

Aus der
Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Transplantationschirurgie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Jens Werner

**Die Rolle der Perfusionsdauer auf den Reperfusionsschaden des small
for size Syndroms und Erprobung medikamentöser Therapiestrategien
mit genauerem Blick auf pathophysiologische Signalkaskaden**

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

vorgelegt von
Sophia Falkenburger

aus
Wilhelmshaven

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Rentsch
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Natascha Nüssler
PD Dr. Sebastian Pratschke

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Moritz Drefs

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2025

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	Leberchirurgie – Signifikanz, Indikationen, Komplikationen	5
1.2	Small for size Syndrom (SFSS)	7
1.2.1	Pathophysiologie des small for size Syndroms	9
1.2.1.1	Parenchymvolumen	10
1.2.1.2	Hyperperfusionsschaden (HI)	11
1.2.1.3	Hepatische arterielle Puffer Antwort	15
1.2.1.4	Immunantwort	16
1.2.1.5	Schädigung der intestinalen Mukosa	16
1.2.2	Bisherige Therapiestrategien in der Literatur	16
1.3	Zelltod	18
1.3.1	Apoptose	18
1.3.2	Nekrose	21
1.3.3	Nekroptose	22
1.3.4	Weitere Formen des Zelltods	23
1.3.5	Formen des Zelltods im SFSS	27
1.4	Baicalein	28
1.5	DMSO – Dimethylsulfoxid	29
1.6	Tacrolimus	30
1.7	Proapoptotische Proteine: C-Jun-N-terminale Kinase (JNK)	32
1.8	Proapoptotische Proteine: Extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK)	33
1.9	Proapoptotische Proteine: Caspase 3 (C 3)	35
1.10	Proapoptotische Proteine: Poly (ADP-ribose) -Polymerase (PARP)	35
1.11	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	37
2.	Fragestellung	38
3.	Material und Methoden	40
3.1	Methodik und Vorgehen	40
3.2	Versuchstiere	42
3.3	Operationsinstrumente und Zubehör	42
3.4	Modell	45
3.4.1	Anatomie der Mausleber	45
3.5	Operatives Vorgehen	46
3.5.1	Anästhesie	46

3.5.2	Operationsablauf	47
3.5.2.1	Karotiskanülierung	47
3.5.2.2	75%-ige Leberresektion und Induktion der Hyperperfusion	48
3.5.3	Probenasservierung	50
3.5.4	Scheinoperationen	51
3.6	Analyseverfahren	52
3.6.1	Makrohämodynamik	52
3.6.2	TUNEL Assay.....	53
3.6.3	Nachweis proapoptotischer Enzyme mit Hilfe von Gewebelyse, Proteinquantifizierung und Western Blot.....	56
3.6.3.1	Gewebelyse.....	57
3.6.3.2	Western Blot	59
3.7	Auswertungsverfahren	63
3.7.1	Optische Flächenfraktionsanalyse.....	63
3.7.2	Proteinmengenbestimmung.....	68
3.7.3	Optische Dichtemessung.....	69
3.7.4	Statistische Verfahren	72
3.7.4.1	Deskriptive Statistik	72
3.7.4.2	Varianzanalyse und Post hoc Test.....	73
3.8	Versuchsgruppen- und Protokolle	74
3.8.1	75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (Hyperperfusion Injury (HI) 90')	75
3.8.2	75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (HI 90') und Applikation von DMSO	76
3.8.3	75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (HI 90') und Applikation von Baicalein	77
3.8.4	75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (HI 90') und Applikation von Tacrolimus.....	78
3.8.5	75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (HI 90') und Applikation von Tacrolimus + Baicalein/DMSO.....	79
3.8.6	75%-ige Leberresektion mit 120' und 240' Hyperperfusion (HI 120'/240').....	79
3.8.7	Schein – Operation.....	80
4.	Ergebnisse	82
4.1	Auswirkungen des Hyperperfusionsschadens beim hepatischen small for size Syndrom auf den Zelltod	82
4.1.1	Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten.....	83
4.1.1.1	Deskriptive Statistik	83
4.1.1.2	Statistik: Varianzanalyse und post Hoc Test	84

4.1.1.3	Deskriptive Statistik	85
4.1.1.4	Varianzanalyse und Post-hoc-Test	86
4.2	Auswirkungen des Hyperperfusionsschadens beim hepatischen Small for size Syndrom auf proapoptotische und lebenserhaltene Enzyme.....	88
4.2.1	Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten.....	88
	für Caspase 3.....	88
4.2.1.1	Deskriptive Statistik	88
4.2.1.2	Varianzanalyse und post-hoc Test.....	89
4.2.2	Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten für JNK.....	90
4.2.2.1	Deskriptive Statistik	90
4.2.2.2	Varianzanalyse und post-hoc Test.....	91
4.2.3	Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten für ERK.....	92
4.2.3.1	Deskriptive Statistik	92
4.2.3.2	Varianzanalyse	93
4.2.4	Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten für PARP.....	94
4.2.4.1	Deskriptive Statistik	94
4.2.4.2	Varianzanalyse	95
4.3	Auswirkungen der Behandlung mit DMSO, Baicalein, Tacrolimus und der kombinierten Therapie Baicalein + Tacrolimus auf das small for size Syndrom bei 90- minütiger Hyperperfusion auf proapoptotische Enzyme	96
4.3.1	Auswirkungen auf die Caspase 3 Aktivität.....	96
4.3.1.1	Deskriptive Statistik	96
4.3.1.2	Varianzanalyse	98
4.3.2	Auswirkungen auf die SAPK/JNK Aktivität.....	99
4.3.2.1	Deskriptive Statistik	99
4.3.2.2	Varianzanalyse	100
4.3.3	Auswirkungen auf die ERK 1/2 Aktivität.....	101
4.3.3.1	Deskriptive Statistik	101
4.3.3.2	Varianzanalyse	102
4.3.4	Auswirkungen auf die PARP-Aktivität.....	103
4.3.4.1	Deskriptive Statistik	103
4.3.4.2	Varianzanalyse	104
5.	Diskussion.....	105
5.1	Diskussion der Ergebnisse	105
5.1.1	Zelltod im Lebergewebe nach unterschiedlichen Hyperperfusionsintervallen	105
5.1.2	Proapoptotische Enzyme in den unterschiedlichen Hyperperfusionsgruppen	107
5.1.3	Effekt der medikamentösen Intervention auf den Zelltod	112

5.1.4	Effekt medikamentöser Interventionen bei 90- minütiger Hyperperusionszeit auf proapoptotische Proteinaktivität.....	119
6.	Ausblick.....	122
7.	Zusammenfassung.....	124
8.	Danksagung	128
9.	Affidavit	129
10.	Akademischer Lebenslauf	130
11.	Abkürzungsverzeichnis.....	131
12.	Literaturverzeichnis	136

1. Einleitung

1.1 Leberchirurgie – Signifikanz, Indikationen, Komplikationen

Es gibt etwa 100 verschiedene Lebererkrankungen. In Deutschland sind 5 Millionen Menschen betroffen (1). Das Spektrum reicht von virusassoziierten entzündlichen Lebererkrankungen über nutritiv und alkoholbedingte Erkrankungen (NASH, Leberzirrhose) bis zu Lebertumoren, die primär oder sekundär auftreten können (2,3).

Abhängig von der Entität der Lebererkrankung stehen medikamentöse oder chirurgische Therapien im Vordergrund. Bei Tumorerkrankungen ist die operative Therapie mit dem Ziel einer kompletten Tumorentfernung die Methode der Wahl, eine Leberzirrhose kann lediglich durch eine Lebertransplantation kurativ behandelt werden (4).

Die Leberchirurgie im Allgemeinen nimmt unter allen komplexen viszeralchirurgischer Operationen einen großen Anteil ein (5).

Im Zeitraum 2009-2015 wurden in Deutschland 3.287.199 viszeralchirurgische Operationen durchgeführt. Davon 18.849 komplexe Leberoperationen (5). 2023 wurden 868 Lebertransplantationen zur Behandlung von Lebererkrankungen im Terminalstadium vorgenommen, davon waren 50 Transplantationen Lebendspenden (6). Indikationen für operative Leberresektionen umfassen eine Vielzahl unterschiedlicher Entitäten von chronischen Lebererkrankungen, über angeborene Fehlbildungen, zu gutartigen Neubildungen und insbesondere primären bösartigen Neubildungen und Metastasen anderer Primärtumore. Indikationen für eine Lebertransplantation umfassen unter anderem Stoffwechselerkrankungen, akute und chronische Lebererkrankungen mit Funktionsverlust der Leber und die alkoholische Leberkrankheit, etc. (7)(8)(9).

Von einer erweiterten Hepatektomie wird gesprochen, wenn mehr als vier Lebersegmente reseziert werden, genauer: bei der erweiterten rechtsseitigen Hemihepatektomie wird die Resektion der Lebersegmente V, VI, VII, VIII überschritten und linksseitig umfasst die

erweiterte Hemihepatektomie eine Fläche, die über die Segmente II, III und IV reicht (10)(11)(12)(13). Nicht jede Lebererkrankung, primäre oder sekundäre Lebertumore sind aufgrund ihrer Lokalisation oder Größe einer Leberresektion zugänglich.

Im Vordergrund der Entscheidung zur operativen Therapie steht die zu erwartende Prognose und perioperative Morbidität. Damit eng verknüpft, ist unter anderem das zukünftige überbleibende Lebergewebe (engl. kurz „future liver remnant“ –FLR) mit erhaltener funktioneller und vaskulärer Integrität und Parenchymqualität (14). Sowohl das Volumen des verbleibenden Lebergewebes pro Körperoberfläche, als auch dessen Funktion spielen eine entscheidende Rolle für die postoperative Morbidität und Mortalität (11). Lebergewebe kann auf die ursprüngliche Größe binnen weniger als eines Jahres regenerieren und kann die notwendigen metabolischen Aufgaben wieder vollständig erfüllen (15).

Organtransplantationen werden seit dem Jahr 1962 in Deutschland durchgeführt. Die erste erfolgreiche postmortale Lebertransplantation erfolgte 1963 (16). Bis Dezember 2021 erfolgten 27.929 Lebertransplantationen in Deutschland (17). Der Anteil der Leberlebenspenden lag 2021 bei 6,5% (18). Insgesamt betreffen jährlich durchschnittlich 12% aller Neuanmeldungen für die Lebertransplantation Kinder (17). Die Statistik von Eurotransplant aus dem Jahr 2021, weist 1514 Lebertransplantationen nach postmortaler Organspende aus, davon erfolgten 99 Split-Lebertransplantationen. Auf der aktiven Warteliste von Eurotransplant für eine Lebertransplantation standen Ende 2021 1349 Patienten, davon 824 Deutsche (19).

Der Rückgriff auf Lebendspenden, auch bei der Leber ergibt sich aus dem erheblichen Spenderorganmangel: das Konzept der living donor liver transplantation (LDLT) oder Split-Lebertransplantationen kann effektiv dazu beitragen, den Mangel der Organspenden zu kompensieren und die Mortalität zu reduzieren (19–21). Die Komplikationsrate, sowohl bei der Leberresektion des Erkrankten, als auch bei der Resektion zur Organspende steigt mit der Komplexität des Eingriffes, des zu resezierenden Lebervolumens, der Parenchymqualität der verbleibenden Leber, sowie den Komorbiditäten des Patienten (5,21).

Den oben genannten chirurgischen Lebereingriffen sind ähnliche Komplikationen gemein. Komplikationen können in spezifische Früh- und Spätkomplikationen unterteilt werden, ebenfalls in gering- und schwerwiegende. Sie umfassen Nachblutungen, Blutungen und Gallefisteln, Thrombosen und Infektionen bis hin zum Organversagen. Eine Häufung dieser Probleme kann insbesondere auftreten, wenn die verbleibende Leber oder das Transplantat zu klein für den Körper ist. Diese prognosebestimmende Komplikation wird als „small for size Syndrom“ (SFSS) zusammengefasst, ist multifaktoriell bedingt, wenig präzisiert, und tritt bei ungefähr 20% aller Patienten nach erweiterter Hepatektomie und Lebertransplantation von Split-Lebern und LDLT auf (22).

1.2 Small for size Syndrom (SFSS)

Das small for size Syndrom ist ein klinisches Syndrom, dass sich postoperativ, sowohl nach partieller Lebertransplantation beim Empfänger und Spender, als auch nach Leberresektionen oder Lebertrauma und Sepsis als prognosebestimmende Komplikation entwickeln kann (11,23–27). Das Syndrom beschreibt das Unvermögen des verbliebenen Lebergewebes eine physiologische Leberfunktion wiederherzustellen (11). Die pathophysiologischen zugrundeliegenden Prozesse sind unscharf charakterisiert.

Die Erstbeschreibung des small for size Syndrom erfolgte im Rahmen von Lebendleberspenden zur Transplantation durch Emond et al im Jahr 1996 (28). Als komplikatives Resultat des zu kleinen Transplantats kam es zur metabolischen Leberdysfunktion, Hyperbilirubinämie, verlängerten Cholestase, Hyperkoagulabilität, portalen Hypertension, Aszites und späteren Komplikationen im Verlauf, wie der hepatischen Enzephalopathie (Grad 3-4), Sepsis, gastrointestinalen Blutungen und Dysfunktion des Darms mit Ileus, Thrombosen und letztlich fulminantem Leberversagen mit assoziiertem Lungen- und Nierenversagen (29) (20) (15).

Anfänglich wurde es vor allem als Komplikation bei Erwachsenen nach partieller Lebenddonor- Lebertransplantation (LDLT) beobachtet (15). Nach der ersten LDLT von

Professor Nagasues Team 1989 in Japan verstarb der Patient kurze Zeit später- vermutlich an einem SFSS. 1990 wurde von Masatoshi Makuuchi die erste erfolgreiche pädiatrische LDLT durchgeführt, die Patientin lebte nach Angabe von Makuuchi im Jahr 2018 noch und ist die bisher am längsten überlebende Patientin nach Lebertransplantation in Japan. Die erste erfolgreiche LDLT unter Erwachsenen wurde durch denselben Chirurgen im Jahr 1993 durchgeführt und gilt bis heute als die erste erfolgreiche LDLT unter Erwachsenen weltweit. Der Patient überlebte 17 Jahre (30).

Nach mehr als 60 Jahren Leberchirurgie ist mittlerweile akzeptiert, dass in allen weiteren Bereichen der komplexen Leberchirurgie, wie auch der Transplantation, dass SFSS eine bedeutende Rolle spielt und eine bedrohliche Komplikation darstellt. Vor allem sind die erweiterten, sogenannten majoren Hepatektomien mit Resektion von mehr als 4-6 Lebersegmenten betroffen (29). Obwohl das SFSS für über 60% der postoperativen Todesfälle verantwortlich ist, liegen wissenschaftliche Daten in erster Linie zur Lebertransplantation, weniger zur Leberresektion vor (29). Darüber hinaus konnte eine weitere Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2019 aufzeigen, dass das SFSS nach Hepatektomien häufig unterdiagnostiziert bleibt (22).

Nach wie vor ist die Definition des small for size Syndrom nicht einheitlich (20) (31,32). Die laborchemischen Definitionen aus 2003 wurden immer wieder von verschiedenen Arbeitsgruppen überarbeitet (31)(20)(33)(34). Allen gemein ist, dass technische, immunologische und infektiöse Komplikationen primär nicht ursächlich sind (26,35).

Expertenkommissionen haben sich bis dato auf folgende Kriterien geeinigt: prolongierte Cholestase, Koagulopathie, portale Hypertension, Aszites, gastrointestinale Blutungen ein bis zwei Wochen postoperativ, nicht einsetzende Leberregeneration und Tod durch Sepsis vier bis sechs Wochen postoperativ (11).

1.2.1 Pathophysiologie des small for size Syndroms

Die Pathophysiologie des small for size Syndrom ist nach wie vor nicht abschließend geklärt.

Neben Leberparenchym bezogenen Faktoren wie Volumen, Gewebequalität, funktionelle und regenerative Kapazität, sowie Patienten bezogenen Faktoren (Alter, Komorbiditäten) (20), die alle eine Rolle für die Entstehung des SFSS spielen, scheint die doppelte Perfusion der Leber über die Pfortader, als auch über die Leberarterie eine tragende Rolle einzunehmen (36).

Im Folgenden werden die wesentlichen pathophysiologischen Mechanismen beschrieben.

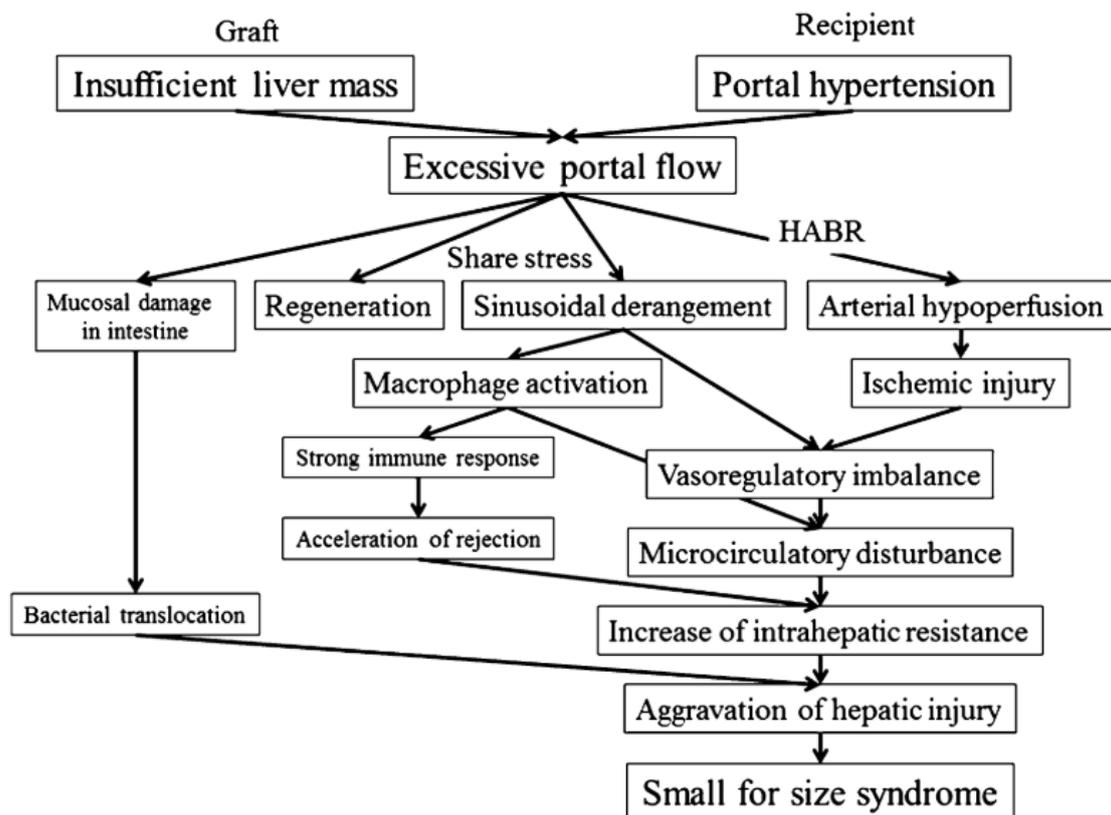


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Pathophysiologie des small for size Syndrom. Aus small-for-size syndrome in living donor liver transplantation using a left lobe graft, Taniguchi M. et al, Surgery Today, 2015 (32).

