;32}. Der nekrotische Zelltod beginnt meistens mit der Unfähigkeit der Zelle, die Homöostase aufrechtzuerhalten. Durch eine Schädigung der Zellmembran kommt es zu einem Einstrom von Gewebsflüssigkeit und extrazellulären Ionen in das Zellinnere. Dieses führt zu einem Anschwellen der Zelle, einer anschließenden Ruptur der Zellmembran und dadurch zu einem Austritt von zytoplasmatischen Bestandteilen, wie auch den Leberenzymen. Ein weiteres Charakteristikum für nekrotischen Zelltod ist die ablaufende Entzündungsreaktion. Im Gegensatz dazu ist die apoptotische Zelle durch morphologische Veränderungen ohne begleitende Entzündungsreaktion charakterisiert. Es kommt zu einer Kernschrumpfung mit Chromatinkondensation am Kernrand, einer Zellschrumpfung mit Zytoskelettdegeneration und -reorganisation und zu der Bildung von sogenannten "membrane blebs", oder "apoptotic bodies". Es handelt sich dabei um Zytosolreste, welche von einer noch weitgehend intakten Zellmembran umgeben sind. Diese apoptotischen Körperchen werden dann von Makrophagen und Epithelzellen phagozytiert. Diese Vorgänge laufen weitgehend ohne Aktivierung von Entzündungsreaktionen ab^{14;38}. Eines der Hauptmerkmale stellt aber die enzymatische DNA-Fragmentierung in Bruchstücke der Größe von 180 bis 200 Basenpaaren dar. Zu diesen klassischen Kriterien kann es allerdings auch in späten Phasen der Nekrose zu DNA-Strangbrüchen kommen. Demgegenüber kann es aber wiederum auch in späten Phasen der Apoptose, durch ein Lysieren der Apoptosekörperchen, zu einer Freisetzung intrazellulärer Bestandteile und einer begleitenden entzündlichen Reaktion kommen. In unseren Ergebnissen spricht die Freisetzung der

intrazellulär gelegenen Leberenzyme GOT und GPT und die inflammatorische Reaktion, im Sinne einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, für den klassischen nekrotischen Zelltod nach Ischämie und Reperfusion. Demgegenüber steht der massive Anstieg TUNEL-positiver Zellen in Verbindung mit der sehr apoptosespezifischen Aktivierung der Caspase-3⁵⁰. Diese Ergebnisse sprechen nicht für einen reinen nekrotischen oder apoptotischen Zelltod, sondern für ein gemeinsames, parallel oder hintereinander ablaufendes Geschehen.

7 Schlussfolgerung

Eine systematische Analyse zu dem Einfluss der Organtemperatur auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber stand bislang aus. Mit unserem Modell ist es gelungen, diesen Einfluss systematisch und *in vivo* zu analysieren. Das Modell ermöglicht es, den singulären Einfluss verschiedener Organtemperaturen, bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen, selektiv zu untersuchen. Interessanterweise zeigte sich sowohl bei den klassischen Schadensparametern des Ischämie-Reperfusionsschadens als auch bei den Apoptosemarkern zwar eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit, jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen Ausprägung der Hypothermie und Ausmaß des protektiven Effekts. Bereits eine milde Hypothermie von 26°C bewirkte nahezu den gleichen protektiven Effekt wie die maximale Abkühlung des ischämischen Organs auf 4°C. Darüber hinaus ergaben sich auch keine Hinweise auf Organschädigung durch eine starke Hypothermie. Bei der Betrachtung der Art des Zelltodes nach Ischämie und Reperfusion zeigten sowohl Nekrose- als auch Apoptoseparameter eine ausgeprägte und vergleichbare Temperaturabhängigkeit.