1.2.1.1 Parenchymvolumen

Unabhängig von der Auswahl des Leberlappens ist das verbleibende Parenchymvolumen, ein ausschlaggebender Parameter, der für die Entstehung des SFSS am ausführlichsten erforscht ist (15).

Hierfür hat sich zunächst das Konzept des Standard Leber Volumens (SLV) als entscheidend herausgestellt. Die Formel zur Errechnung des SLV lautet: $706.2 \times \text{Körperoberfläche} + 2,4$ (30,37)(38)(39)(40).

Für erwachsene Lebendspenden oder postmortale Leberteiltransplantationen wird ein Lebervolumen kleiner 30-50%, entsprechend einem graft to recipient weight ratio (GRWR) kleiner 0.8-1% als „too small for size“ definiert (41)(42)(37). Für die Sicherstellung einer guten Prognose sei laut Dahm et al eine Transplantatgröße von 50% des SLV notwendig (20).

Makuuchi hielt fest, dass ein SLV größer als 40% ausreichend für einen unkomplizierten postoperativen Verlauf sei (30)(15). Westliche Transplantzentren arbeiten aktuell mit diesen Transplantat-/Standardlebervolumen von 40% der Lebermasse eines Empfängers, entsprechend einem GRWR von 0.8, ohne weitere therapeutisch chirurgische Maßnahmen wie Flussmodulationen, Splenektomie, Pfortaderembolisationen oder Milzvenenembolisation, für erfolgreiche operative Ausgänge (43)(44)(45)(46).

Die bestehende Hämodynamik des Patienten scheint ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen. Liegt eine portale Hypertension und hyperdynamie Splanchnikus Hämodynamik wie z.B. bei einer Leberzirrhose vor, trägt dies verstärkt zur Entwicklung des SFSS bei, da sie den Schaden der Hyperperfusion potenzieren (32).

Die Mortalitätsrate für das SFSS post Hepatektomie beträgt weniger als 5%, die Morbidität wird mit 15-30% angegeben. 3-8 % der Patienten erleiden nach majorer Hepatektomie ein Leberversagen. Die Raten steigen mit dem resezierten Lebervolumen (47).

Während der Großteil der Forschung sich lange auf die Etablierung standardisierter unterer Grenzwerte für Leberrestvolumina und graft to recipient weight ratio (GRWR) konzentriert hat, zeigen andere Studien, dass nicht nur die verbleibende Lebermasse eine entscheidende Rolle spielt.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die klinischen Symptome eines small for size Syndroms auch auftreten, obwohl die als sicher geltenden Volumenkriterien berücksichtigt wurden und wiederum Patienten mit Leberresten, kleiner der als Standard etablierten Grenzen, nicht zwingend ein SFSS entwickelten (42)(23) (48)(49)(50)(51).

Diese Erkenntnisse legen weitere entscheidende pathophysiologische Mechanismen nahe. Allen voran steht die „too small for flow“ – zu klein für den Fluss- Theorie, die sich auf die Hämodynamik und Hyperperfusion und den damit entstehenden Schaden konzentriert (23).

1.2.1.2 Hyperperfusionsschaden (HI)

Der transhepatische Fluss über die Pfortader kann von der Leber nicht reguliert werden. Lediglich über die Arteria hepatica gelingt eine geringgradige Adaption an veränderte Druckverhältnisse (36)(20). Dieses Prinzip der hepatischen arteriellen buffer response wird später noch erläutert. Das nach Resektion oder LDLT verbleibende Lebergewebe wird folglich mit dem nahezu gleichen Blutstrom geflutet, wie zuvor die gesamte Leber.

Der Blutfluss über die Pfortader birgt zum einen, den Reiz der Leberzellproliferation und Regeneration der Leber, zum anderen gilt er als wesentlicher Bestandteil der Pathogenese des SFSS im Sinne eines Re- bzw. Hyperperfusionsschaden (20)(22)(32).

Die Hyperperfusion über die Pfortader, sowie der erhöhte Pfortaderdruck führen über eine Mikrozirkulationsstörung zu endothelialer Apoptose und zum Zelltod der Hepatozyten (26,52).

Histopathologisch werden in postoperativen Biopsaten nach Leberresektion, Ischämiezonen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Zonen der Regeneration, Cholestase mit Endothelschaden, zentrilobuläre mikrovaskuläre Steatose, konsekutive Ballooning der Hepatozyten, mitochondriale Schwellung, Kollaps des Disse'schen Raumes, sowie duktiläre Reaktionen beobachtet. Ebenfalls können folgende Befunde erhoben werden: arterieller Vasospasmus und Thrombosierung wie auch Gallengangsnekrose und nach mehr als 20 Tagen regenerative Hyperplasie (28) (15)(11)(53).

Molekularpathologisch wurde eine Überexpression von Endothelin-1 beschrieben (15,52). Endothelin-1 wirkt als starker Vasokonstriktor mit negativem Einfluss auf die hepatische Mikrozirkulation und Konstriktion hepatischer Sinusoide mit nachfolgender Erhöhung des Pfortaderdrucks (15).

Der massiv erhöhte Blutfluss im Lebersinus führt im frühen Stadium des SFSS zur Sinusdilataion und zur Schädigung der sinusoidalen Zellen (51). Eine Stunde nach Reperfusion von small for size Lebern im Schweinmodell zeigt sich insbesondere ein Schaden der sinusoidalen Endothelzellen mit Ruptur der Zellen (54). Eine Stunde nach 80%-iger Leberresektion im Rattenmodell hat die Arbeitsgruppe um Xie et al analog dazu, mit Hilfe 4D-CT Technik, den Höhepunkt der arteriellen und portalvenösen Hyperperfusion nachgewiesen und eine damit einhergehende Korrelation der Schädigung sinusoidaler Endothelzellen (51).

Die Hyperperfusion, sowie die damit einhergehende transiente Pfortaderdruckerhöhung gehen mit einer Überexpression von Endothelin-1 und einer Reduktion der Plasmalevel der Nitritoxydase (NO) einher. Diese Dysbalance zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation in den Sinusoiden resultiert in Mikrozirkulationsstörungen und konsekutiver sinusoidaler Schädigung in der frühen Phase der Hyperperfusion (55–57). Die sinusoidale Schädigung mit hämorrhagischer Nekrose und Apoptose um die Zentralvene, als Resultat der Mikrozirkulationsstörungen durch den Scheerstress der Hyperperfusion, gilt somit als pathophysiologischer Schlüsselmechanismus in der Entstehung des SFSS (32,52,53,58).

Die ungestörte Mikrozirkulation ist entscheidend für die frühe Regeneration des Restleberparenchyms nach Reperfusion (55,59). Somit wird das Ausmaß der verbleibenden Funktionalität des Restlebergewebes nach Resektion oder Lebertransplantation durch die, im Rahmen der Hyperperfusion, eingetretenen Mikrozirkulationsstörung bestimmt.

Auch auf genetischer Ebene lässt sich eine Reduktion der Expression NO bildender Gene nachweisen (55). Des Weiteren finden sich verminderte Level antioxidativer Stressgene, wie der Häm Oxygenase (HO-1) und Hitze schock Protein 70 (Hsp-70) Level (55). HO-1 bewirkt eine protektive Vasodilatation als Antwort auf schädigende Vasokonstriktion und ist genau wie Hsp-70 verantwortlich für Gewebereparatur und die Regelung der intrazellulären Homöostase (60,61). Der Mangel dieser Gene begünstigt die Ischämie-induzierten Pathomechanismen (15).

Schon sehr früh konnte darüber hinaus eine vermehrte Expression verschiedener Zytokine wie IL-6, IL-15 und TNF alpha nachgewiesen werden; mit in der Folge Aktivierung von Adhäsionsmolekülen wie dem intrazellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und vaskulärem Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), die die weitere Adhäsion und Migration von Endothelzellen und Neutrophilen mit konsekutiver Leberzellschädigung fördern (55,62).

In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass die Entstehung und Auswirkung freier Sauerstoff-Radikale und oxidativer Stress im Sinne reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine bedeutende und ursächliche Rolle in der Entstehung und Aggravierung des Reperfusionsschadens spielen (63–70). Die Aktivierung von ROS ist während der Reperusionsphase deutlich höher, als noch während der Ischämie (71). Ursächlich hierfür ist, dass durch den wiederhergestellten Blutfluss mit sehr hohem Sauerstoffangebot, die während der Ischämie angefallenen, anaeroben Stoffwechselprodukte wie Hypoxanthin durch die Xanthinoxidase reduziert werden und hierdurch Hydroxylradikale, Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid entstehen. Diese tragen zur mitochondrialen Dysfunktion bei, durch die begleitende Chemotaxis und Lipidperoxidation wird die Integrität von Proteinen und Membranen zerstört (72). Darüber hinaus können sie Schäden an

Endothelzellen und Funktionsstörungen im Mikrogefäßsystem verursachen (71). Grundsätzlich entsteht oxidativer Stress auf drei Wegen: über die Elektronenkette, NADPH-Oxidase oder eben Xanthinoxidase (71,73).

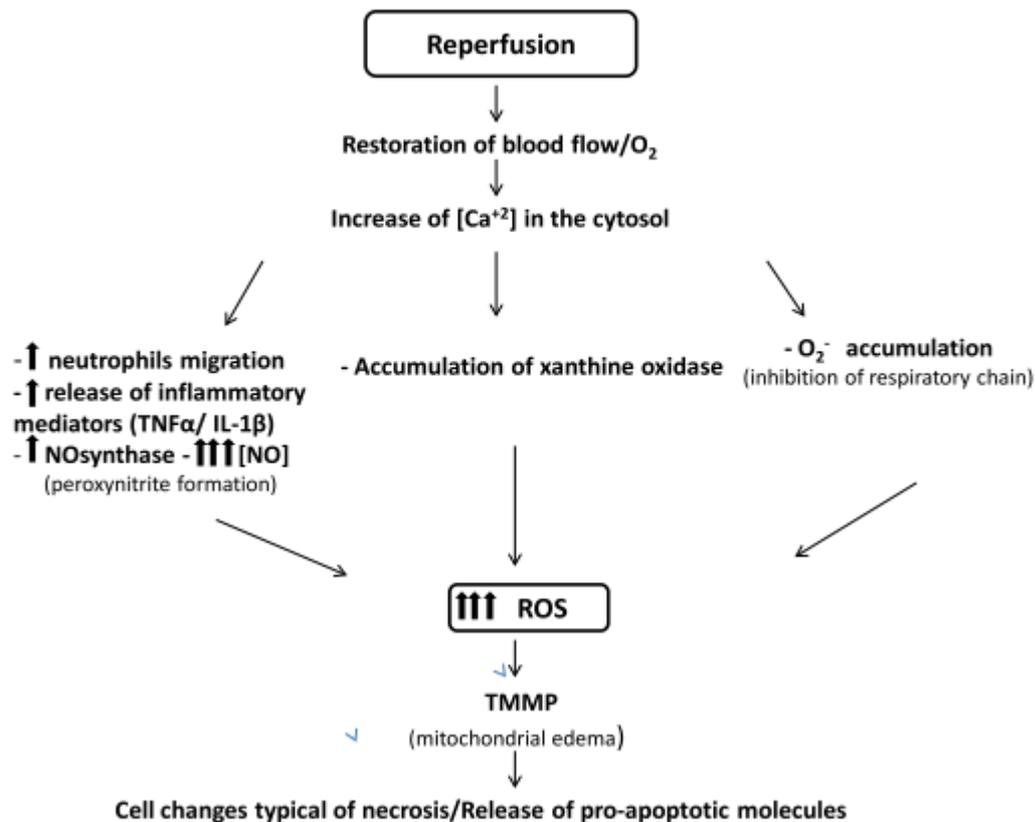


Abbildung 2: Prozess bei Ablauf des Reperfusionsschaden. Die Wiederherstellung des Blutflusses, die mit einer erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Konzentration einhergeht, führt auf mehreren Wegen zu einem ungeordneten Anstieg der ROS. Dieser Anstieg führt zu zellulären und mitochondrialen Veränderungen, die oft irreversibel sind und zum Zelltod führen. Aus Paula Carolina Grande Nakazato et al., 2018 (725), Liver ischemia and reperfusion injury. Pathophysiology and new horizons in preconditioning and therapy (71).

In späteren Phasen des Reperfusionsschadens ist vor allem die Neutrophilenmigration für weitere ROS-Generierung verantwortlich. Aus Modellen des Ischämie-Reperfusionsschadens ist bekannt, dass die Neutrophilen vermittelte Entzündungsreaktion ebenfalls Zelltod einleitet (70,71,74). Die Hepatozyten werden auch durch die Neutrophilen-vermittelte Freisetzung von Elastase, Cathepsin G, Heparinase, Kollagenase und

hydrolytischen Enzymen, die wahrscheinlich direkt zytotoxisch auf Hepatozyten wirken, geschädigt (70,75).

Weitere **inflammatorische Zellen** wie die Kupffer-Zellen, dendritische Zellen, Lympho- und Monozyten aktivieren und sezernieren proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha, IL-1 und IL-6, welche wiederum Zelluntergang, spezifischer: Apoptose vermitteln.

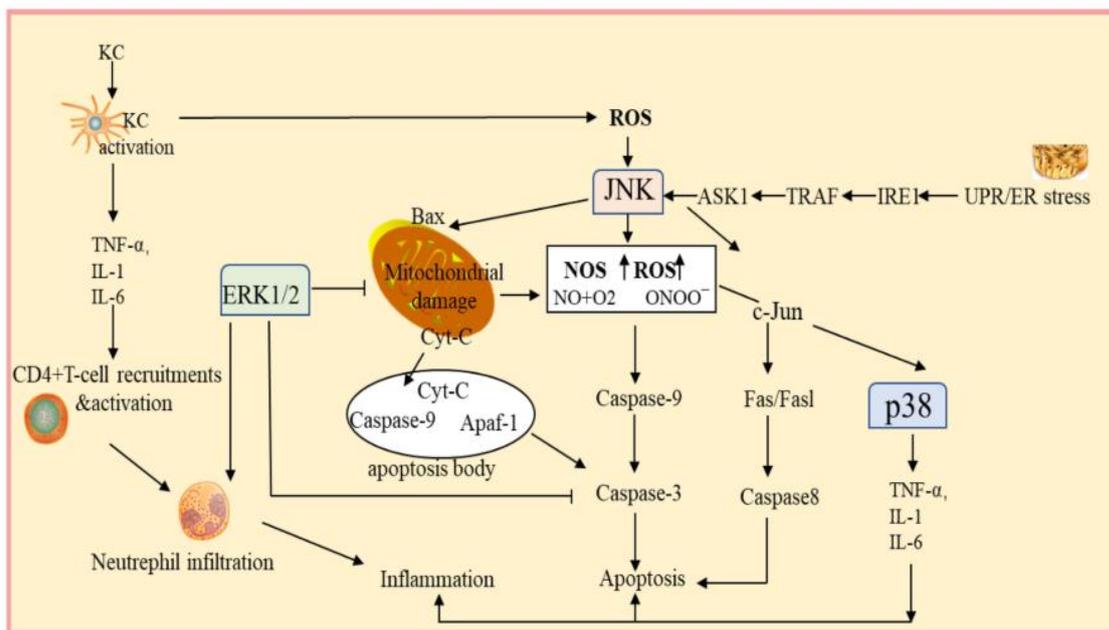


Abbildung 3: MAPK-bezogene Signalwege, die an Leberischämie-Reperfusionsschäden beteiligt sind. p38, JNK und ERK sind an der Regulierung der Leberischämie-Reperfusionsschädigung über den Todesrezeptorweg, den Weg der mitochondrialen Apoptose, den Weg der reaktiven Apoptose des endoplasmatischen Retikulums und den Weg des oxidativen Stresses usw. beteiligt. Aus Yu, 2023, MAPK Signaling Pathways in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury (74).

Der Summationseffekt dieser pathologischen Effekte führt konsekutiv zum Verlust gesunder Hepatozyten (15).

1.2.1.3 Hepatische arterielle Puffer Antwort

Der Hyperperfusion steht die arterielle Minderversorgung, ausgelöst durch die hepatisch arterielle buffer response (HABR), mit Ischämie als Folge gegenüber (22). Die HABR ist abhängig von der lokal vorhandenen Menge an Adenosin, die wiederum von der Auswaschrade in das Pfortaderblut gesteuert wird, um den Blutfluss durch die Leber

aufrechtzuhalten. In SFSS-Lebern kommt es zur exzessiven HABR mit konsekutiver Ischämie Induktion (76–78).

1.2.1.4 Immunantwort

Frühe Verletzungen eines Lebertransplantats führen zur Makrophagen Aktivierung mit Beschleunigung einer möglichen Abstoßungsreaktion.

Der vaskuläre endotheliale growth factor (VEGFR) und sein Rezeptor zeigen sich erhöht in der frühen Reperfusionphase, was zur weiteren Monozyten- und Makrophagenstimulation führt und somit zur Verstärkung der inflammatorischen Antwort und mikrozirkulatorischen Schädigung (79,80).

1.2.1.5 Schädigung der intestinalen Mukosa

Durch den Pfortaderhochdruck mit konsekutivem intestinalem Ödem mit gestörter Kapillarpermeabilität kann es zur Translokation von Bakterien mit dem Risiko der Inflammation und Sepsis kommen, ein weiterer ungünstiger Faktor für die Prognose nach massiver Hepatektomie (81,82).

1.2.2 Bisherige Therapiestrategien in der Literatur

Verschiedene Therapiestrategien zum Management des small for size Syndrom wurden mit unterschiedlich großem Erfolg über die Jahre erprobt (11).

Hierzu gehören die Modulation und Kontrolle des portalvenösen Flusses und Drucks (77). Die Regulation des portalvenösen Einflusses kann mittels verschiedener Shunt Techniken, wie beispielsweise portocavaler oder auch transjugulärer intrahepatischer Shuntsysteme, zu erfolgreichen Ergebnissen führen (15,45,77,83–85). Diese Methoden wurden in den 2000ern erprobt (31). Hierbei ist beachtenswert ist, dass für die meisten Shunts gilt, dass diese im Verlauf geschlossen werden müssen, da sonst ein Steal Phänomen mit Transplantatatrophy

und Dysfunktion droht (86), was Probleme in der klinischen Umsetzbarkeit der Techniken bedeutet.

Des Weiteren lässt sich über eine Ligatur der A. splenica oder eine Splenektomie die Hämodynamik des Splanchnikusgebietes begünstigen (15,32). Hierdurch wird der portale Fluss in die Leber reduziert und gleichzeitig die Perfusion über die Leberarterie gefördert. Die Splenektomie hat zusätzlich zur Folge, dass geringere Mengen vasokonstriktiver Modulatoren wie Endothelin freigesetzt werden, was wiederum zur Vasodilatation innerhalb der Leber führt. Nach einer Splenektomie sind jedoch schwerwiegende Komplikationen wie das overwhelming post Splenektomie Syndrom und Pfortaderthrombosen nicht zu vernachlässigen (87).

Bei jeder Leberresektion muss darauf geachtet werden, dass eine venöse Okklusion vermieden wird und der venöse Abfluss ungehindert erfolgen kann (88).

Zu den pharmakologischen Interventionen zählen unter anderem Versuche der Gefäßregulation des portalvenösen Einflusses mit Prostaglandin E1, FK 409 einem NO-Donor, Endothelin Rezeptor- A- Antagonisten und Adenosin- A2a- Rezipitorantagonisten, Olpirinon ein selektiver Phosphodiesterase III Hemmer, Häm- Oxygenase-1 und MnTBAP, eine Superoxid-Dismutase sowie Leberregeneration fördernde Interventionen mit Serotonin sowie die Inhibition von Nuklearfaktor kappa B (32,55,89,90).

2017 wurde eine Leitlinie der internationalen Gesellschaft ISGLS (International Study Group on Liver Surgery) veröffentlicht, in welcher zur Prävention der Entstehung eines SFSS nach Teillebertransplantation die Transplantatqualität, portale Hypertension des Empfängers, sowie die Transplantatgröße als relevante Größen genannt wurden (91).

Mithilfe optimierter prä- und postoperativer Ernährung können die Bedingungen des Empfängers zusätzlich verbessert werden. Auch die richtige intensivmedizinische Therapie, vor allem unter Berücksichtigung des Volumenmanagements, sowie die Qualität des

Transplantats unter Berücksichtigung des Spenderalters sind Faktoren, die zu Gunsten eines besseren outcomes entsprechend ausgewählt werden können (15).

Dennoch ist auch bei Berücksichtigung sämtlicher genannter Maßnahmen ein SFSS nicht konstant und vollständig zu vermeiden, so dass weitere Mechanismen zur Entstehung des SFSS beizutragen scheinen (32).

Analog zum hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) kommt es im Rahmen des Hyperperfusionsschadens durch die Reperfusion, wie im vorangegangenen Kapitel erörtert, zum Zelluntergang. Dieser kann in unterschiedlichen Formen auftreten, die zum Teil auch fließend sind (26,56,73,92–94).

1.3 Zelltod

Zelltod kann physiologisch und pathologisch in mehrzelligen Organismen auf unterschiedliche Art und Weise eingeleitet werden und stattfinden. Im Folgenden werden die verschiedenen Formen des Zelltods erörtert.

1.3.1 Apoptose

Apoptose stellt eine Form des programmierten Zelltods dar, dessen Auslösung durch intrazelluläre, als auch extrazelluläre Signale erfolgen kann und charakteristische morphologische und biochemische Eigenschaften besitzt.

Hier werden die bekanntesten Signalwege aufgezeigt. Typische proapoptotische Proteine, die sowohl durch extra-als auch intrazelluläre Stresssignale aktiviert werden, sind JNK (c-Jun-N-terminalen Kinasen) und ERK (extracellular-signal regulated kinases, extrazellulär Signal regulierte Kinasen), die zu der Familie der MAP- Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) gehören und eine Vielzahl von Proteinen phosphorylieren, u.a. das Tumorsuppressor Protein p53, die zum programmierten Zelltod führen (95) .

Die gemeinsame Endstrecke dieser extra- und intrazellulären Signalwege führt zur Schrumpfung der Zelle mit DNA-Fragmentierung, Auflösung des zellulären Zytoskeletts, der

nukleären Proteine und zur Formation eines Apoptosekörpers mit Liganden-Expression für die Phagozyten (73,96,97).

Der Prozess der Apoptose ist energieabhängig und Teil des Stoffwechsels der Zelle. In der Regel findet der Zelluntergang ohne Beeinträchtigung der Umgebung, wie Inflammation, der Zelle statt (73,96,97).

Apoptose spielt im menschlichen Körper eine wichtige Rolle, wie bei der kontinuierlich stattfindenden Zellerneuerung, der Immunabwehr und der Entstehung von Krankheiten. Die Erstbeschreibung erfolgte 1972 durch Kerr, Wyllie und Curie (96).

Die, den intrinsischen Signalweg, einleitenden Stimuli umfassen Stresssignale u.a. ausgelöst durch Hypoxie, radikale Sauerstoffspezies, Strahlung, Hyperthermie, Toxine und Inflammation, als auch den Mangel an Apoptoseinhibition durch Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine. In der Folge kommt es zur Störung der mitochondrialen Permeabilität mit Verlust des Transmembranpotentials und Freisetzung von Cytochrom c, der Serinprotease HtrA2/Omi und Smac/DIABLO ins Zytosol, um daraufhin die caspaseabhängige Zelltodkaskade zu aktivieren (98–100). Das sogenannte Apoptosom entsteht durch die Aktivierung von Apaf 1 und Caspase 9 (101).

Caspase 9 initiiert, über die Effektorcaspase 3, die Caspase-Kaskade (97).

Smac (small mitochondria-derived activator of caspases) /DIABLO und HtrA2/Omi führen zur Hemmung der Inhibitor Apoptose Proteine (IAP). Weitere proapoptotische Proteine wie CAD, AIF (apoptosis inducing factor) und Endonuklease G, als auch das endoplasmatische Reticulum spielen eine Rolle (97).

Für die Regulation der intrinsisch eingeleiteten Apoptose sind die Proteine der Bcl-2 Familie verantwortlich, diese kann in pro-apoptotische und anti-apoptotische Proteine unterteilt werden und steht unter der Regulation durch das Tumorsuppressor Protein p53 (96,97).

Die intrinsisch aktivierte Apoptose unterteilt sich demnach in caspasenabhängige Abschnitte und caspasenunabhängige Abschnitte.

Die extrinsische Signalkaskade wird durch extrazelluläre Stresssignale gestartet und durch transmembranöse Todesrezeptoraktivierung der TNF alpha Familie eingeleitet. Für die Bindung an den Todesrezeptor bekannte Liganden umfassen FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/ DR4 and Apo2L/DR5 (102–104). Auch kann der Wegfall lebenserhaltender Signale zur Einleitung der Todeskaskade führen. Beiden gemein ist, dass bei Bindung des entsprechenden Liganden an den Todesrezeptor, eine Konformitätsänderung vollzogen wird und die sogenannte Todesdomäne die Signalkaskade in Gang setzt. Die hierbei entstehenden Adaptor-Proteine TRADD und FADD führen zur Caspase 8 Aktivierung (96,97).

Die gemeinsame Endstrecke des intrinsischen und extrinsischen Apoptosewegs wird auch als „Ausführungsweg“ bezeichnet. Die Effektorcaspase 3 spielt hier die entscheidende Rolle und führt über Aktivierung der zytoplasmatischen Endonuklease und Proteasen zur Degradierung von Zellkernmaterial. Die Effektorcaspasen, zu denen auch Caspase 6 und 7 zählen, spalten weitere Substrate wie Zytokeratine, PARP (Poly-ADP-ribose Polymerase), ein DNA-Reparatur Enzym, und weitere entscheidende Proteine, die letztendlich zum biochemischen und morphologischen Umbau und Untergang der Zelle führen (96,105).

Regulation of Apoptosis Overview

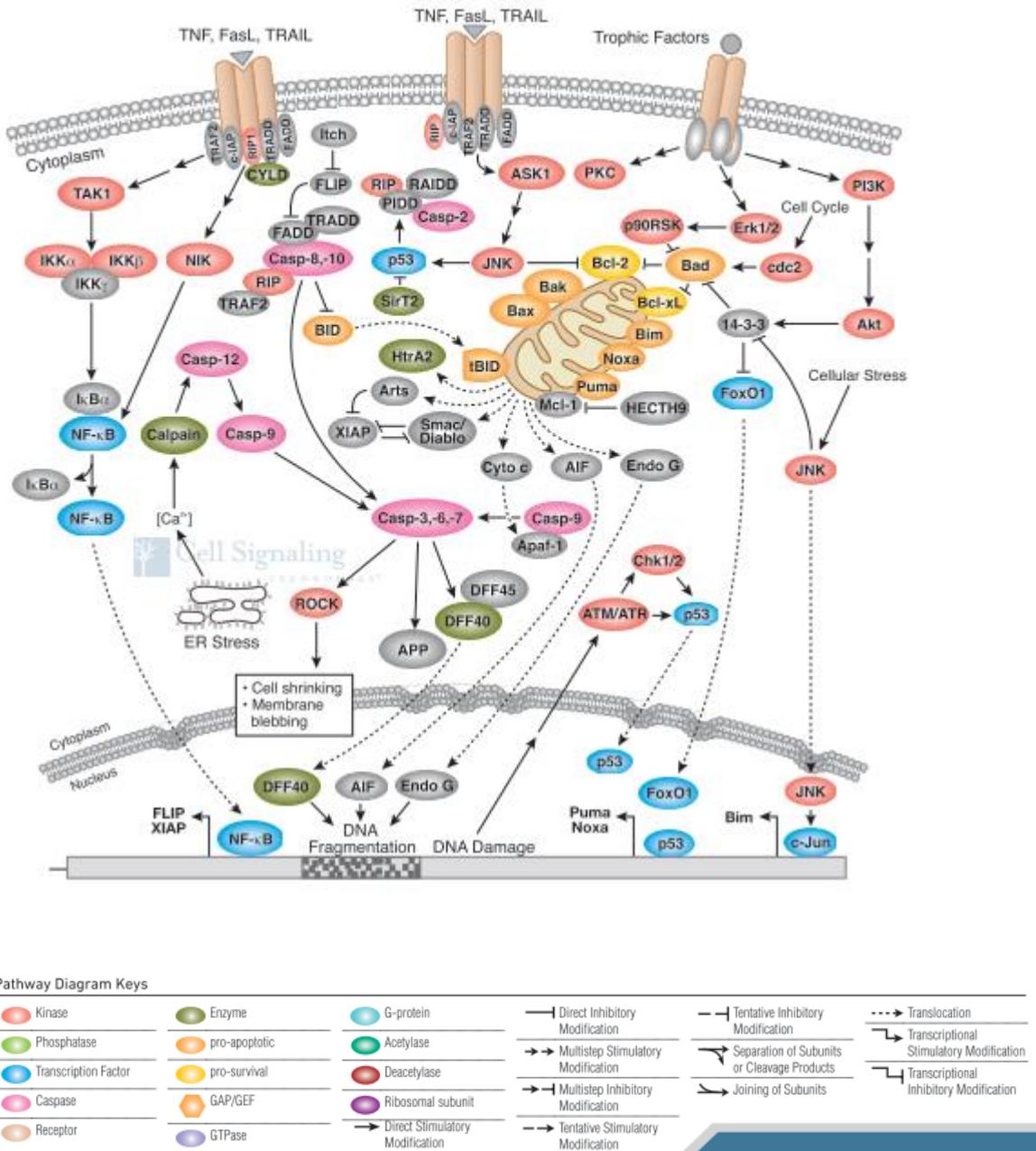


Abbildung 4: Aus Cell Signaling Technology, 2014 (106).

1.3.2 Nekrose

Die Nekrose gilt allgemein als pathologischer – im Gegensatz zur Apoptose - nicht kontrollierter, passiver Todesvorgang einer Zelle, eingeleitet durch äußere Schädigung. Die Zelle schwillt an, ihre Membran perforiert und spült ihren Inhalt ins Zytoplasma, wo es zur Inflammation, Neutrophileninvasion und damit Zytokinaktivierung kommt (73,107,108).

Die nekrotischen Prozesse umfassen den Verlust der Ionenhomöostase, wodurch es zur Zellschwellung und Erhöhung des zellulären freien Calciums, der Aktivierung unterschiedlicher Proteasen und Phospholipasen und dem Verlust der mitochondrialen Integrität kommt (73,107). Durch die mitochondriale Schwellung und Dysfunktion, auch mitochondriale Permeabilitätstransition (MPT) genannt, kommt es zum Verlust der oxidativen Phosphorylierung und Energiebildung in Form von ATP (107). Der Verlust von ATP führt zum zellulären Ödem, Rundung und Schwellung der Mitochondrien, Erweiterungen des endoplasmatischen Retikulums (ER), lysosomaler Störung und Bildung von Plasmamembranvorsprüngen, sogenannten Bläschen (73). Bläschenbildung, die durch gestörte zelluläre Volumenkontrolle und Störungen des Zytoskeletts verursacht wird, ist teils reversibel, z.B. nach Reoxygenierung. Der nekrotische Zelltod tritt durch Versagen der Permeabilitätsbarriere der Plasmamembran auf, was zur Zerstörung der Plasmamembran und der Freisetzung von Zellkomponenten führt. Die Freisetzung von Zellinhalten löst eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe aus (109).

1.3.3 Nekroptose

Die „programmierte“ Nekrose, bezeichnet eine regulierte Nekrose. Die Aktivierung findet über den Todesrezeptor-Weg analog zur extrazellulären Apoptose statt und mündet in einer Zellruptur mit umgebender Entzündungsreaktion wie bei der Nekrose (107,108)

Gerade für den hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden ist die Nekroptose gut untersucht (73,107). Während der Ischämie und damit einhergehenden Hypoxie kommt es zur Azidose. Im sauren Milieu wird die Nekroseentstehung herausgezögert. Während der Reperusionsphase und dem damit einhergehenden pH-Wert Anstieg und der Reoxygenierung wird der Zellschaden und Zelltod über die mitochondriale Permeabilitätstransition (MPT) ausgelöst, diese führt wie oben bereits skizziert zur Depolarisation und Schwellung der Mitochondrien durch Elektrolytschwankungen mit Ruptur ihrer Außenmembran und Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (73,107,110). Proinflammatorische Zytokine wie TNF alpha, IL-1 und ROS aggravierern die

Umgebungsinfektion durch weiteres recruitment von Neutrophilen, T-Lymphozyten und Endothelzellen. Deren Stimulation führt zur Blutplättchenaggregation und Mikrozirkulationsstörung mit weiterer Exazerbation des Zellschaden.

MPT kann allerdings auch Apoptose induzieren. Die Signalkaskade wird über Cytochrom c vermittelte Aktivierung von Caspase 9 und Formation des Apoptosoms gesteuert (107). Dieser Signalweg ist ATP-abhängig. Schlussfolgernd bestimmt der ATP-Gehalt einer Zelle über den Zelltodmechanismus.

Über die Aktivierung der Immunantwort, insbesondere der Aktivierung von Kupfer-Zellen, sowie Infiltration und Akkumulation von Neutrophilen und T-Lymphozyten wird der Zellschaden weiter verstärkt (111).

1.3.4 Weitere Formen des Zelltods

2018 hat das Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD) eine Leitlinie zur Definition und Interpretation des Zelltods und seiner diversen Aspekte herausgegeben.

Neben den sehr gut erforschten Mechanismen wie Apoptose, Nekrose und auch Nekroptose sind weitere Zelltodarten ins Augenmerk der Forschung geraten.

Hierzu zählt unter anderem die Pyroptose, die über virale oder bakterielle Erreger vermittelt zum Zelluntergang führt, um einer Infektion Einhalt zu gebieten. Der Zelltod wird durch das sogenannte Inflammasomen vermittelt. Caspase vermittelt, kommt es zur Inhibition der Glykolyse und damit der ATP- Produktion. Die Caspase 1 Aktivierung fördert die Ausschüttung von Zytokinen und führt zur Entzündungsreaktion in der Umgebung mit Anlockung von Immunzellen, insbesondere Neutrophilen, die die Erreger eliminieren (112).

Die Ferroptose gehört ebenfalls zu den neueren Entdeckungen der Zelltod Subklassen und wurde 2012 erstmals beschrieben (113). Eine Eisen-abhängige Form des programmierten Zelltods, initiiert durch Mangel antioxidativ wirksamen Glutathions mit in der Folge ungehemmter Akkumulation von reaktiven Lipidperoxiden, die zu irreparablen

Membranschaden und letztlich oxidativem Zelltod führen (65,67,68). In den letzten Jahren ist die Ferroptose in den Mittelpunkt der Zelltodforschung gerückt. Die Ferroptose spielt eine wichtige regulatorische Rolle bei der Entstehung und Entwicklung vieler Krankheiten, wie z. B. Tumoren, neurologischen Erkrankungen, akuter Nierenschädigung, oder auch Ischämie/Reperfusion (65). Ferroptose ist weder durch Zellschwellung und Membranruptur, noch durch Zellschrumpfung, DNA-Kondensation und Apoptosekörperbildung definiert. Morphologisch manifestiert sich Ferroptose hauptsächlich als Schrumpfung der Mitochondrien mit erhöhter Membrandichte und Verringerung oder Verschwinden der mitochondrialen Cristae (113–115). Biochemisch kommt es durch den Mangel an Glutathionperoxidase (GPX 4) zur Oxidation von Lipiden durch Eisen und damit zur Ausbildung von Phospholipid Hydroperoxiden (PLOOHs), einer besonderen Form lipidbasierter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (65,66). Die Glutathionperoxidase 4 wird somit als das entscheidende Schlüsselenzym, welches die PLOOHs reduziert und damit neutralisiert, der Ferroptose angesehen (65,66).

Wie die zur Ferroptose führende Lipidperoxidation genau initiiert wird, ist noch unzureichend erforscht. Bekannt ist, dass die Induktion der Ferroptose über verschiedene Signalkaskaden initiiert wird. Pro-ferroptotisch wirken Erastin und RSL3. RSL3 inhibiert direkt die anti-ferroptotische GPX 4, während Erastin auf Transmembrankanäle mit konsekutiver mitochondrialer Dysfunktion zur Freisetzung großer Mengen an Oxiden an den Zellmembranen führt (114).

Die Initiierung der Lipidperoxidation selbst erfordert die Entfernung eines bisallylischen Wasserstoffatoms (befindet sich zwischen zwei Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen) von mehrfach ungesättigten Fettsäuregruppen in Phospholipiden (PUFA-PLs), die in Lipiddoppelschichten eingebaut sind. Dies führt zur Bildung eines kohlenstoffzentrierten Phospholipidradikals (PL•) und weiter zur Reaktion mit molekularem Sauerstoff zu einem Phospholipid-Peroxy-Radikal (PLOO•), dieses entfernt Wasserstoff von einer anderen PUFA, sodass PLOOH entsteht (66,116).

Sowohl die Autooxidation ungesättigter Fettsäure in den Membranen, als auch nicht enzymatische Oxidationsprozesse, initiiert durch lokale Bildung freier Lipidradikale oder Hydroxylradikale (ROS) spielen in der Lipidperoxidation eine Rolle (117). Des Weiteren wird den Lipoxygenasen (LOX) eine Initiator- Rolle im Rahmen der Ferroptose zugeschrieben (66). Diese eisenabhängigen Dioxygenasen oxidieren die mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit zwei Sauerstoffatomen zu Eicosanoiden (118). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, dass LOXs hauptsächlich, bei durch Cysteinmangel induzierter Ferroptose und weniger durch GPX4-Verlust induzierte Ferroptose, beschrieben wird (66). Cystein fungiert hierbei als Substrat für die Bildung von Glutathion (GSH), einem der wichtigsten Antioxidantien in allen Zellen, selbst (119) .