8 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der Organtemperatur während der Ischämie auf den mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionsschaden systematisch zu analysieren. Um dies zu ermöglichen wurde im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit ein geeignetes Tiermodell etabliert. Das entwickelte Modell ermöglichte eine reversible *in situ* Ischämie mit anschließender Reperfusion des linken Leberlappens der Maus. Während der Ischämie konnte der ischämische Leberlappen genau auf die gewünschte Temperatur eingestellt und konstant gehalten werden. Abgesehen von der unterschiedlich eingestellten Organtemperatur, herrschten bei allen Versuchsgruppen gleiche Bedingungen. Weder bei der Körperkerntemperatur noch bei dem mittleren arteriellen Blutdruck gab es signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Nach darauffolgender Reperfusion ermöglichte das Modell eine intravitalmikroskopische Analyse der Mikrozirkulation und anschließende *ex vivo* Messungen vieler Schadensparameter. Damit ist es gelungen, ein geeignetes Tiermodell zur systematischen *in vivo* Analyse des singulären Einflusses verschiedener Organtemperaturen auf den hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden der Maus, zu etablieren. Die Ergebnisse wiesen, in Übereinstimmung mit der Literatur, einen ausgeprägten Ischämie-Reperfusionsschaden nach normothermer Ischämie auf. Dabei war die sinusoidale Perfusionsrate signifikant reduziert, es trat eine deutliche Zunahme der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auf und es folgte eine massive Freisetzung der Leberenzyme AST/GOT und ALT/GPT. Erstaunlicherweise konnten bereits durch eine milde Hypothermie von 26°C sämtliche Schadensparameter auf das Niveau der Shamgruppe reduziert werden. Entgegen der Erwartung scheint es

keinen linearen Zusammenhang zwischen Organtemperatur und Ausmaß des mikrovaskulären Schadens zu geben. Vergleichbar mit den Ergebnissen der Mikrozirkulation war nach normothermer Ischämie auch eine Vielzahl apoptotischer Zellen zu verzeichnen. Nahezu 17% der Hepatozyten waren TUNEL-positiv und die Aktivität der apoptose-spezifischen Caspase-3 nahm um etwa das vierfache zu. Auch hier bewirkte bereits ein mildes Abkühlen des ischämischen Leberlappens auf 31,5°C eine vollständige Protektion der Leberzellen vor Apoptose. Es zeigte sich damit auch hier kein linearer Zusammenhang zwischen Organtemperatur und Ausmaß einer Apoptoseinduktion. Der Verdacht auf eine durch Kälte induzierte Apoptose konnte sich in diesem Versuchsaufbau nicht erhärten. Nach 90-minütiger Ischämie bei 4°C waren, wie auch in der Shamgruppe, weniger als 1% TUNEL-positive Zellen zu verzeichnen und ein Anstieg der Caspase-3-Aktivität blieb vollständig aus. Bei der Betrachtung, ob es sich bei der Zellschädigung um nekrotischen oder um apoptotischen Zelltod handelt, ergaben die verwendeten Messmethoden deutliche Hinweise für beide Arten des Zelltodes.

9 Referenzen

1. Adams DH, Shaw S: Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1994; 343: 831-6
2. Beck J, Stummer W, Lehmborg J, Baethmann A, Uhl E: Leukocyte-endothelium interactions in global cerebral ischemia. *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 1997; 70:53-5.: 53-5
3. Belzer FO, Southard JH: Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-6
4. Bilzer M, Gerbes AL: Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J.Hepatol.* 2000; 32: 508-15
5. Bilzer M, Lauterburg BH: Oxidant stress and potentiation of ischemia/reperfusion injury to the perfused rat liver by human polymorphonuclear leukocytes. *J.Hepatol.* 1994; 20: 473-7
6. Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C: Mild hypothermia induces apoptosis in rat testis at specific stages of the seminiferous epithelium. *J.Androl* 1997; 18: 535-9
7. Brown MF, Zibari G, Burney D, Granger DN, McDonald JC: Hepatic ischemia/reperfusion affects leukocyte rolling and velocity. *Clin.Transplant.* 1997; 11: 511-5
8. Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-101

9. Choi S, Noh J, Hirose R, Ferrell L, Bedolli M, Roberts JP, Niemann CU: Mild hypothermia provides significant protection against ischemia/reperfusion injury in livers of obese and lean rats. *Ann.Surg.* 2005; 241: 470-6
10. Clary JJ, Groth DH, Stokinger HE: Comparative changes in serum enzyme levels in beryllium- or carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 1973; 143: 1207-10
11. Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 1992; 53: 957-78
12. Clavien PA, Rudiger HA, Selzner M: Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. *Hepatology* 2001; 33: 1555-7
13. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX: Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997; 8: 80-5
14. Cohen JJ: Apoptosis. *Immunol.Today* 1993; 14: 126-30
15. Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG: Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat--an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 1992; 54: 199-204
16. Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Anthony TJ, Eckhoff DE: Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery.* 2004; 136: 390-400

17. Czaja MJ: Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Antioxid.Redox.Signal.* 2002; 4: 759-67
18. Decker K: Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur.J.Biochem.* 1990; 192: 245-61
19. Ding WX, Yin XM: Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J.Cell Mol.Med.* 2004; 8: 445-54
20. Engerson TD, McKelvey TG, Rhyne DB, Boggio EB, Snyder SJ, Jones HP: Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J.Clin.Invest* 1987; 79: 1564-70
21. Fridovich I: Superoxide dismutases. *Annu.Rev.Biochem.* 1975; 44:147-59.: 147-59
22. Fu T, Blei AT, Takamura N, Lin T, Guo D, Li H, O'Gorman MR, Soriano HE: Hypothermia inhibits Fas-mediated apoptosis of primary mouse hepatocytes in culture. *Cell Transplant.* 2004; 13: 667-76
23. Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA: Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 1652-60
24. Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmerman GA, McEver RP: Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* 1990; 343: 757-60

25. Hamer I, Wattiaux R, Wattiaux-De Coninck S: Deleterious effects of xanthine oxidase on rat liver endothelial cells after ischemia/reperfusion. *Biochim.Biophys.Acta* 1995; 1269: 145-52
26. Heijnen BH, Straatsburg IH, Gouma DJ, van Gulik TM: Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs. *Surgery*. 2003; 134: 806-17
27. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN: Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am.J.Physiol* 1987; 253: H699-H703
28. Hoffmann TF, Leiderer R, Harris AG, Messmer K: Ischemia and reperfusion in pancreas. *Microsc.Res.Tech*. 1997; 37: 557-71
29. Imakita M, Yamanaka N, Kuroda N, Kitayama Y, Okamoto E: Does topical cooling alleviate ischemia/reperfusion injury during inflow occlusion in hepatectomy? Results of an experimental and clinical study. *Surg.Today* 2000; 30: 795-804
30. Imamura H, Brault A, Huet PM: Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* 1997; 25: 664-71
31. Jaeschke H: Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J.Hepatol*. 1996; 25: 774-80
32. Jaeschke H, Lemasters JJ: Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*. 2003; 125: 1246-57

33. 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: 901-9
34. Kishimoto TK, Rothlein R: Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Adv.Pharmacol.* 1994; 25:117-69.: 117-69
35. Kondo T, Terajima H, Todoroki T, Hirano T, Ito Y, Usia T, Messmer K: Prevention of hepatic ischemia-reperfusion injury by SOD-DIVEMA conjugate. *J.Surg.Res.* 1999; 85: 26-36
36. Kondo T, Todoroki T, Hirano T, Schildberg FW, Messmer K: Impact of ischemia-reperfusion injury on dimensional changes of hepatic microvessels. *Res.Exp.Med.(Berl)* 1998; 198: 63-72
37. Koo A, Komatsu H, Tao G, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N: Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 1992; 15: 507-14
38. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B: The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 1995; 9: 1277-87
39. Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE: Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J.Appl.Physiol* 1994; 76: 65-71
40. Lentsch AB: Activation and function of hepatocyte NF-kappaB in postischemic liver injury. *Hepatology.* 2005; 42: 216-8