Die Inhibition aller humanen LOX hat nicht zur kompletten Vermeidung von Ferroptose geführt, sodass LOX als wichtiger aber nicht einziger Mediator in der Induktion der Ferroptose fungiert (120). Darüber hinaus sind die LOX auch entscheidende pro- und antiinflammatorische Enzyme (121,122).

Die Hemmung der 12- Lipoxygenase und 15- Lipoxygenase hat protektive Effekte auf den Ischämieschaden im Hirn, Tumorentstehung und den hepatischen sowie kardialen Ischämie-Reperfusionsschaden (64)(121,123,124). Die 12-Lipoxygenase ist unter anderem essentiell für p53-abhängige Ferroptose, die durch Peroxide ausgelöst wird (125).

In Modellen des IRI wurde die 12/15-Lipoxygenase (12/15-LOX) als relevante Quelle der Lipidperoxidation beobachtet, da sie membrangebundene Arachidonsäure – vor allem in Mitochondrienmembranen – oxidiert (126). Die dabei entstehende 12S/ 15S-HpETE (12S/15S-Hydroperoxyeicosatetraensäure), gilt als Schlüsselmetabolit des durch IRI vermittelten Zelltods, über Aktivierung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) (127–129). 2008 konnte nachgewiesen werden, dass GPx4-Inaktivierung in Mäusen und Zellen, zur ungehemmten Lipidperoxidation führt und diese im Downstream der Signalkaskade durch die 12/15-Lipoxygenase hervorgerufen wird (127).

Eine LOX-Inhibition, bspw. durch Baicalein oder LOX- Knockout Mäuse zeigte einen guten Schutz vor ischämischen Hirnschaden (123,130).

Reguliert wird die Ferroptose also durch mehrere zelluläre Stoffwechselwege, einschließlich Redox-Homöostase, Eisenstoffwechsel, mitochondriale Aktivität und Metabolismus von Aminosäuren, Lipiden und Zucker sowie verschiedene krankheitsrelevante Signalwege (66).

Abschließend lässt sich festhalten, dass zwischen den verschiedenen Zelltodmechanismen fließende Übergänge bestehen und unterschiedliche Formen parallel auftreten können (108,131–135).

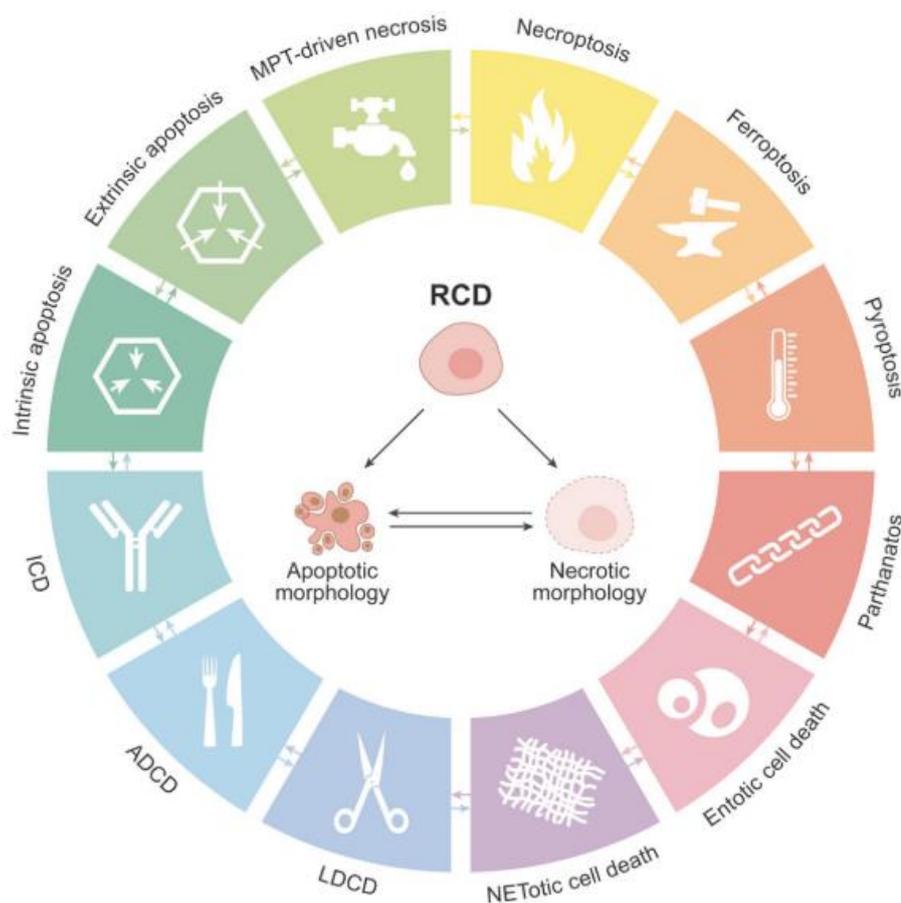


Abbildung 5: Abbildung der wichtigsten Mechanismen zur Auslösung des regulierten Zelltods (RCD). Es besteht ein beträchtlicher Grad an Interkonnektivität. Jede Art von RCD weist ein ganzes Spektrum von morphologischen Merkmalen, die von vollständig nekrotisch bis vollständig apoptotisch mit einem immunmodulatorischen Profil, das von entzündungshemmend bis tolerogen über entzündungsfördernd und immunogen reicht auf. ADCD: Autophagie-abhängiger Zelltod, ICD: Immunogener Zelltod, LDCD: Lysosomen-abhängiger Zelltod, MPT: Mitochondriale Permeabilitätstransition. Aus Cell death and Differentiation, 2018 (134).

1.3.5 Formen des Zelltods im SFSS

Für das SFSS und den alleinigen Hyperperfusionsschaden ohne Berücksichtigung vorangegangener Ischämie sind die genauen Formen des Zelltods nicht bekannt und unzureichend erforscht (25,51,54,70–72,74,75,136–142).

Auch die Signifikanz des programmierten Zelltods für das SFSS wurde Anfang der 2000er noch als unbekannt betitelt (55,143). Kelly et al zeigt, dass im Schweinemodell für SFSS ein signifikanter Anteil an Apoptose in den kleineren grafts, entsprechend 20% des Gesamtlebervolumens, innerhalb der ersten Stunde nach Transplantation und bis 5 Tage posttransplant nachweisbar ist (78). Eine erhöhte Apoptoserate im SFSS schreibt die Autorin grundsätzlich dem Untergang defizitärer Hepatozyten, die durch regenerative Stimuli in der Reperfusionphase entstehen, zu (78). Die ausgelöste Hepatozytenproliferation setzt jedoch erst nach ca. 24 Stunden ein, sodass dies nicht den Zelluntergang in frühen Stadien des Reperfusionsschaden selbst erklärt (51). Der Hepatozytenproliferationsindex selbst ist abhängig vom Resektionsausmaß und verbliebenen Lebergewebe (51). Xie et al haben in ihrer Arbeit gezeigt, dass für Resektionsmodelle mit 80%-iger Resektion des Lebervolumens, der Hepatozytenproliferationsindex nur gering über dem der Schein Gruppe und weit unterhalb von Operationsgruppen mit geringeren Resektionsvolumina liegt (51).

Für den Ischämie-Reperfusionsschaden wurde in der Forschung lange die Nekrose als führender Zelltodmechanismus angenommen (71,72,75,139–141). Wissensstand aktueller Forschung ist andererseits, dass Nekrose durchschnittlich erst nach drei Stunden eintritt und auch dann erst morphologisch nachweisbar ist (144) (64) (51). Für Ischämie induzierten irreversiblen Zelltod der Hepatozyten geben Majno et al eine Dauer von ca. 150 Minuten an (108). Kalte Ischämie gefolgt von Reperfusion ist beispielsweise ein typischer Stimulus für onkotische Nekrose, die binnen Minuten eintritt (73). Dass der Zelltod vielfältigere Wege nimmt, als ausschließlich Nekrose, ist heutzutage weitgehend etabliert und wurde in den vorhergehenden Kapiteln ausführlich erörtert, ebenso die Möglichkeit des fließenden

Übergangs zwischen den Zelltodformen. Die Forschung spricht dafür, dass die Vorgänge des Zelltods komplex sind und nicht ausschließlich unreguliert ablaufen (64,73).

Für den alleinigen Reperfusionsschaden sind die genaueren Formen des Zelltods und deren Eintrittszeitpunkt und Mechanismen Gegenstand aktueller Forschung und werden in dieser Arbeit weiter eruiert.

1.4 Baicalein

Baicalein, ein Flavon, ursprünglich extrahiert aus den Wurzeln japanischer Heilpflanzen *Scutellaria baicalensis* und *Scutellaria lateriflora* mit natürlichem Vorkommen in Thymian und indischen Trompetenblumen, werden hepatoprotektive Eigenschaften zugeschrieben (145,146). In der japanischen Heilpflanzenlehre kommt Baicalein als wesentliche Zutat in einem Heilsaft namens Sho-Saiko-To zum Einsatz (147). Auch in der traditionellen chinesischen Medizin kommt Baicalein in der Therapie von Lebererkrankungen zum Einsatz (148).

Die genauen protektiven Wirkmechanismen sind nicht abschließend geklärt, die Forschung hat im letzten Jahrzehnt allerdings entscheidende pathophysiologische Wege festgestellt.

Die Verringerung des ischämischen Reperfusionsschaden durch Baicalein wurde für das Herz und Hirn nachgewiesen (149,150). Leberschaden, induziert durch myokardiale Ischämie und Reperfusion, konnte ebenfalls durch die Behandlung mit dem Flavon signifikant reduziert werden (148).

Es konnte gezeigt werden, dass Baicalein eine ganze Reihe protektiver Wirkmechanismen zugeschrieben werden können. Hierzu zählen anti-apoptotische, anti-inflammatorische, anti-oxidative, anti-thrombotische und antiproliferative Wirkweisen (151–156) (155,157,158).

Durch die Behandlung mit Baicalein wurde die Apoptoserate in Hepatozyten in Experimenten mit hepatischem IRI signifikant reduziert (148) (151). Die Transaminaselevel zeigten sich, als laborchemischer Marker des Leberschadens, deutlich vermindert. Die Inhibition der intra- als

auch extrazellulär vermittelten Apoptose erfolgt über die direkte Hemmung der Signal-Zytokine wie TNF alpha, IL1- β und IL- 6 und Bax durch Baicalein. Hinsichtlich des Einflusses auf lebenserhaltende Kinasen, wie die extrazelluläre- Signal- regulierte Kinase 1 und 2 (ERK 1 und 2) und Bcl-2 nach Baicalein Behandlung, ergeben verschiedene Experimente und Studien unterschiedliche Ergebnisse: sowohl eine wesentliche Elevation wird beobachtet, als auch eine Suppression (159–161). Eine verminderte Neutrophileninvasion, sowie geringere Expression von NF-KB konnten nachgewiesen werden (148) (151). Versuchstiere wurden aktiv gegen Endotoxin vermittelte Schockreaktionen geschützt (162,163).

Der anti-inflammatorische Effekt wird neben der TNF alpha Blockade, des Weiteren über die Inhibition von Lipidoxygenase, genauer der 12/15-Lipidoxygenase, hervorgerufen (64,123,151). Wie schon oben genauer ausgeführt, wird über die Hemmung der 12/15-Lipidoxygenase Ferroptose inhibiert (127).

Die hemmenden Wirkungen von Baicalein auf die Lipopolysacharid (LPS)-induzierte proinflammatorische Zytokinexpression, wird durch die Blockierung der NF- κ B-Aktivierung vermittelt (162,163). Ebenso wird die LPS-induzierte Stimulation der Kupferzellen mit konsekutiver Ausschüttung von Zytokinen gehemmt (151).

1.5 DMSO – Dimethylsulfoxid

DMSO ist ein klares geruchloses flüssiges organisches Lösungsmittel aus der Verbindungsklasse der Sulfoxide (164). Andere polare und nicht polare, nicht wasserlösliche Medikamente und Reagenzien lassen sich gut in DMSO lösen, wie auch der Feststoff Baicalein. DMSO selbst ist hydrophil, und verdampft schnell (165,166) (167,168). Dimethylsulfoxid wird industriell aus Dimethylsulfid, einem Nebenprodukt des Kraft-Prozesses, durch Oxidation mit Sauerstoff oder Stickstoffdioxid hergestellt, dabei entsteht aus festem Holz Zellstoff, welches für die Papierproduktion genutzt wird.

Klinische Studien für medizinische Anwendungen von Dimethylsulfoxid (DMSO) in den 1960er Jahren berichteten über Toxizität, jedoch wurde DMSO später in die sicherste Lösungsmittelkategorie eingestuft (169).

Zu den physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften von DMSO zählen unter anderem, die schnelle Penetration und Verteilung selbst, diese gilt ebenfalls in der Funktion als Trägerlösung und fördert damit die rasche Verteilung anderer Substanzen, insbesondere transmembranös (166). DMSO gilt als anti-inflammatorisch, immunmodulatorisch, analgetisch, muskelrelaxierend und vasodilativ (170–172). Des Weiteren nimmt es Einfluss auf die Gerinnung, Anticholinesterase Aktivität und induziert die Histaminfreisetzung durch Mastzellen (170). Einige wenige Studien wurden publiziert, in denen DMSO einen induzierten Ischämie - Hyperperfusionsschaden abmilderte und hepatoprotektive Wirkung aufwies (173–176).

1.6 Tacrolimus

Tacrolimus (FK506) ist ein Makrolidlacton und grampositives Bakterium, welches 1984 aus dem Bodenpilz *Streptomyces tsukubaensis* isoliert wurde (177). Das „T“ steht dabei für Tsukuba, Japan, wo es entdeckt wurde, „ACROL“ für Makrolid und „IMUS“ für Immunsuppression (178).

Tacrolimus gehört zu der Gruppe der Calcineurininhibitoren und wirkt über Hemmung des Calcineurin-Calmodulin-Komplexes immunsuppressiv. Im Vergleich zu dem 1984 entdeckten Calcineurininhibitor Ciclosporin A wirkt es bei niedrigeren Konzentrationen potenter und weist ein deutlich geringeres und weniger schädliches Nebenwirkungsprofil auf (179–181). Mitte der 90er Jahre wurde Tacrolimus in Japan, den USA und schließlich in Deutschland als Prophylaxe von Lebertransplantatabstoßungen zugelassen (182).

Tacrolimus bindet an einen im Zytosol liegenden Rezeptor, das Immunophilin FKBP12, und bildet einen Komplex namens „Calmodulin“, welcher an Calcineurin andockt und somit die calciumabhängige Phosphorylierung des intranukleären Transkriptionsfaktors „Nuklearfaktor

aktivierter T-Zellen“ (NF-AT) verhindert und darüber die Transkription von Interleukin 2 (IL-2) und seinem Rezeptor, IL-3 und INF- γ unterbindet mit konsekutiver T-Zell Suppression (62,179,180).

Auch die TNF- α Transkription in B-Zellen wird durch Tacrolimus gehemmt. TNF- α bindet an Rezeptoren der Hepatozytenoberfläche, um eine Überproduktion von Chemokinen wie ENA-78 (epithelial neutrophil activating protein -78) und ROS, NF-KB, mitogen-aktivierte Proteinase K und c-JUN N-terminale Kinase (JNK) zu induzieren und somit direkten Leberzellschaden zu verursachen (62). Weitere Transkriptionsfaktoren wie AP-1, AP-3, sowie die Degranulation von Mastzellen, IL 3 und 5 u.a. werden ebenfalls inhibiert (179) (180).

Die T-Zell-Suppression und damit die Unterbindung einer akuten Transplantatabstoßung ist die entscheidende Indikation für die therapeutische Anwendung von Tacrolimus nach Lebertransplantation.

Darüber hinaus wurden im Laufe der Jahrzehnte weitere allogenenunabhängige hepatoprotektive Effekte von Tacrolimus, insbesondere auf den gut erforschten hepatischen Ischämie- Reperfuionsschaden, beschrieben (62,180,183–186). Im Zuge verschiedener experimenteller Studien haben sich folgende hepatoprotektive Mechanismen nachweisen lassen: die Suppression der Expression von Adhäsionsmolekülen und damit Transmigration und Akkumulation von Neutrophilen, Lymphozyten und Blutplättchen, sowie der sinusoidalen Endothelzellen und Kupferzellen mit Abschwächung der Mikrozirkulationsstörung, der Entstehung oxidativen Stresses und Inflammation (62,187). Über den Tacrolimus geförderten intrazellulären Anstieg an Glutathion, wird ROS vermittelter Zellstress noch weiter reduziert (188). Sowohl in vitro, als auch in vivo experimentelle Studien haben nachgewiesen, dass Tacrolimus Fas-abhängig eingeleitete Apoptose inhibiert (189,190).

Nachdem etliche tierexperimentelle Studien einen günstigen Einfluss von Tacrolimus auf den hepatischen Ischämie Reperfusionsschaden aufzeigten (tierexperimentell: (191–197)) und

auch die Anwendung in klinischen Studien im Rahmen normaler Lebertransplantationen einen günstigen Einfluss aufwies (187,198), wurde 2016 die sogenannte TOP (Tacrolimus organ perfusion)- Studie, eine deutsche prospektive Multicenterstudie durchgeführt, in welcher nach einer ex vivo Behandlung mit Tacrolimus, vor Transplantation marginaler Lebertransplantate mit erweiterten Spenderkriterien, eine antiinflammatorische Wirkung und deutliche Verringerung des Ischämischen Reperfusionsschadens analog zu den experimentellen Studien erwartet worden war (183). Der Erfolg blieb aus und die Studie wurde aufgrund mangelnder Verbesserung der primären Endpunkte und frühzeitiger Verschlechterung von sekundären Endpunkten vorzeitig beendet.

1.7 Proapoptotische Proteine: C-Jun-N-terminale Kinase (JNK)

C-Jun-N-terminale Kinase (JNK) ist ein Mitglied der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Familie (MAPKinasen), welches durch unterschiedlichste Stimuli aktiviert wird. Hierzu zählen Zytokine (wie TNF alpha und Interleukin-1), reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Krankheitserreger, Toxine, Ischämie und Hypoxie, Stress des endoplasmatischen Retikulums, freie Fettsäuren (LPS) und metabolische Veränderungen (74). In der Leber kommen JNK 1 und JNK 2 vor (199). Nach Aktivierung induziert JNK mehrere biologische Ereignisse durch das Transkriptionsfaktor-Aktivatorprotein-1 und die transkriptionsunabhängige Kontrolle von Effektormolekülen (199). JNK-Isoenzyme regulieren Zelltod und -überleben, Differenzierung, Proliferation, ROS-Akkumulation, Metabolismus, Insulinsignalisierung und Karzinogenese in der Leber (200–202). Die biologischen Funktionen von JNK sind isoform-, zelltyp- und kontextabhängig. Studien mit gentechnisch veränderten Mäusen zeigten, dass der Verlust oder die Hyperaktivierung des JNK-Signalwegs zur Entwicklung von Entzündungen, Fibrose, Krebswachstum und Stoffwechselerkrankungen wie Fettleibigkeit, Leberverfettung und Insulinresistenz beiträgt (203).

Einer der am besten untersuchten Signalwege, ist die JNK-Aktivierung über TNF alpha. TNF alpha induzierte Akkumulation von ROS führt zu einer verstärkten JNK-Expression mit

anschließender Nekrose (202). Im hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden kommt es während der Reperfusionsphase durch oxidativen Stress, zur JNK1 Aktivierung mit konsekutivem Anstieg der AP-1 Aktivität und zum Zelltod (199,204). JNK-2 erhöht die mitochondriale Permeabilitäts Transition (MPT) mit vermehrtem Hepatozytenschaden nach IRI (205,206). NF-KB hat eine schützende und anti-apoptotische Wirkung, die ebenfalls die JNK-Signalkaskade beeinflussen kann. Hepatozyten mit NF-KB Mangel weisen deutlich höhere Level an IRI auf, inklusive höherer JNK-Expression (199,207).

Die, in dieser Arbeit verwendeten Antikörper der Firma Cell Signaling exprimieren ihr Molekulargewicht für das unphosphorylierte und phosphorylierte SAPK/JNK bei 46/54 kDA.

1.8 Proapoptotische Proteine: Extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK)

Der extrazellulär Signal regulierte Kinase (ERK)- Signalweg spielt eine entscheidende Rolle in fast allen Zellfunktionen. Je nach Zelltyp und Stimulus vermittelt die ERK-Aktivität verschiedene antiproliferative Ereignisse wie Apoptose und Autophagie, Zellproliferation und Zelltransformation (208,209). Die ERK-Aktivität kann entweder intrinsische oder extrinsische apoptotische Wege durch Induktion der mitochondrialen Cytochrom c Freisetzung oder Caspase 8 Aktivierung, permanenten Zellzyklusarrest oder autophagischer Vakuolisierung fördern (209). Die ERK-Aktivität ist wahrscheinlich vom Vorhandensein reaktiver Sauerstoffspezies abhängig (210–212). Die genauen Mechanismen für die ROS-vermittelte ERK-Aktivierung über den MAPK-Signalweg sind weitgehend unbekannt (213). Mindestens zwei Aktivierungswege konnten bereits nachgewiesen werden: die Aktivierung von EGFRs und die Deaktivierung von MAPK-Phosphatasen (214,215) .

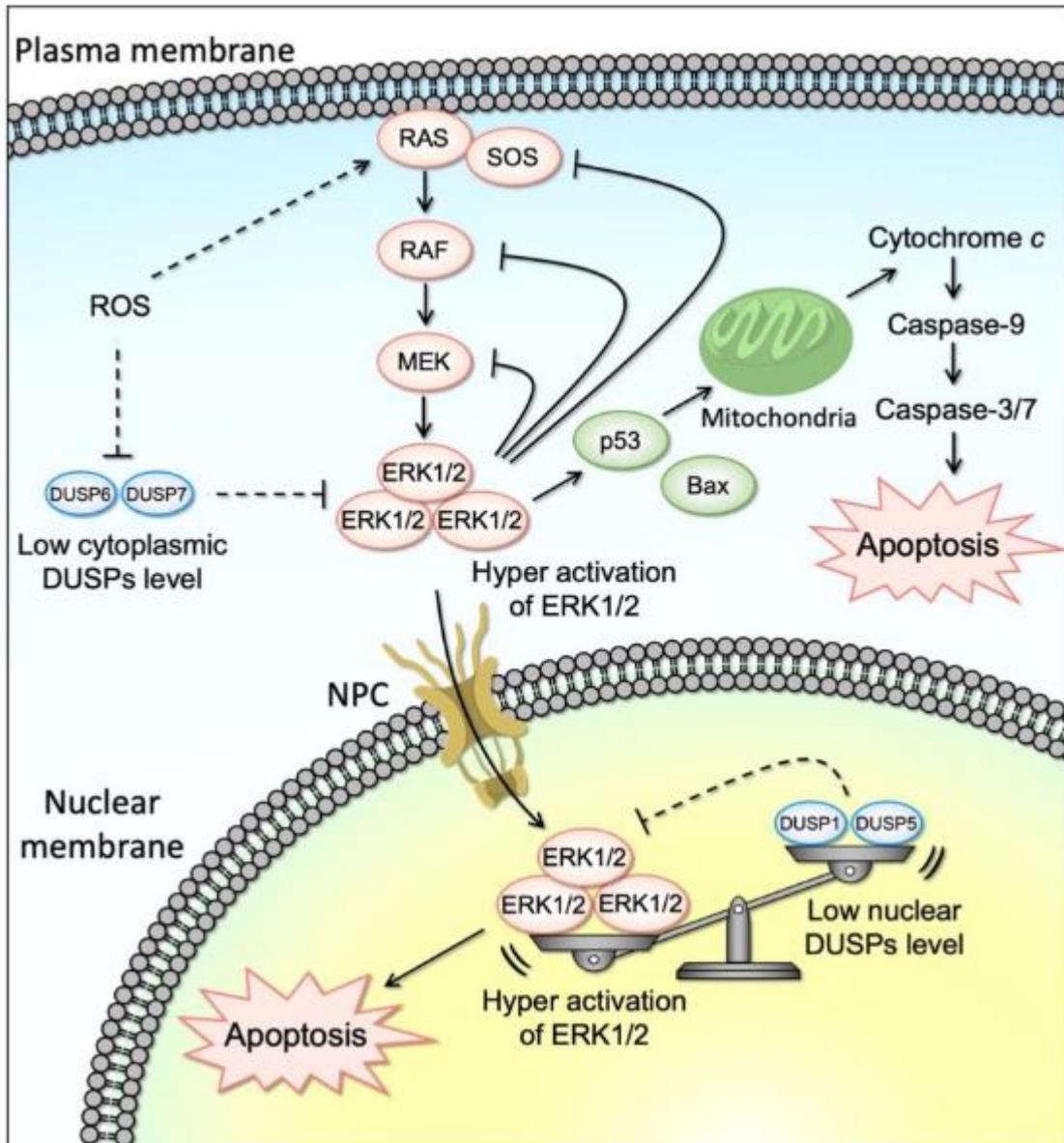


Abbildung 6. Abbildung 2. Die Aktivierung von ERK1/2-Upstream-Faktoren oder die Herunterregulierung von DUSP6/7 (Dual spezifische Phosphatase) durch verschiedene Reize (wie ROS) induziert die Aktivierung von ERK1/2 im Zytoplasma. Aktiviertes zytoplasmatisches ERK1/2 induziert die mitochondriale Apoptose oder wird über den NPC (Kernporenkomplex) in den Zellkern verlagert. Die Herunterregulierung von DUSP1/5 durch die Reize (wie ROS) induziert auch die Aktivierung von ERK1/2 im Zellkern. Folglich führt entweder die Herunterregulierung von zytoplasmatischen oder nuklearen DUSPs zur Akkumulation von aktiviertem ERK1/2 im Zellkern. Eine anhaltende ERK1/2-Aktivierung über einem bestimmten Schwellenwert aktiviert spezifische proapoptotische Ziele und induziert Apoptose. Aus Suigiura, 2021, ERK a double-edged sword in cancer: ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer (213).

Die ERK-Antikörper werden ebenfalls von Cell Signaling bezogen. Das Molekulargewicht des phosphorylierten, als auch des unphosphorylierten p44/42 MAPK (ERK 1/2) Antikörper liegt bei 42/44 kDA.

1.9 Proapoptotische Proteine: Caspase 3 (C3)

Caspase 3 gehört zu den Effektorcaspasen der Apoptose. Nach Aktivierung spaltet Caspase 3 Zellproteine wie PARP (216). Neben dem programmierten Zelltod regulieren die Caspasen auch Inflammation (217).

Der verwendete Caspase-3-Antikörper der Firma Cell Signaling zeigt sein Molekulargewicht bei 17,19, 35 kDA, wobei 17/19 kDA dem gespaltenen und 35 kDA dem ungespaltenen Anteil entsprechen (218).

1.10 Proapoptotische Proteine: Poly (ADP-ribose) -Polymerase (PARP)

Poly (ADP-ribose) -Polymerasen sind Enzyme, die an der DNA- Reparatur beteiligt sind. Insgesamt sind 18 PARP-Enzyme bekannt (219). Die wichtigste Aufgabe von PARP-1 ist das Aufspüren und die Reparatur von DNA-Schäden. In pathologischen Settings kommt es zur erhöhten Expression von PARP-1 (219). Es bestehen Hinweise, dass PARP-1 mit erhöhter Aktivität selbst zur DNA-Fragmentierung führt und eine essentielle Rolle in der genomischen Stabilität der Zellen spielt, sowohl hinsichtlich der DNA-Reparatur, als auch in der direkten Einleitung des Zelltods (220). Während der Apoptose kommt es zur Proteolyse von PARP (221,222). Durch die Spaltung von PARP in c-PARP (gespaltenes PARP) durch Caspase 3 wird PARP inaktiviert und dessen DNA-Reparaturfähigkeiten gehemmt (223).

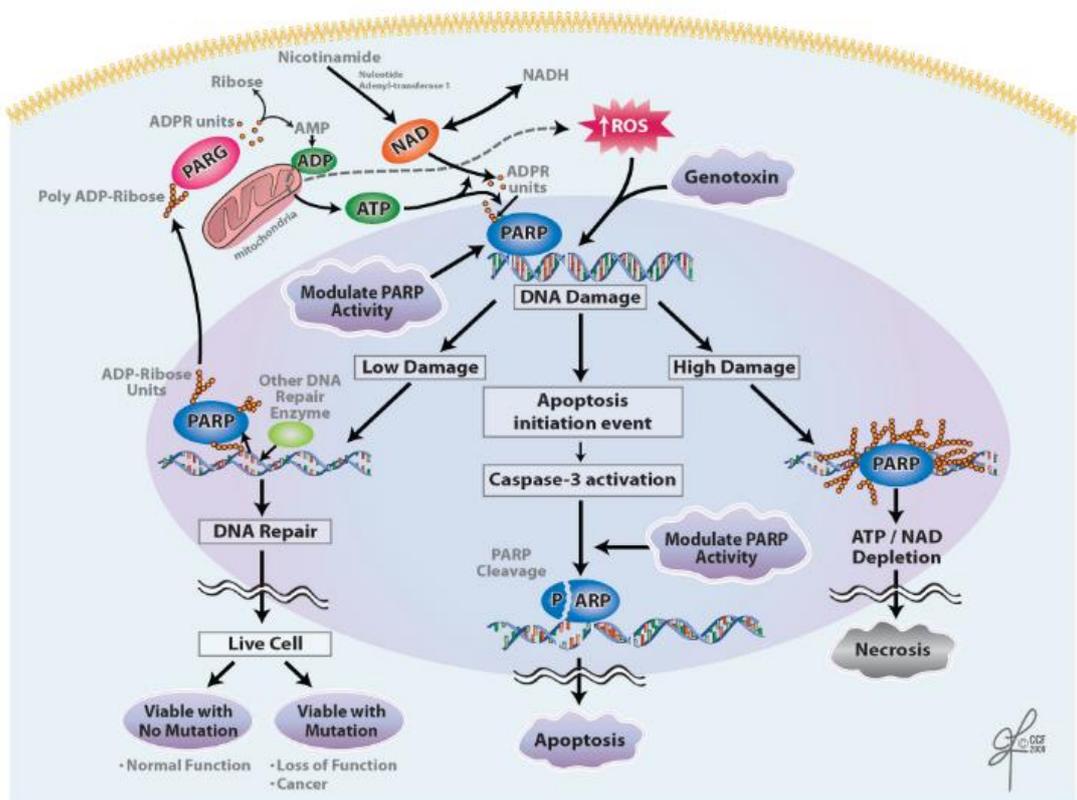


Abbildung 7: Rolle von PARP beim Zelltod. Aus potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes in *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009 (223).

Im Falle einer DNA-Schädigung durch ROS oder ein Genotoxin kann PARP je nach Ausmaß des Schadens unterschiedliche Rollen einnehmen. Wenn ein hoher Schaden auftritt, kann PARP überaktiviert werden, was zu ATP/NAD-Depletion und Nekrose führt (224). Die durch Caspase 3 Aktivierung erfolgte PARP-Spaltung mündet in Apoptose. Bei geringer Schädigung kann PARP andere Reparaturenzyme rekrutieren und somit eine DNA-Reparatur stattfinden. Die Forschung berichtet ferner über caspaseunabhängigen PARP-abhängigen Zelltod, bezeichnet als Parthanatos, welcher sich von Apoptose, Nekrose oder Autophagie unterscheidet (223,225,226). Starke DNA-Schäden bedingen eine Hyperaktivierung von PARP1 und stimulieren die Kerntranslokation des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) und beschleunigen den Abbau von Nicotinamidadeninukleotid (NAD⁺) und Adenosintriphosphat (ATP), was zur DNA-Fragmentierung führt. Zu den Mechanismen von Parthanatos gehören hauptsächlich DNA-Schäden, PARP1-Hyperaktivierung, PARP-Akkumulation, NAD⁺- und ATP-Depletion sowie

AIF-Kerntranslokation. Beschrieben wurde diese gesonderte Form des Zelltods für unter anderem Tumore, Ischämie-Reperfusionsschäden, Netzhauterkrankungen, neurologischen Erkrankungen, Diabetes, Nierenerkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und ist damit weit verbreitet (227). Insbesondere ROS wird im Rahmen der DNA-Schädigung und in der pathophysiologischen Kaskade für Parthanatos eine entscheidende Rolle zugeschrieben (228).

PARP-Antikörper der Firma cell signaling mit einem Molekulargewicht von 89 kDA für das gespaltene PARP und 116 kDA für das ungespaltene Enzym werden verwendet.

1.11 Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

GAPDH wird in fast allen Geweben mit hoher Rate ubiquitär exprimiert und eignet sich somit als Ladekontroll-Antikörper im Rahmen von Western Blot Analysen. Diese Ladekontrollen sind notwendig für die korrekte Interpretation des Western Blots. Sie werden verwendet, um die Expressionslevel zu vergleichen und um sicherzustellen, dass die Proteinmenge gleichmäßig verteilt ist. Die Signale der Ladekontrolle liegen zwischen den verschiedenen Probenspuren und sollen nicht variieren. Es eignen sich Proteine als Ladekontrolle, welche eine hohe Expression in dem zu untersuchenden Zelltyp oder Gewebe aufweisen. Ebenfalls wichtig ist, dass die Ladekontrolle ein anderes Molekulargewicht aufweist, als die zu untersuchende Proteine, sodass die Banden eindeutig voneinander abgegrenzt werden können und quantifizierbar sind (229).

Für die hier durchgeführten Versuche wird der monoklonale Antikörper GAPDH (14C10) Rabbit mAB der Firma Cell Signaling mit einem molekularen Gewicht von 37 kDA verwendet (230).

2. Fragestellung

Aufgrund des hohen therapeutischen Stellenwertes der Leberchirurgie ist es unabdingbar, die mit der Operation einhergehenden Komplikationen adäquat behandeln zu können. Für die Prognoseverbesserung nach ausgedehnter Leberresektion oder auch Transplantation marginaler Lebertransplantate ist damit die Etablierung neuer Therapiestrategien für die Komplikationsbehandlung essentiell.

Hierzu gilt es die pathophysiologischen Mechanismen des Reperfusions- bzw. Hyperperfusionsschadens besser zu verstehen, um mit Hilfe neuer Therapieansätze diesen abzuschwächen oder gänzlich zu eliminieren. Hierzu wurden in den letzten Jahrzehnten etliche chirurgische wie medikamentöse Therapieansätze erforscht, ohne bisher durchbrechende Erfolge. Zur Erforschung weiterer möglicher Therapiestrategien wurden im Rahmen, der hier durchgeführten Experimente, folgende Fragen erörtert:

- Inwiefern spielt Zelltod als zentrale Pathologie im hepatischen Hyperperfusionsschaden eine Rolle? Wie ausgeprägt ist die quantitative Zelltodrate nach ausgedehnter Leberresektion?
- Können die anti-inflammatorischen und anti-oxidativen Eigenschaften von Baicalein den hepatischen Hyperperfusionsschaden günstig beeinflussen und darüber hinaus auch Zelltod inhibieren?
- Lässt sich der hepatische Hyperperfusionsschaden durch den Calcineurininhibitor Tacrolimus abmildern?
- Welche Rückschlüsse lassen sich auf die, dem SFSS zugrunde liegenden Zelltodformen anhand der Ergebnisse ziehen?
- Welche pathophysiologische Signalkaskade macht den größten Anteil, in den durchgeführten Experimenten aus und lässt sich jeweils durch Tacrolimus und Baicalein am Stärksten beeinflussen?
- Führt die duale Applikation beider Therapeutika, Tacrolimus und Baicalein, zu einer noch weiteren Verbesserung des Hyperperfusionsschadens?

- Gibt es Hinweise für potentiell toxische Einflüsse auf den Hyperperfusionsschaden durch die verabreichten Medikamente?

Zur Erörterung dieser Fragen wird eine Experimentreihe im Mausmodell mit Durchführung einer 75%-igen Leberresektion und in vivo Applikation der Therapeutika Tacrolimus und Baicalein durchgeführt (231).

3. Material und Methoden

Alle Versuche wurden von August 2014 bis Januar 2016 am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilian-Universität durchgeführt.

3.1 Methodik und Vorgehen

Die 75%-ige Leberresektion im Mausmodell wird gewählt, um eine erweiterte Hepatektomie zu erzielen und somit ein verbleibendes Lebervolumen untersuchen zu können, dass mit einer SFSS-Leber, auch in Hinblick auf die Volumenkriterien, übereinstimmt, gleichzeitig einen sicheren Versuchsablauf garantiert ohne intraoperativen Exitus und ausreichend zu untersuchendes Lebergewebe für die anschließenden Untersuchungen bereitstellt (51,71,232).

Die gewählten Reperfusionzeiten orientieren sich an experimentell benannten Zeiträumen, für die Entwicklung der pathophysiologischen Kaskade, die im SFSS mündet. Forschungsprojekte für den Re- und Hyperperfusionsschaden zeigen (Vergleich 1.2.1.2), dass sich nach einer Stunde Reperfusion der Höhepunkt der arteriellen und portalvenösen Hyperperfusion, sowie der sinusoidale Endothelschaden mit Zellruptur einstellt (51). Aus Arbeiten zum hepatischen IRI ergeben sich Daten, dass irreversibler Zelltod nach 150 Minuten und Nekrose ab 180 Minuten eintritt (108,191). Die Forschungsgruppe um D. Crenesse et al hat für den hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden im Rattenmodell mit warmer Ischämie über 120 Minuten und einer Reperfusion über 240 Minuten, die angegeben Zeiten so gewählt, dass nach ihrer Recherche eine maximale Apoptoserate nachzuweisen sei, damit bezogen sie sich auf eine Arbeit von Cursio et al aus dem Jahr 1999 (190,233).