41. Marzi I, Knee J, Menger MD, Harbauer G, Buhren V: Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model. *Transplantation* 1991; 52: 432-6
42. 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: 507-15
43. Massberg S, Messmer K: The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant.Proc.* 1998; 30: 4217-23
44. May MJ, Ghosh S: Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol.Today* 1998; 19: 80-8
45. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K: Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am.J.Physiol* 1992; 263: H1901-H1906
46. Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B: Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 1999; 46 Suppl 2:1452-7.: 1452-7
47. Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K: Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res.Exp.Med.(Berl)* 1988; 188: 151-65
48. Mueller TH, Kienle K, Beham A, Geissler EK, Jauch KW, Rentsch M: Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after

- ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation*. 2004; 78: 1267-73
49. Nagata S, Golstein P: The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-56
50. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ: Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 1999; 68: 89-96
51. Nolte D, Hecht R, Schmid P, Botzlar A, Menger MD, Neumueller C, Sinowatz F, Vestweber D, Messmer K: Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. *Am.J.Physiol* 1994; 267: H1320-H1328
52. Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K: Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* 1995; 86: 4417-21
53. Patel T, Gores GJ: Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995; 21: 1725-41
54. Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD: Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology* 1993; 18: 1490-7
55. Prigent P, Blanpied C, Aten J, Hirsch F: A safe and rapid method for analyzing apoptosis-induced fragmentation of DNA extracted from tissues or cultured cells. *J.Immunol.Methods* 1993; 160: 139-40

56. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H: Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 1999; 13: 155-68
57. Rudiger HA, Graf R, Clavien PA: Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J.Invest Surg.* 2003; 16: 149-59
58. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF: Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J.Histochem.Cytochem.* 1997; 45: 505-13
59. Sasaki H, Matsuno T, Ishikawa T, Ishine N, Sadamori H, Yagi T, Tanaka N: Activation of apoptosis during early phase of reperfusion after liver transplantation. *Transplant.Proc.* 1997; 29: 406-7
60. Sawaya DE, Jr., Zibari GB, Minardi A, Bilton B, Burney D, Granger DN, McDonald JC, Brown M: P-selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *Shock* 1999; 12: 227-32
61. Schlossberg H, Zhang Y, Dudus L, Engelhardt JF: Expression of c-fos and c-jun during hepatocellular remodeling following ischemia/reperfusion in mouse liver. *Hepatology* 1996; 23: 1546-55
62. Schraufstatter IU, Browne K, Harris A, Hyslop PA, Jackson JH, Quehenberger O, Cochrane CG: Mechanisms of hypochlorite injury of target cells. *J.Clin.Invest* 1990; 85: 554-62

63. Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA: Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alpha/IL-6-dependent mechanism. *Hepatology* 2002; 36: 812-8
64. 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: 183-91
65. Soloff BL, Nagle WA, Moss AJ, Jr., Henle KJ, Crawford JT: Apoptosis induced by cold shock in vitro is dependent on cell growth phase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1987; 145: 876-83
66. Stefanutti G, Pierro A, Vinardi S, Spitz L, Eaton S: Moderate hypothermia protects against systemic oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock*. 2005; 24: 159-64
67. Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K: Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch.Surg.* 2000; 385: 290-8
68. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62
69. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD: Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am.J.Pathol.* 1994; 145: 1421-31
70. Wang CY, Ni Y, Liu Y, Huang ZH, Zhang MJ, Zhan YQ, Gao HB: Mild hypothermia protects liver against ischemia and reperfusion injury. *World J.Gastroenterol.* 2005; 11: 3005-7

71. 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: 34-40
72. Wanner GA, Mica L, Wanner-Schmid E, Kolb SA, Hentze H, Trentz O, Ertel W: Inhibition of caspase activity prevents CD95-mediated hepatic microvascular perfusion failure and restores Kupffer cell clearance capacity. *FASEB J.* 1999; 13: 1239-48
73. Xu WH, Ye QF, Xia SS: Apoptosis and proliferation of intrahepatic bile duct after ischemia-reperfusion injury. *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.* 2004; 3: 428-32
74. Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA: L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am.J.Physiol* 1998; 275: G1341-G1352
75. 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: 1494-502
76. Yamanaka N, Yamanaka J, Tanaka T, Tanaka W, Yasui C, Ando T, Okamoto E: Topical cooling assisted hepatic resection of segment 7 and 8 oriented by en-bloc interruption of the targeted portal pedicles. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 417-24
77. Yang L, Magness ST, Bataller R, Rippe RA, Brenner DA: NF-kappaB activation in Kupffer cells after partial hepatectomy. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* 2005; 289: G530-G538