Die, in dieser Arbeit gewählten Hyperperfusionzeiten bilden das Spektrum der frühen bis späten Phasen des Reperusions- und Hyperperfusionsschaden ab und ermöglichen ferner, anhand der durchgeführten Experimente, zum Nachweis von Apoptose, Aussagen über die Quantität und Form des Zelltods zu treffen.

Die ausgewählten Substanzen Baicalein und Tacrolimus greifen, wie oben berichtet (Vergleich 1.4 und 1.6) an multiplen Schlüsselstellen der pathophysiologischen Vorgänge, die das SFSS bedingen, an. Zu beiden Medikamenten sind aussichtsreiche Publikationen in Hinblick auf die Abschwächung des Ischämie- und Reperfusionsschaden und anderen pathophysiologischen inflammatorischen und Zelltod-vermittelnden Signalkaskaden publiziert (58,62,146–160,162,163,180–182,184,185,187,189–191,193–198,234–239). Insbesondere aufgrund der anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen und anti-oxidativen Wirkung wird Baicalein verwendet. Neben der anti-inflammatorischen TNF-alpha und NFkB-Blockade, scheint auch die Inhibition der 12/15 Lipidoxygenase und der darüber gesteuerten Inhibition der Ferroptose interessant. Unsere Arbeitsgruppe hat bereits erfolgreich eine Inhibition von Zelltod im Ischämie-Reperfusionsschaden durch den Einsatz von Baicalein nachgewiesen und konnte ferner zeigen, dass Ferroptose eine Schlüsselrolle einnimmt (64). Tacrolimus hat sich in erwähnten Forschungsprojekten bereits bewährt und zu der, oben zitierten, TOP-Studie geführt. Tacrolimus wirkt bereits in der frühen Phase des Re- und Hyperperfusionsschadens der pathophysiologischen Signalkaskade entgegen, in dem es Mikrozirkulationsstörungen verhindert und endotheliale Apoptose. Die, in den späten Phasen des Re- und Hyperperfusionsschaden, pathophysiologischen Angriffspunkte von Tacrolimus sind insbesondere die Interleukin- und TNF-alpha vermittelte Inflammation und Neutrophilenmigration mit ROS-Aktivierung und konsekutivem Zelltod. Die TNF alpha Blockade führt zur direkten Inhibition pro-apoptotischer Enzyme (180). Darüber hinaus wird durch den Einsatz von Tacrolimus, der sich selbst unterhaltende Inflammations-Teufelskreis inhibiert: Die Reoxygenierung führt u.a. über MPT zum Zelltod, in der Umgebung tritt Inflammation auf, Zytokin vermittelt werden weitere inflammatorische Zellen aktiviert, die wiederum die Inflammation aggravieren. Innerhalb dieses Inflammationszyklus kann Tacrolimus an verschiedenen Stellen gezielt wirken: Inhibition der Zytokine und pro-inflammatorischen migrierenden Zellen, Inhibition der MPT und des Zelltods, der Mikrozirkulationsstörung und des oxidativen Stresses (Vergleich Kapitel 1.6 und 1.3, insbesondere 1.3.3).

3.2 Versuchstiere

Bei allen Versuchstieren handelt es sich um männliche black six Mäuse C57 BL/6-Mäuse im Alter von acht bis zwölf Wochen mit ca. 25 Gramm Körpergewicht. Bezogen wurden die Tiere vom Tierzuchtlieferanten Charles Rivers Wiga, Sulzfeld Bayern. Vor der Durchführung der Versuche wurden die Tiere eine Woche in der Tierhaltung des Instituts für Chirurgische Forschung (Tierschutzbeauftragter Dr. med. vet. Mehdi Shakarami) in einer pathogenfreien Umgebung mit 24°C und 60% Luftfeuchtigkeit gehalten. Pro Käfig wurden maximal vier Mäuse gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter.

Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen Nr. 55.2.1.54-2532-100-11, Aktenzeichen Nr. 55.2-1-54-2532.0-20-14, Genehmigung: 18.09.2014). Jeder Versuch wurde mit der Exsanguination sowie einer zervikalen Dislokation zur Euthanasie der Versuchstiere beendet. Die verstorbenen Versuchstiere wurden gemäß interner Standardverfahren der chirurgischen Forschung kremiert.

3.3 Operationsinstrumente und Zubehör

Reagenzien, Zubehör	Hersteller
Isopropanol 70%	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)
Hautantiseptikum kodan® Tinktur forte farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt (D)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Heparin-Natrium Braun 25.000 I.E./5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Ketamin-Hydrochlorid (Ketavet®) 100 mg/ml (20 ml)	Pfizer, NYC (USA)
Medetomidinhydrochlorid 1mg/ml (10 ml)	Fort Dodge Animal Health, Iowa (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt (D)
Baicalein	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Tacrolimus (PROGRAF®)	Astellas Pharma GmbH, München (D)

<p>Flüssiger Stickstoff</p> <p>Formaldehyd 4% (Formalin)</p> <p>Ethanol in einer Konzentration von 70%, 80%, 90% und 100%</p> <p>Xylol</p> <p>Paraffinwachs (Tissue-Tek®)</p> <p>Vortex Genius 3</p> <p>Plastikpak Spritze Luer 1 ml</p> <p>Flacon Tube 50 ml</p> <p>Strican Kanüle Luer 0.3 x 12 mm (30 G x 0.5 in)</p> <p>Microlance 3 Kanüle Luer 0.9 x 40 mm (20G x 1.5 in)</p> <p>Discardit II Spritze Luer 5 / 10 / 20 ml</p>	<p>Linde AG, München (D)</p> <p>Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)</p> <p>Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)</p> <p>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)</p> <p>Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)</p> <p>Sigma Aldrich, St.Louis, (USA)</p> <p>Becton Dickinson, Kelberg (D)</p> <p>Becton Dickinson, Kelberg (D)</p> <p>B.Braun, Melsungen AG, Melsungen (D)</p> <p>Becton Dickinson, Kelberg (D)</p> <p>Becton Dickinson, Kelberg (D)</p>
---	--

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Materialien inkl. Herstellerangaben für die Probenasservation nach Durchführung des operativen Experimentenanteils.

Die Operation erfolgte unter einem Operationsmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena (D)).

Operationsinstrumente- und Zubehör	Hersteller
Operationstisch mit unterliegender Wärmeplatte	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Rosdorf (D)
Einmalspritze (1 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Einmalkanüle (25 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Chirurgische Schere	Gebrüder Martin GmbH & Co. KG, Tuttlingen (D)
Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Mikroschere	S&T AG, Neuhausen (CH)
Sterile Kompressen	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf (D)
Wattestäbchen	dm-drogerie markt GmbH & Co. KG, Karlsruhe (D)
Bipolare Pinzette mit Elektromodul Erbe	Elektromedizin GmbH, Tübingen (D)
Chirurgische Mikropinzette	S&T AG, Neuhausen (CH)

Anatomische Mikropinzette	S&T AG, Neuhausen (CH)
Gefäßdilator	S&T AG, Neuhausen (CH)
Metallhaken	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Fine-Bore Polyethylene Katheterschlauch (Innendurchmesser 0,28mm)	Smiths Medical International Ltd., Ashford (UK)
Geflochtene Ligatur 4-0 Ethicon	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt (D)
Mikroclip/-gefäßklemme mitsamt Klemmenanlegepinzette	S&T AG, Neuhausen (CH)
Druckwandler (P23 ID)	Gulton Statham Inc., Costa Mesa (USA)
Elektromanometer (Press. Ampl. 863 E154E)	Siemens Medizintechnik, München (D)
Multipler Clip-Applikator, (LIGACLIP® MCA) Der Größe M und S	Ethicon Endo Surgery, LLC (USA)
Nicht resorbierbarer geflochtener schwarze Seidenligatur, Gewindegröße 6 – 0, item no 18020-60	F.S.T., Fine Science Tools (USA)
Serum-Mikro-Probengefäß mit Gerinnungsaktivator, 1,3ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg (D)
Pipettierhilfen und Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Einmalskalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Wärmeschrank	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach (D)
Paraffinausgießkonsole (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)
Paraffinausgießformen (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)
Paraffinkühlplatte (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)
Paraffineinbettkassette (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen (D)

Tabelle 2: Übersicht des verwendeten Operationsbestecks und Zubehörs inkl. Herstellerangaben.

3.4 Modell

In allen Experimenten wurde unter dem Operationsmikroskop eine 75- %ige Leberresektion im Mausmodell durchgeführt. Die Operationstechnik erfolgte in Anlehnung an die Forschungsgruppe um Hori et al (232). Die Operationen erfolgten unter sauberen, keimarmen Hygienebedingungen und nach alkoholischer Felldesinfektion der Tiere. Alle Instrumente wurden vor und nach Durchführung eines Experimentes alkoholisch desinfiziert.

3.4.1 Anatomie der Mausleber

Die Leber der Maus wird unterteilt in drei Leberlappen, den rechten, linken und kaudalen Lappen mit insgesamt sechs Segmenten. Das rechte anteriore Segment (RAS), das rechte mittlere Segment (RMS) und das rechte posteriore Segment (RPS). Sowie das linke anteriore Segment (LAS), das linke posteriore Segment (LPS) und das omentale Segment (OS).

In der hier durchgeführten Studie erfolgte die 75%-ige Leberresektion mit Entfernung des OS, LPS, LAS und RAS. Das RMS und RPS - mit prozentualen Volumenanteilen von durchschnittlich RMS + RPS, $26.4\% \pm 3.8\%$ - verblieben für die Beobachtungsdauer in situ. So dass eine 75%-ige Leberresektion (232), mit anschließender Hyperperfusion der 25%-igen Restleber vorgenommen wurde.

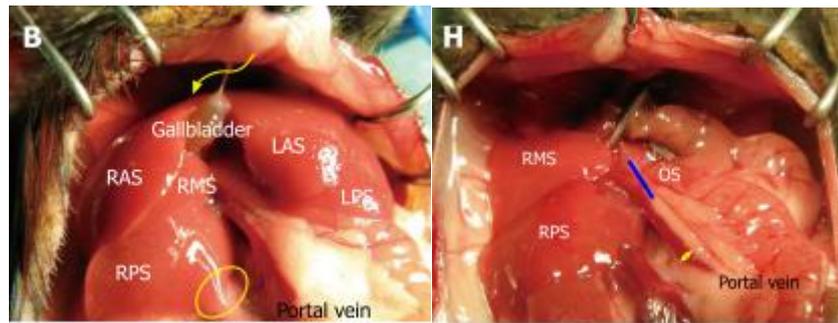


Abbildung 8: Lebersegmente und Hepatektomie durch Naht- oder Cliptechnik aus Hori et al, 2012 (232).

B: Die Mäuseleber in sechs Segmenten (RAS, RMS, RPS, LAS, LPS und OS) mit Darstellung der Gallenblase.

H: Verbliebene Lebersegmente (RMS und RPS) in situ während der Reperfusion nach Clip und Ligatur mit Resektion der anderen Lebersegmente.

3.5 Operatives Vorgehen

3.5.1 Anästhesie

Die Tiere erhielten eine intraperitoneale Narkose in den linken Unterbauch. Die Narkose wurde nach hausinternem Protokoll vor jedem Versuch neu vorbereitet. Das Narkosegemisch bestand aus dem nicht kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin (75mg/kgKG) und dem α -2-Rezeptor Agonist Medetomidin (1mg/kgKG) im Verhältnis 3:4 (Volumen). Dies entsprach 44 μ l Narkosegemisch bei 25g schweren Mäusen. Nach Sicherstellung des Wirkeintritts der Narkose und Schmerzfreiheit der Tiere, durch Überprüfung des Lidreflexes und der interdigitalen Schmerzwahrnehmung wurden die Tiere in Rückenlage auf eine Wärmeplatte (37°C) gelegt, an den abduzierten Extremitäten fixiert und der Kopf in gering überstreckte Haltung gebracht.

Zur Kreislaufüberwachung wurde der mittlere arterielle Blutdruck mit Hilfe eines in die linke Arteria carotis eingebrachten Katheter überwacht. Diese Überwachung erfolgte beispielhaft an der Hälfte der Versuchstiere pro Gruppe. Tiere mit Blutdruckkrisen wurden aus den Experimenten ausgeschlossen.

3.5.2 Operationsablauf

3.5.2.1 Karotiskanülierung

Präoperativ wurde ein subkutanes Flüssigkeitsdepot von 1 ml isotoner Kochsalzlösung appliziert. Nach alkoholischer Hautdesinfektion erfolgte in der Mittellinie ein Hautschnitt von der unteren Mandibula bis oberhalb des Sternums. Die weitere Präparation erfolgte stumpf mit Hilfe von Wattestäbchen. Zunächst wurde die Glandula submandibularis sinistra, sowie die Halsmuskeln zur Seite verdrängt und mit Hilfe eines Hakenhalters zurückgehalten. Die Arteria carotis wurde in der Tiefe aufgesucht und dargestellt. In der Regel wurde die linke Seite verwendet. Hierzu wurde sie unter Schonung des Nervus vagus mit Hilfe gebogener Pinzetten behutsam aus ihren bindegewebigen Verbindungen gelöst und im kranialen Abschnitt (anteriore Ligatur) mit einem Seidenfaden umschlungen und knapp unterhalb der Gabelung der Arteria carotis in die Arteria carotis externa und interna ligiert. Kaudal wurde ein geknoteter Faden (posteriore Ligatur) vorgelegt und knapp distal hierzu eine Mikroklemme gesetzt. Die Fäden der anterioren Ligatur wurden mit einer Bulldogklemme unter Spannung gesetzt, so dass die Arterie ebenfalls unter Zug geriet und nun die Inzision in die Arterie mit Hilfe einer Mikroschere problemlos durchgeführt werden konnte. Das Blut wurde mit einem Wattestäbchen aufgetupft und ein Tropfen NaCl-Lösung in das Operationsgebiet gegeben, um eine Austrocknung der Carotis zu verhindern. Mit einer geraden Pinzette wurde der kaudale Abschnitt der Inzision angehoben und der Karotiskatheter vorsichtig in die Arteria carotis sinistra vorgeschoben. Als nächstes wurde der vorgelegte Knoten ligiert, so dass der Katheter nicht verrutschen konnte. Die verwendeten Karotiskatheter wurden eigens aus Polyethylen angefertigt. Die Gefäßklemme wurde entfernt und die Blutdrucküberwachung begonnen. Hierbei wurde nicht auf absolute Werte Wert gelegt, sondern viel mehr auf einen stabilen Blutdruck während der gesamten Operation, um sicherzustellen, dass der im weiteren Operationsablauf entstehende Leberschaden reperusionsbedingt stattgefunden haben würde und nicht einem Kreislaufversagen unterlag.



Abbildung 9: Kanülierung der A. carotis interna dextra mit einem Polyethylenkatheter für die makrohämodynamische Überwachung während des Experiments.

3.5.2.2 75%-ige Leberresektion und Induktion der Hyperperfusion

Nach alkoholischer Hautdesinfektion erfolgte zunächst eine mediane Laparotomie, wobei zuerst mit einer Instrumentenschere ein Hautschnitt von oberhalb der Blase bis unterhalb des Processus xiphoideus des Brustbeins durchgeführt wurde, danach erfolgte die blutarme Durchtrennung und Eröffnung des Peritoneums mit einer Mikroschere. Für optimales Arbeiten im Operationsgebiet wurden zwei Hakenhalter zum Zurückhalten der Rippenbögen und Bauchwand benutzt. Eine Kompresse wurde leicht mit NaCl-Lösung befeuchtet und neben den offenen Situs gelegt, mit zwei befeuchteten Wattestäbchen wurde der Darm vorsichtig mobilisiert und aus der Bauchhöhle auf den mit NaCl-befeuchteten Tupfer gelegt und bedeckt. Als nächstes erfolgte mit Hilfe zweier befeuchteter Wattestäbchen die schonende Präparation der Leber beginnend mit den beiden omentalen Leberlappen. Hierzu wurde der linke posteriore Leberlappen (LPS) nach kranial angehoben, so dass der rechte Anteil des omentalen Lappens sichtbar wurde, dieser wurde nun mit Hilfe einer Mikroschere vorsichtig aus den fixierenden Verbindungen gelöst. Dann wurde der Magen auf die rechte Seite gelegt, sodass der dorsal liegende linke Anteil des omentalen Lappens von seinen verbindenden Bandstrukturen zur Milz und zum Magen gelöst werden konnte. Der Magen wurde in seine ursprüngliche Position repositioniert und der linke omentale Lappen dorsal

des Magens neben den rechten omentalen Lappen gezogen. Nun wurde ein Seidenfaden um beide Leberlappen gelegt und behutsam im Bereich der Pedikel ligiert und geknotet. Darauf wurde ein Clip der Größe S distal der Ligatur gesetzt. Nun konnten die omentalen Lappen mit einer Mikroschere distal des gesetzten Clips abgetrennt werden. Es folgte die Resektion des linken posterioren Leberlappens, welcher behutsam mit den befeuchteten Wattestäbchen nach kaudal gezogen wurde, ein Faden wurde um den Hilus gelegt, ligiert und geknotet. Daraufhin wurde ein Clip Größe M distal der Ligatur gesetzt und der linke posteriore Leberlappen mit einer Mikroschere reseziert. Zur Resektion des linken anterioren Leberlappens und des rechten anterioren Leberlappens wurden die Lappen nach kaudal mobilisiert, so dass eine gute Sicht und ein guter Zugangsweg bestanden. Das Ligamentum falciforme wurde dargestellt und durchtrennt ohne dabei die Vena cava inferior zu verletzen. Die mobilisierten Lappen wurden ligiert und mit einem Clip der Größe M von der Durchblutung abgetrennt und anschließend reseziert

Die Clips wurden direkt distal der Ligatur mit ca 1 mm Abstand zum zu resezierenden Leberlappen gesetzt, die Resektion wurde mit einem Abstand von ca 3 mm zum Clip durchgeführt. Die Dunkelfärbung des ligierten und geklippten Leberlappens zeigte sich binnen Sekunden und bestätigte die Ischämie. Nach jeder Resektion und vor Verschluss des Abdomens wurden alle Resektionsränder aufmerksam überprüft.

Der rechte mittlere Leberlappen und der rechte untere Leberlappen verblieben in situ und waren zu jedem Zeitpunkt ohne Einschränkung perfundiert.

Das Abdomen wurde mit auf 37°C angewärmter NaCl-Lösung gefüllt, der Darm zurück in die Bauchhöhle gelegt und das Abdomen mit einer gebogenen Klemme verschlossen, ohne dass diese Druck auf den Körper der Maus ausübte. Der Beginn der experimentellen Beobachtungszeit, entsprechend der Hyperperfusionszeit, wurde ab Beendigung der Resektion des linken und rechten anterioren Leberlappens gemessen.

Als Intervall für die Hyperperfusion wurden in Anlehnung an frühere Beobachtungen, die eine Initiierung der hepatotoxischen Prozesse zwischen 90 und 240 Minuten belegten, gewählt.

Im Anschluss an die Hyperperfusionsdauer wurde die Bauchhöhle erneut eröffnet, der Darm wie zuvor ex situ mobilisiert und anschließend die Blutprobenentnahme mit einer 25 G Kanüle vorsichtig aus der infrahepatischen Vana cava inferior und damit die Exsanguination des Versuchstiers durchgeführt.

Im Anschluss wurden der RMS und RPS mit der Mikroschere von den Leberpedikeln getrennt und asserviert.

3.5.3 Probenasservierung

Der RPS wurde mit einem Skalpell in zwei geteilt, die eine Hälfte zur Asservierung in 4-%iges Formalin eingelegt und die zweite Hälfte in Flüssigstickstoff schockgefroren. Der RMS ebenfalls in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die weitere Aufbewahrung der schockgefrorenen Proben erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Verwendung für die folgenden Analyseschritte.

Die in Formalin asservierte Gewebeprobe wurde unter Anwendung eines hausinternen Protokolls mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin gegossen.

Protokoll der aufsteigenden Alkoholreihe

Die Gewebeprobe des RMS wurde bis zum Folgetag in 4-%igem Formalin belassen, dann für eine Stunde bewässert und in 70%-igen Alkohol gelegt, für mindestens 30 Minuten und maximal 14 Tage.

Eine aufsteigende Alkoholreihe zur Paraffinierung wurde wie folgt durchgeführt:

30 min – 70%-iger Alkohol

30 min – 80%-iger Alkohol

30 min – 96%-iger Alkohol

30 min - 96%-iger Alkohol

30 min – 100%-iger Alkohol

30 min – 100%-iger Alkohol

30 min - Xylol

30 min - Xylol

Die Aufbewahrung erfolgte im Paraffinschrank über Nacht und am Folgetag die Überführung in frisches Paraffin für 1 -2 Stunden, dann der Ausguss. Nach Aushärtung konnten am Folgetag die Gewebeschnitte am Mikrotom angefertigt werden.

3.5.4 Scheinoperationen

Für die bessere Vergleichbarkeit und Auswertung der Experimente und Versuchsergebnisse erfolgten Scheinoperationen. Die Narkosedurchführung erfolgte analog zu denen der Experimente. Die Versuchstiere wurden einer medianen Laparotomie unterzogen, der Darm wurde unter Vorsicht stumpf präpariert und extrakorporal in eine mit warmem Kochsalz getränkte Kompresse gebettet. Die bindegewebigen Strukturen um die sechs Leberlappen wurden gelöst und das Ligamentum falciforme scharf mit der Mikroschere durchtrennt. Die nun mobilen Leberlappen wurden dann nicht weiter präpariert, das Darmpaket in situ zurückgelegt und die Bauchdecke mit einer gebogenen Klemme, wie in den restlichen Experimenten erneut verschlossen. Die Dauer der Scheinoperation wurde durch die Hyperperfusionszeiten der Experimentalreihen determiniert.

Nach abgeschlossener Scheinoperationsdauer, konnte die Probenasservierung erfolgen. Diese wurde analog zu den Experimenten durchgeführt: die Serumprobengewinnung und damit Exsanguination erfolgte aus der infrahepatischen Vena cava inferior. Das RMS und RPS wurden via Clip-Technik und anschließender Resektion mit dem Skalpell für die weitere

Analyse explantiert und wie zuvor beschrieben in 4%-igem Formalin und Flüssigstickstoff asserviert.

3.6 Analyseverfahren

3.6.1 Makrohämodynamik

Die Hämodynamik wurde exemplarisch bei der Hälfte der Versuchstiere je Gruppe standardisiert durchgeführt, um sicherzustellen, dass eine stabile Blutdrucksituation periinterventionell vorlag und die Experimentergebnisse verlässliche Aussagen hinsichtlich des etablierten Hyperperfusionsschadens gewährleisten und nicht durch hämodynamischen Stress beeinflusst wurden.

Der Blutdruck wurde mittels invasiver Blutdruckmessung aus der A. carotis sinistra abgeleitet. Hierzu diente ein eigens angefertigter mit Kochsalzlösung gespülter Karotiskatheter aus Polyethylenfaden. Das mechanische Blutflusssignal wurde an einen Druckwandler weitergeleitet und in ein elektrisches Impedanzsignal umgewandelt. Dieses wiederum konnte durch ein Elektronenmanometer computergestützt ausgewertet und als graphische Blutdruckkurve dargestellt werden. Das LabChart des von ADInstruments verwendeten digitalen Programms, zeigte neben den Blutdruckkurven auch den mittleren errechneten Blutdruck und die Herzfrequenz an. Es erfolgte die schriftliche Dokumentation im Versuchsprotokoll alle 15 Minuten. Versuchstiere mit hämodynamischen Krisen oder hämodynamischer Instabilität wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Narkosetiefe konnte mit Hilfe des hämodynamischen Monitorings gesteuert werden.

3.6.2 TUNEL Assay

Reagenzien, Materialien und Geräte	Hersteller
InSitu Cell Death Detection Kit, Fluorescein (50 Tests)	Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Ethanol in einer Konzentration von 100%, 96%, 80% und 70%	Apotheke des Klinikums der Universität München, (D)
Destilliertes Wasser	Apotheke des Klinikums der Universität München, (D)
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Proteinase K, 5ml	Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
DNaseI, grade I	Hoffmann-La Roche AG, Basel (CH)
VECTASHIELD® Hard Set Mounting Medium Hard with DAPI H-1500	Vector Laboratories Inc., Burlingame (USA)
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt (D)
pH-Kontroll-Lösungen mit pH = 4,00, pH = 7,00 und pH = 10,00	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen (D)
Elektroden-Lösung	HANNA Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen (D)
Pinzette 130mm, stumpf	Mollenkopf GmbH, Stuttgart (D)
Kurzzeitmesser, 3-zeilig	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Glaskasten 105x85x70	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Färbegestell 85x60x45	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Drahtbügel	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Reaktionsgefäß, 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Menzel® Deckgläser 32 x 50mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Pipettenspitzen blau, gelb	Eppendorf AG, Hamburg (D)

Feuchte Kammer	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach (D)
Pipetten in diversen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
pH-Messer	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG, Weilheim (D)
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen (D)
Heizplatte mit Rührfunktion	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen (D)
Fluoreszenzmikroskop mit Kameraanschluss	Carl Zeiss AG, Jena (D)

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der verwendeten Materialien, Geräte und Reagenzien zur Anfertigung der TUNEL-Assay.

Für die Darstellung des quantitativen Ausmaßes des entstandenen Hyperperfusionsschadens erfolgte die Bestimmung der apoptotischen Zellen mit Hilfe des vor 30 Jahren etablierten TUNEL-Assay (240)(241).

Eines der biochemischen Kennzeichen der Apoptose sind die freien 3'-Hydroxyl Enden der Desoxyribonukleinsäure-Stränge (DNA-Stränge) des Zellkerns, die durch Aufspaltung des Chromatins durch Endonukleasen, in Fragmente zerfällt. Die freiwerdenden Hydroxygruppen können durch den Terminal Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) Assay, markiert und mit Hilfe immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung mikroskopisch sichtbar gemacht werden. (242)(243). Die atypische DNA Polymerase TdT agiert hierfür als Katalysator, für die „template“ (Schablone) unabhängige Polymerisation von Fluoreszenz markiertem Desoxynucleotidtriphosphat, in diesem Fall dUTP, an den freien 3'-OH Termini der DNA-Fragmente im Zellkern (244)(245). Die nun Fluoreszenz markierten apoptotischen Zellen wurden mikroskopisch quantifiziert.

Für den TUNEL Assay wurden die in Paraffin asservierten Proben verwendet. Nach Kühlung und Aushärtung der Paraffinblöcke wurden diese bei Raumtemperatur gelagert. Für die weitere Bearbeitung der Gewebeproben erfolgte die manuelle Anfertigung von 2µm dünnen Gewebeschnitten am Mikrotom. Diese wurden auf einen Objektträger übertragen und bei 37°

über Nacht gelagert. Im Anschluss für die weitere Bearbeitung erfolgte mittels hausinternem Standardprotokoll, mit absteigender Alkoholreihe die Entparaffinierung und Rehydrierung.

Protokoll absteigende Alkoholreihe und Rehydrierung:

15 min – Xylol

15 min – Xylol

5 min – 100% Ethanol

5 min – 100% Ethanol

5 min - 96% Ethanol

5 min - 96% Ethanol

5 min - 70% Ethanol

5 min - 70% Ethanol

5 min – Aqua dest.

Das hier verwendete TUNEL Assay Kit wurde von der Firma Sigma Aldrich bezogen, bei -15 bis - 25°C gelagert und die Reaktionsmischung für jede Versuchsreihe frisch angefertigt.

Die Gewebeproben wurden dann für 15 Minuten bei 37°C mit der Serinprotease, der Proteinase K für die Freisetzung der Nucleinsäuren aus dem Zellkern inkubiert. (245)(246)(247). Als nächstes wurden die Gewebeproben mit PBS gewaschen und im Anschluss analog des verwendeten TUNEL assay Protokolls (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein der Firma Sigma Aldrich) mit der Enzym- (TdT) und Label (Fluorescein-dUTP) Lösung behandelt.

Pro Versuchsgruppe wurden eine Positiv- (Inkubation mit einer rekombinanten DNase I zur Spaltung aller Zellkern-DNA) und eine Negativkontrolle (lediglich Inkubation mit der label solution) durchgeführt. In der Positivkontrolle konnte jeder Zellkern fluoreszierend sichtbar

gemacht werden und in den Negativkontrollen, die Bindung des Fluorescein-dUTP an die 3'OH Gruppen der DNA-Fragmente durch die fehlende TdT nicht erfolgen.

Alle TUNEL-Proben wurden erneut mit PBS gewaschen und dann mit DAPI-haltigem Mounting Medium eingedeckt und der Fluoreszenzmikroskopie unterzogen. Die Auswertung mit dem Mikroskop erfolgte computergestützt via Fluoreszenz-Detektion. Je Gewebeprobe wurden 10 Bildaufnahmen in 10-facher Vergrößerung, über den ganzen Gewebeschnitt zufällig ausgewählt, angefertigt.

Die beste Erfassung des verwendeten DAPI-Fluoreszenzfarbstoffs wurde vom Hersteller bei einer Exzitationswellenlänge von 360 und einer Emissionswellenlänge von 460 Nanometern angegeben. Die, zur Auswertung, verwendete Exzitationswellenlänge wurde bei 450 -500 Nanometern und einer Emissionswellenlänge von 515-565 Nanometern gewählt.

3.6.3 Nachweis proapoptotischer Enzyme mit Hilfe von Gewebelyse, Proteinquantifizierung und Western Blot

Für die Quantifizierung der proapoptotischen Proteine wurde ein Western Blot nach hausinternem Standardprotokoll durchgeführt.

Folgende Proteine wurden auf ihre Aktivität hin untersucht: Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) (PARP-AK, Hase, für PARP und PARP-1 Detektion, 89/116 kDa, Cell Signaling Technology, USA), Caspase-3 (C 3-Antikörper, Hase, 17,19/35kDa Cell Signaling Technology, USA), Stress-aktivierte Protein Kinase/Jun-Amino-Terminale Kinase (SAPK/JNK) (SAPK/JNK -AK, Hase, 46/54 kDa, Cell Signaling Technology, USA), sowie Mitogen aktivierte Proteinkinase p44/42 (ERK 1/2, Hase, 42 44 kDa, Cell Signaling Technology, USA) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (GAPDH-AK, Hase, 37 kDa, Cell Signaling Technology, USA) zur Ladekontrolle.

3.6.3.1 Gewebelyse

Material, Reagenzien, Zubehör/Geräte für die Gewebelyse	Hersteller
Nunc Nalgene™ 96 Well Plate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Petrischale	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht (D)
Einmalskalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
Micropistillmörser	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Zellysepuffer (10x)	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main (D)
DL-Dithiothreitol-Lösung (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Protease-Inhibitor	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Vmax Kinetic ELISA Microplate Reader	Molecular Devices, LLC, San José (USA)
Software "Softmax"	Molecular Devices, LLC, San José (USA)
Ultraschall-Homogenisator	Sartorius AG, Göttingen (D)
Pipettierhilfen und Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht der verwendeten Reagenzien, Instrumente und des Laborbedarf incls. Herstellerangaben für die Gewebelyse und Proteinmengenbestimmung.

Im ersten Schritt erfolgte die Gewebelyse, der bei -80° tiefgefrorenen Leberlappen (RMS und RPS), um die Zellen aufzuschließen, das intrazelluläre Protein verfügbar zu machen und vor Denaturierung zu schützen. Das Gewebe wurde dafür mit einem Skalpell auf Eis geschnitten und mittels Micropistillmörser zerkleinert und immer wieder in Flüssigstickstoff eingetaucht, um ein Auftauen zu verhindern. Im Anschluss wurde ein Zellysepuffer (mit 1µl/ml DTT und 10 µl/ml Proteinase -Inhibitor mit Aprotinin a 100 U/ml jeweils von Sigma-Aldrich, USA) angesetzt und hinzugefügt (248) und das Gemisch gevortext. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur war die Probe nun bei -80° lagerbereit oder stand zur weiteren

Bearbeitung bereit. Zur Weiterbearbeitung wurde das Lysat via Ultraschallhomogenisator gesonicated und im Anschluss eine Stunde bei 4°C 20.000 x g zentrifugiert. Das fertige Lysat konnte abpipettiert und bei -80° asserviert werden bis zur weiteren Verwendung.

Für die Sicherstellung der gleichen Proteinmenge pro Lysat erfolgte die genaue Proteinmengenbestimmung. Hierzu wurde ein Bicinchoninsäure Assay (BCA) verwendet (249)(250), welcher die Reduktion von Kupferzweitionen (CU 2+) zu Kupfereinsionen (CU +) durch Proteine in alkalischem Milieu herbeiführt. Die Kupfereinsionen bilden mit BCA einen violetten Farbkomplex, der einen empfindlichen kolorimetrischen Nachweis der Proteine bei 562 nm ermöglicht. Der Proteingehalt ist linear zur Absorbtionsrate des wasserlöslichen Gemischs. Für die Farbbildung des BCAs ist das Vorhandensein der vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin, die Peptid- und makromolekulare Struktur des zu untersuchenden Proteins verantwortlich. Für die Analyse wurde dem Gewebelysat der BCA Assay zugesetzt und für 30 Minuten im dunklen Brutschrank bei 37° inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Messung im Spektrometer bei 562 nm durchgeführt.

Die jeweiligen Proteinkonzentrationen wurden unter Bezugnahme von standardisierten Proteingrößen wie Bovines Rinderalbumin (BSA) bestimmt. Eine Verdünnungsreihe des bekannten BSA-Proteins wurde hergestellt und hieraus eine Standardkurve erstellt, auf welcher der jeweilige zu ermittelnde Proteingehalt des Lebergewebes zugeordnet und verglichen wurde. Für eine genauere Proteingehaltbestimmung wurden pro Gewebeprobe 3 Lysate hergestellt und der Mittelwert für die endgültige Proteinkonzentration ermittelt. Für die Auswertung wurde eine spezifische software (softmax 2.32) verwendet.

3.6.3.2 Western Blot

Material, Reagenzien, Zubehör/Geräte für Western Blot	Hersteller
Pipettierhilfen und Pipettenspitzen in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße in verschiedenen Größen	Eppendorf AG, Hamburg (D)
Primäre Antikörper gegen murine ERK1/2, Phospho-ERK1/2, Caspase-3, SAPK/JNK, Phospho-SAPK/JNK und PARP, jeweils aus Hase gewonnen	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main (D)
Sekundärer Antikörper gegen Hasen-IgG, gebunden an Meerrettichperoxidase (HRP), aus Ziege gewonnen	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main (D)
Monoklonaler Antikörper gegen murine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), aus Hase gewonnen	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main (D)
Proteinstandard Precision + Protein Dual Color Standard (500µl)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Röntgenkassette	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Amersham™ Hyperfilm ECL Chemilumineszenzfilm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (D)
Polyvinylidenfluorid (PVDF) - Membran (0,2 µm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Whatman™ Filterpapier	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg (D) Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Trisaminomethanhydrochlorid (TRIS-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Bovines Serumalbumin (BSA), biotinfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Pinzette mit flachen Enden	Mollenkopf GmbH, Stuttgart (D)

10 x SDS Gelelektrophorese-Puffer (Tris/Glycin/SDS)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
SuperSignal® Chemilumineszenz-Lösung	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham (USA)
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Polysorbat-20 (Tween® 20)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
2-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt (D)
Destilliertes Wasser	Apotheke des Klinikums der Universität München, München (D)
30% Acrylamid-Mix	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
1,5M TRIS (pH 8,8)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Ammoniumpersulfat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe (D)
Ponceau S	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)
Mini-Protean® 3 Elektrophorese-System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
PowerPac™ 300 Elektrophorese-Netzteil	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Biometra® WT16 Wipptisch	Biometra GmbH, Göttingen (D)
SCOPIX LR 520 Röntgenentwickler	Agfa HealthCare GmbH, Bonn (D)
Mini-Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell + Schwämmchen	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)
Blotter für Semi-Dry-Methode	Bio-Rad Laboratories GmbH, München (D)

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht der für den Western-Blot verwendeten Reagenzien, Instrumente und des Laborbedarfs inkl. Herstellerangaben.

Mit Hilfe der ermittelten Proteinkonzentrationen konnte nun für den spezifischen Proteinnachweis nach hausinternem Standardprotokoll der Western Blot für alle Proben durchgeführt werden.

Im ersten Schritt wurden Trenn- und Sammelgele gegossen und über Nacht im Kühlschrank verwahrt, um die Reaktionen von unpolymerisiertem Acrylamid mit Cysteinen in den

Proteinen in der Folge zu verringern (251,252). Das Trenngel wurde aus SDS-haltiges TRIS-Glycin mit 15%-igem Polyacrylamidanteil und das Sammelgel mit 5%-igem Polyacrylamidanteil gegossen, letzteres wurde für die bessere Sichtbarkeit der Taschen mit Bromphenolblau gefärbt.

Am Folgetag erfolgte der Transfer in die Gelelektrophoreseapparatur, welche mit dem angefertigten SDS-Puffer befüllt wurde. Die Probenkämme wurden senkrecht entfernt und die ausgesparten Taschen einzeln mit einem, als Referenz dienendem Proteinstandard, einer Positiv- und Negativ- Kontrolle und den einzelnen, mit dem SDS-Gel-Auftragspuffer vermischten Gewebelysatproben a 20 µg Gesamtproteinmenge, befüllt. Durch das anionische Tensid Natriumlaurylsulfat (SDS) im Puffer wurden die eigenen Proteinladungen überlagert und die Gesamtladung der Proteine durch die Bindung an SDS negativ, so dass diese während der Elektrophorese nach Ladung und Größe aufgetrennt und geordnet Richtung Anode wanderten (252) (253) (254) (255,256). Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 250 Volt a 0,04 Ampere über eine Stunde durchgeführt.

Der eigentliche Transfer der Proteine über ein elektrisches Spannungsfeld vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran erfolgte mit der SemiDry Methode bei 25 Volt und 0,3 Ampere über 75 Minuten (257) (258). Der angestrebte Proteinnachweis der, auf die PVDF-Membran transferierten Proteine erfolgte mittels Immundetektion und Chemilumineszenz.