78. Yu BP: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74: 139-62
79. Zachariassen KE: Hypothermia and cellular physiology. *Arctic Med.Res.* 1991; 50 Suppl 6:13-7.: 13-7
80. Zar HA, Tanigawa K, Kim YM, Lancaster JR, Jr.: Mild therapeutic hypothermia for postischemic vasoconstriction in the perfused rat liver. *Anesthesiology* 1999; 90: 1103-11
81. Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K: Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 1989; 8: 293-302
82. Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF: Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of IkappaB degradation. *Hepatology* 1998; 28: 1022-30

10 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. h.c. Konrad Messmer, ehemaliger Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung, für die freundliche Aufnahme an sein Institut und die Überlassung der Doktorarbeit. Durch die Integration in sein Institut ermöglichte er mir die Durchführung der Experimente in einer kooperativen und professionellen Atmosphäre und unterstützte meine Arbeit wissenschaftlich und persönlich. Durch seine fachliche Kompetenz und seine herausragenden menschlichen Qualitäten führte er mich an wissenschaftliches Denken heran und gab mir entscheidende Impulse für meine experimentelle Arbeit.

Auch danke ich auch Prof. Dr. med. vet. Fritz Krombach für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Mit Geduld und konstruktiver Kritik lehrte er mir wissenschaftliches Arbeiten und die kritische Interpretation, Diskussion und Präsentation der Ergebnisse. Besonders auch bei der Vorbereitung von Vorträgen oder Kongressbeiträgen unterstützte er mich mit Geduld und wertvoller Hilfe.

Ebenso danke ich sehr herzlich meinem Betreuer, PD Dr. med. Peter Biberthaler für die exzellente Betreuung. Neben der kompetenten Einweisung in die Technik der experimentellen Arbeit stand mir seine Hilfe jederzeit zur Verfügung.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Frau Dr. Dr. Rosmarie Leiderer für die Erstellung und Beurteilung der Elektronenmikroskopie.

Schließlich danke ich allen medizinisch-technischen Assistentinnen für ihr fachkundiges Engagement bei der Erstellung lichtmikroskopischer- und immunhistochemischer Präparate sowie für zahlreiche wertvolle Hinweise und Hilfestellungen.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts, die mit vielen Gesprächen und Anregungen ganz wesentlich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Benjamin Sebastian Luchting
Geburtsdatum: 31. Oktober 1971
Geburtsort: Frankfurt am Main
Eltern: Nani Simonis
Olaf Luchting, Dipl. Ing.

Ausbildung:

1975-1977: Ecole maternelle Nizza, Frankreich
1977-1981: Grundschule Gauting
1981-1994: Mathemat.-naturwiss. Gymnasium München, Abitur 1994
1991-1995: Sportmodedesign Firma *Protective* / Werbeagentur *Sportive*
1994-1995: Ausbildung zum Rettungssanitäter
1994-1995: Zivildienst im Rettungsdienst, Rotes Kreuz Starnberg
seit 1994: Mitglied Katastrophenschutz (SEG) Gauting
1999-2003: Perfusionist, Deutsche Stiftung für Organtransplantationen
2002-2003: Leiter Perfusionsteam, DSO
seit 2004: Fachkundenachweis Rettungsdienst
seit 2006: Intensivtransportdienst (ITW), Arbeiter-Samariter-Bund

Leistungssport:

1989-1995 Profisport mit Teilnahme an Snowboard Europa- und Weltmeisterschaften

Studium:

1995-2002: Studium der Humanmedizin

Technische Universität München
Ludwig-Maximilians-Universität München
Harvard Medical School Boston, USA

Arzt im Praktikum:

2003-2004: Chirurgische Intensivstation, Klinikum der Universität München (Leitung: Prof. Dr. med. Mutschler)

Wissenschaftlicher Mitarbeiter:

seit 2004: Klinik für Anästhesiologie, Klinikum der Universität München (Leitung: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter)

12 Publikationsliste

Originalarbeiten:

1. P. Biberthaler, **B. Luchting**, S. Massberg, D. Teupser, S. Langer, R. Leiderer, F. Krombach, K. Messmer
Ischemia at 4°C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury
Res Exp Med, 200(2): 93-105, 2001
2. P. Biberthaler, **B. Luchting**, S. Massberg, D. Teupser, S. Langer, R. Leiderer, K. Messmer, F. Krombach
The influence of organ temperature on hepatic ischemia reperfusion injury: a systematic analysis
Transplantation, 15, 72(9): 1486-90, 2001
3. P. Biberthaler, S. Langer, **B. Luchting**, A. Khandoga, K. Messmer
In vivo assessment of colon microcirculation: comparison of a new OPS imaging technique with intravital microscopy
Eur J Med Res, 17, (12)6: 525-534, 2001
4. A. Khandoga, P. Biberthaler, G. Enders, D. Teupser, S. Axmann, **B. Luchting**, J. Hutter, K. Messmer, F. Krombach
P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo
Shock, 18(6): 529-35, 2002
5. P. Biberthaler, M. Athelogou, S. Langer, **B. Luchting**, R. Leiderer, K. Messmer
Evaluation of murine liver transmission electron micrographs by an innovative object-based quantitative image analysis system
Eur J Med Res, 31, 8(7): 275-82, 2003
6. A. Khandoga, G. Enders, **B. Luchting**, S. Axmann, T. Minor, U. Nilsson, P. Biberthaler, F. Krombach
Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion
Free Radic Biol & Med, 15, 35(8): 901-9, 2003

Buchbeiträge:

1. P. Biberthaler, **B. Luchting**, S. Langer, F. Krombach, K. Messmer
Systematische Analyse der Temperaturabhängigkeit des mikrovaskulären Ischämie-Reperfusionsschadens der Leber
Chirurgisches Forum 2000
2. A. Khandoga, P. Biberthaler, **B. Luchting**, J. Hutter, F. Krombach, K. Messmer
Platelet-endothelial cell interaction during hepatic ischemia-reperfusion
Chirurgisches Forum 2001

3. A. Khandoga, **B. Luchting**, G. Enders, S. Axmann, P. Biberthaler, F. Krombach
Einfluss der intranschämischen Organtemperatur auf den oxidativen Stress während hepatischer Reperfusion
Chirurgisches Forum 2003

Abstracts:

1. P. Biberthaler, **B. Luchting**, S. Axmann, G. Enders, F. Krombach, K. Messmer
Impact of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: analysis of microcirculation and apoptosis induction
Falk Symposium Hepatology 2000, 117, A S. 110, 2000

2. P. Biberthaler, S. Massberg, **B. Luchting**, F. Krombach, K. Messmer
Effects of organ temperature on postischemic mouse hepatic microcirculation
Eur Surg Res 2000, 32: 49-64, 2000

3. A. Khandoga, P. Biberthaler, **B. Luchting**, J. Hutter, F. Krombach, K. Messmer
Platelet-endothelial cell interaction during hepatic ischemia-reperfusion
J Vasc Res 37, S1, 51, 2000

4. **B. Luchting**, S. Axmann, G. Enders, P. Biberthaler, K. Messmer, F. Krombach
Influence of organ temperature on induction of apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion
J Vasc Res 37, S1, 51, 2000

5. A. Khandoga, P. Biberthaler, **B. Luchting**, J. Hutter, F. Krombach, K. Messmer
Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion nach hepatischer Ischämie/Reperfusion
77. Tagung der Vereinigung Bayrischer Chirurgen, Regensburg, Kongressband, Juli 2000

6. A. Khandoga, P. Biberthaler, **B. Luchting**, J. Hutter, F. Krombach, K. Messmer
Platelet-endothelial cell interaction during hepatic ischemia-reperfusion
Research Festival 2000, Klinikum der LMU München, S. 196, 2000

7. A. Khandoga, P. Biberthaler, **B. Luchting**, J. Hutter, K. Messmer, F. Krombach
P-Selectin deficiency attenuates platelet-endothelial cell interaction and organ injury after hepatic ischemia-reperfusion
J Vasc Res 38: 508, 2001

8. P. Biberthaler, **B. Luchting**, R. Leiderer, D. Teupser, S. Langer, F. Krombach, K. Messmer
Impact of Ischemic Temperature on Hepatic Microvascular Ischemia-Reperfusion Injury in the Mouse
Eur Surg Res 33: 47-55, 2001

9. A. Khandoga, P. Biberthaler, **B. Luchting**, K. Messmer, F. Krombach
Impact of organ temperature on postischemic platelet-endothelial cell interactions in the hepatic microcirculation
Langenbeck's Arch Surg 386: 464-465, 2001

10. A. Khandoga, S. Axmann, **B. Luchting**, C. Csapo, P. Biberthaler, F. Krombach
Influence of ischemic temperature on hydroxyl radical production during hepatic reperfusion
J Vasc Res 39: 34, 2002

11. A. Khandoga, G. Enders, **B. Luchting**, S. Axmann, P. Biberthaler, F. Krombach
Mild intraischemic hypothermia attenuates oxidative stress in liver tissue during hepatic reperfusion
Eur Surg Res 35: 222, 2003

Poster Präsentationen:

1. P. Biberthaler, **B. Luchting**, S. Axmann, G. Enders, F. Krombach, K. Messmer
Impact of organ temperature on hepatic ischemia-reperfusion injury: analysis of microcirculation and apoptosis induction
Symposium Hepatology 2000, Klinikum der LMU München, München, 2000

2. A. Khandoga, P. Biberthaler, **B. Luchting**, J. Hutter, F. Krombach, K. Messmer
Platelet-endothelial cell interaction during hepatic ischemia-reperfusion
21st European Conference on Microcirculation, Stockholm, Schweden, Juni 2000

3. **B. Luchting**, S. Axmann, G. Enders, P. Biberthaler, K. Messmer, F. Krombach
Influence of organ temperature on induction of apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion
21st European Conference on Microcirculation, Stockholm, Schweden, Juni 2000

4. A. Khandoga, P. Biberthaler, **B. Luchting**, J. Hutter, F. Krombach, K. Messmer
Platelet-endothelial cell interaction during hepatic ischemia-reperfusion
Research Festival 2000, Klinikum der LMU München, München, 2000

5. P. Biberthaler, A. Khandoga, **B. Luchting**, S. Langer, K. Messmer
In vivo assessment of colon microcirculation comparison of a new orthogonal polarization spectral (OPS) imaging (CytoscanTM A/R) technique with intravital microscopy
7th World Congress for Microcirculation, Sydney, Australien, August 2001

6. P. Biberthaler, **B. Luchting**, A. Khandoga, D. Teupser, S. Langer, K. Messmer, F. Krombach
Impact of ischemic temperature on hepatic microvascular ischemia/reperfusion injury
7th World Congress for Microcirculation, Sydney, Australien, August 2001

7. A. Khandoga, S. Axmann, **B. Luchting**, C. Csapo, P. Biberthaler, F. Krombach
Influence of ischemic temperature on hydroxyl radical production during hepatic reperfusion
22nd European Conference on Microcirculation and Vascular Biology, Exeter, UK, 2002

8. A. Khandoga, G. Enders, **B. Luchting**, S. Axmann, P. Biberthaler, F. Krombach
Mild intraischemic hypothermia attenuates oxidative stress in liver tissue during hepatic reperfusion
38th Congress of the European Society for Surgical Research, Ghent, Belgien, Mai 2003

Awards:

1. Vortragspreis

Wissenschaftliches Symposium „Research in Surgery“ Chirurgische Forschung der Universitätsklinik Freiburg, November 1999

2. Lars-Erik Gelin Award

European Society for Microcirculation, März 2000

3. Selected Poster

21st European Conference on Microcirculation, Stockholm, Sweden, Juni 2000