Um die hydrophobe PVDF-Membran dem Transfer zugänglich zu machen, wurde diese vor Anlegung des elektrischen Spannungsfeldes, in Methanol eingelegt und wie die Filterpapiere mit Transferpuffer gewaschen, um dann anodenseitig auf das Gel platziert und von dem Filterpapier umschlossen zu werden.

Der Erfolg des Transfers auf die PVDF-Membran wurde unmittelbar im Anschluss mit einer Ponceau- Rot Färbung kontrolliert (259).

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Proteine zu verhindern, wurden diese mit 5%-igem BSA geblockt (258) Die Inkubation mit dem ersten Antikörper, welcher ebenfalls in

5%-igem BSA verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Wipptisch. Der im Experiment verwendete primäre Antikörper war ein rabbit- anti mouse Antikörper, welcher an die Antigene der Mausproteine auf den PVDF- Membranen band. Der am Folgetag verwendete Sekundär-Antikörper war konsekutiv ein anti- rabbit Antikörper (HRP-AK, horseradish peroxidase-AK). Dieser sekundäre Antikörper hat die Eigenschaft, das nun verwendete chemilumineszierte SuperSignal, zu spalten. Das Reaktionsprodukt erzeugte die Lumineszenz, die mit der Proteinmenge direkt proportional zusammenhängt und mittels eines Lichtdetektors auf Röntgenfilm in der Dunkelkammer festgehalten werden konnte (258). Die Banden vom Proteinstandard wurden umgehend auf das Fotopapier mit den Ergebnissen der Proteindetektion übertragen, um eine spätere Erfassung und Bearbeitung sicherzustellen.

Die PVDF-Membranen wurden für die Verwendung weiterer Antikörperbestimmungen bis zu dreimal recycelt. Im letzten Schritt wurde jede Membran zur Ladekontrolle mit dem GAPDH Antikörper inkubiert.



Abbildung 10: Western-Blot, Gel-Elektrophorese. Zu sehen ist der Proteinstandard links und der mit Bromphenolblau blau gefärbte Durchlauf der Proteine im Gewebelysat durch das Gel Richtung Anode.

3.7 Auswertungsverfahren

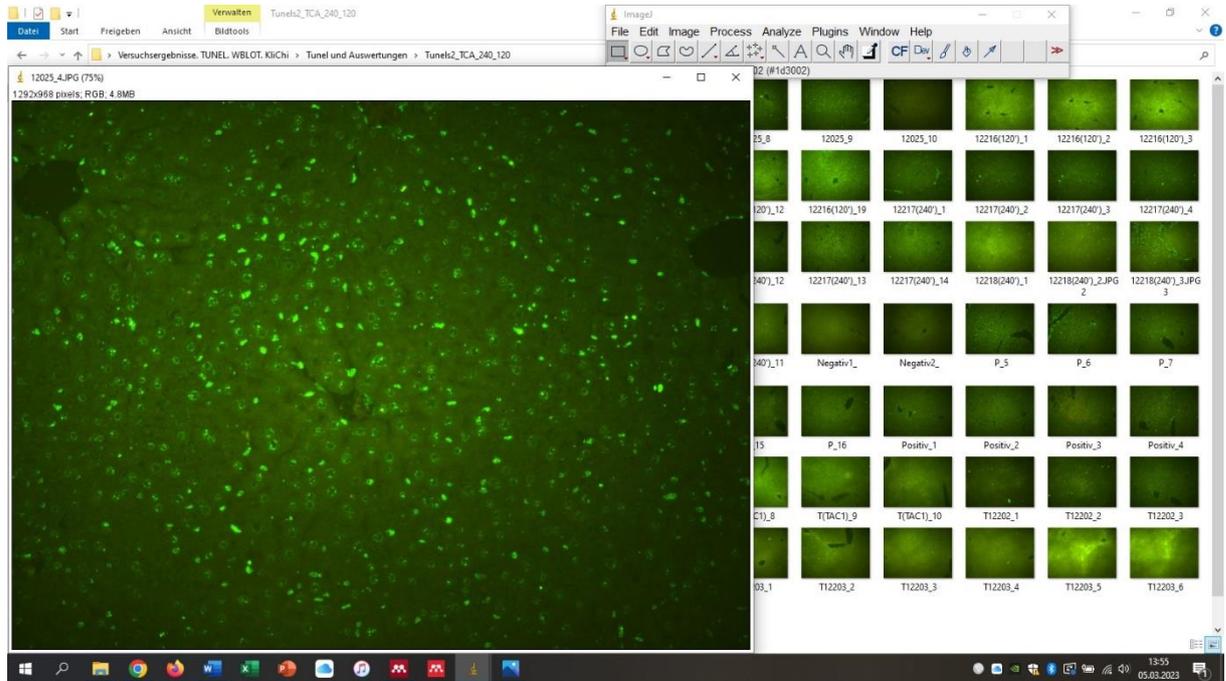
3.7.1 Optische Flächenfraktionsanalyse

Für die Auswertung der TUNEL Assay wurde eine optische Flächenfraktionsanalyse mit dem Program „Image J 1.48v“ durchgeführt. Es handelt sich bei ImageJ um ein Java-basiertes Bildverarbeitungsprogramm, das am National Institute of Health und dem Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin) entwickelt wurde und frei zum Download zur Verfügung steht. Mittlerweile ist das Programm unter dem Namen Fiji bekannt (211–213).

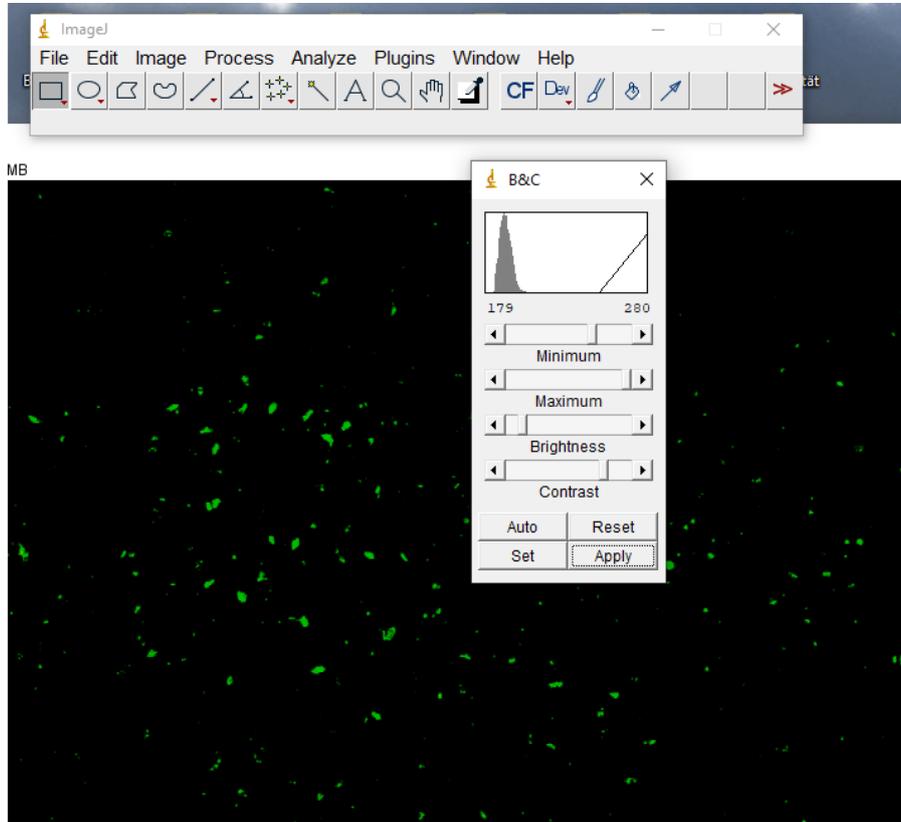
Für die TUNEL Analysen wurden wie unter 3.5.2 beschrieben pro Analyse eine Positiv- und eine Negativkontrolle angefertigt. Von den zu untersuchenden Gewebeschnitten wurden

jeweils 10 Bilder (10 x region of interest) mit dem Fluoreszenzmikroskop in 10-facher Vergrößerung aufgenommen und gespeichert. Die Weiterbearbeitung der Aufnahme erfolgte nun mit „Image J“ wie im Folgenden gezeigt wird:

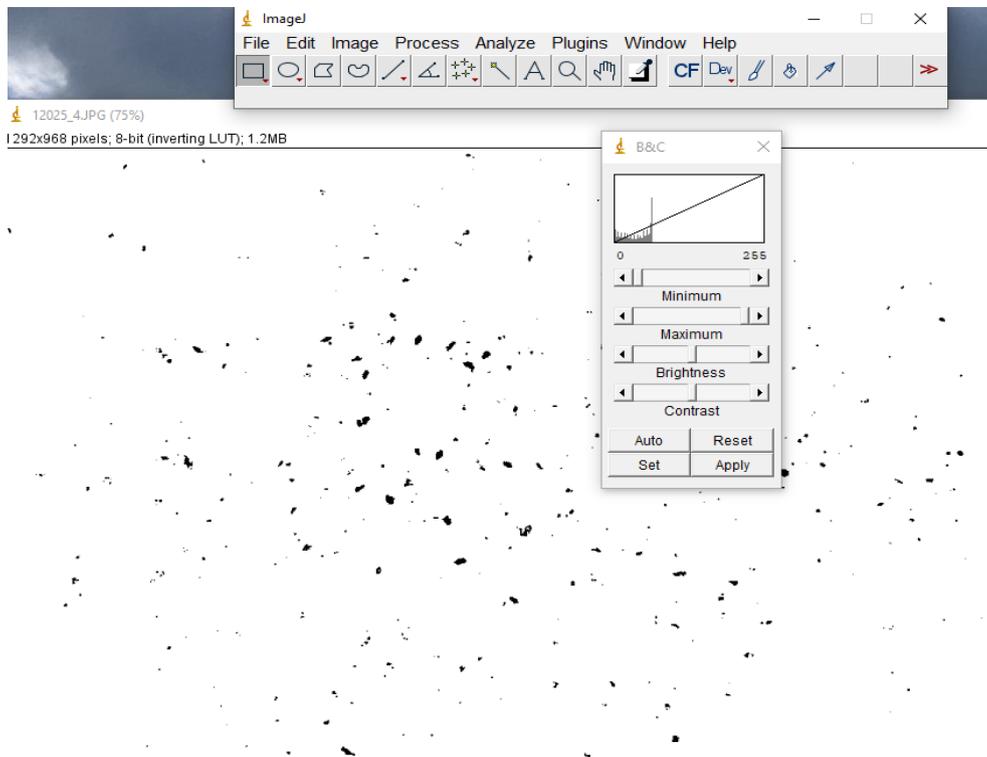
1. Jedes aufgenommene Bild wurde mit dem Programm geöffnet.



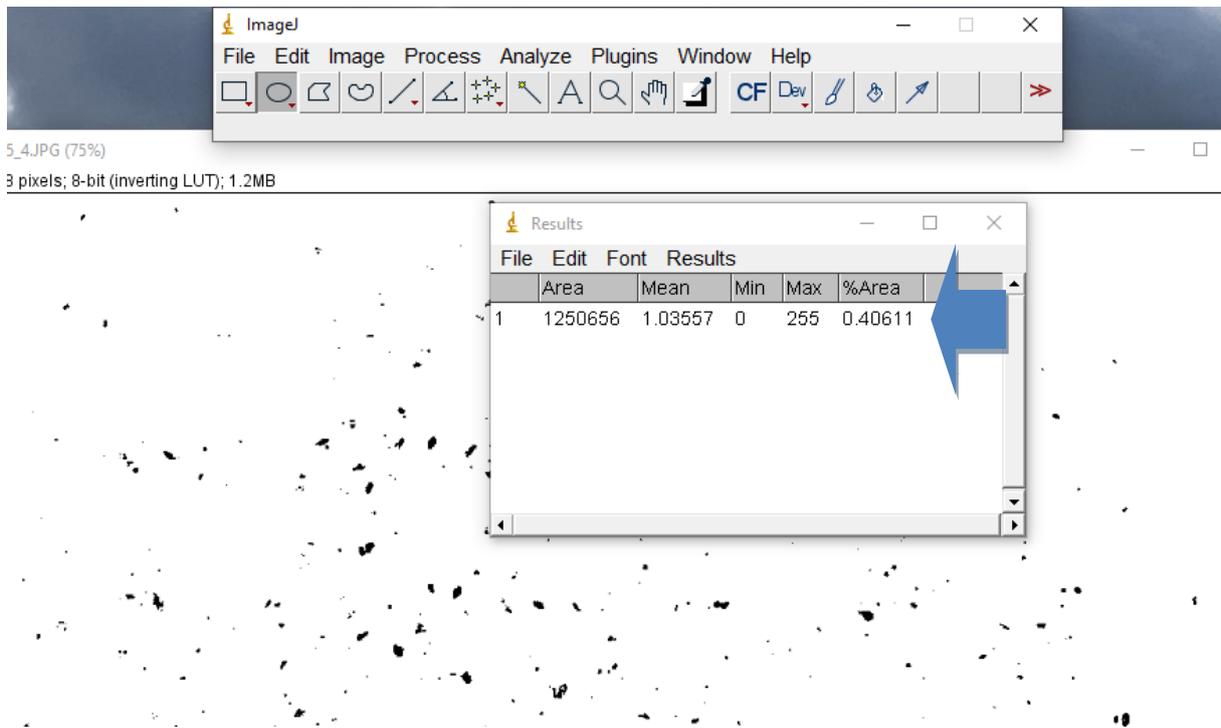
2. Mit dem Befehl „image -> adjust: brightness/contrast -> apply“ wurde das Fluoreszenzsignal der apoptotischen Leberzellen hervorgehoben und verstärkt und das übrige Leberparenchym durch die Kontrastverstärkung zu einem schwarzen Hintergrund.



2. Mit dem Befehl „Process -> Binary: make binary“ wird das Bild in einen schwarz-weißen Kontrast gewandelt, sodass ein als solches bezeichnetes Binärbild entsteht.

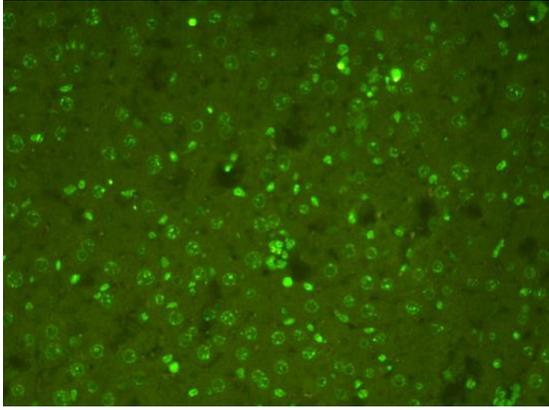


4. Die sogenannte area fraction, Flächenfraktion, welche proportional zum Anteil apoptotischer Zellen im TUNEL Assay ist, wird nun im letzten Schritt mit Hilfe des Befehls „Analyze -> set measurements: measure“ in % berechnet.

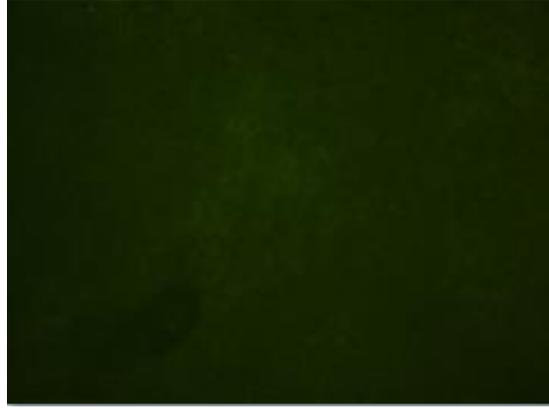


5. Pro Gewebeschnitt des TUNEL Assay wurden je 10 Aufnahmen in 10-facher Vergrößerung angefertigt und mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Jede Aufnahme wurde, wie oben beschrieben mit dem Programm „Image J“ auf ihren prozentualen Anteil an Flächenfraktion und damit Anteil an apoptotischen Zellen ausgewertet. Pro Gewebeschnitt wurde der Mittelwert aller 10 Aufnahmen je Schnitt berechnet und für die weitere Datenauswertung dokumentiert und genutzt.

6. Für die Kontrolle und Objektivierbarkeit der TUNEL Assay wurden pro Assay eine Positiv - und Negativkontrolle erhoben und mit den übrigen TUNEL Aufnahmen und deren Analysen verglichen. Hier das Beispiel einer Negativkontrolle, als auch einer Positivkontrolle.



Positivkontrolle



Negativkontrolle

3.7.2 Proteinmengenbestimmung

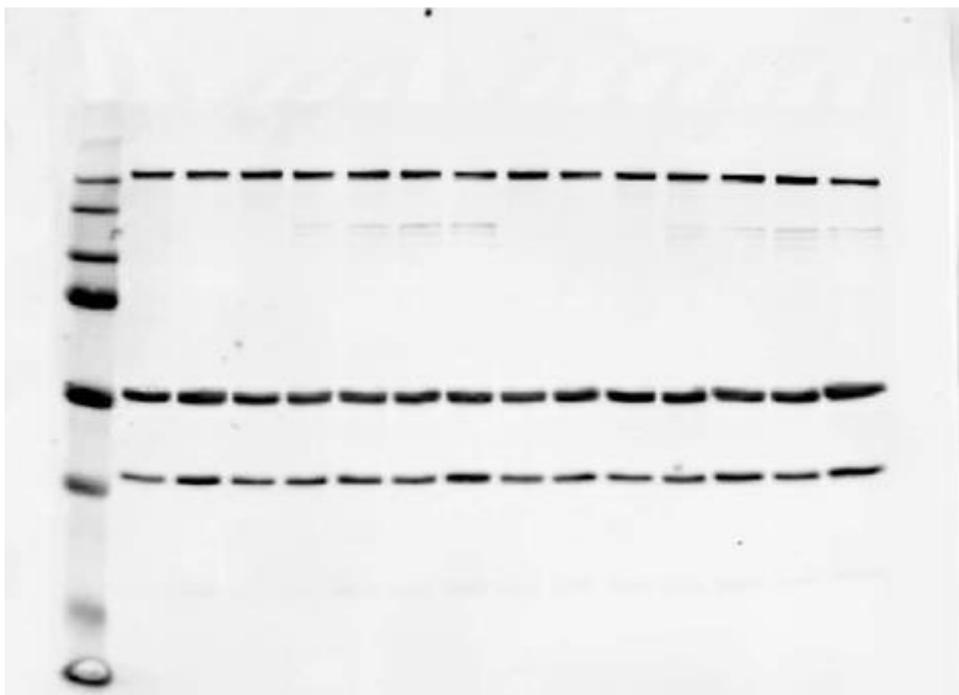
Die Proteinmenge der jeweiligen Enzyme wurde durch eine herbeigeführte Chemilumineszenzreaktion mit Hilfe des Western Blot in Licht umgewandelt und auf Röntgenfilm festgehalten. Die dokumentierten Proteinbanden stimmen in ihrer Dichte mit dem effektiven Proteingehalt proportional überein.

Grundsätzlich gilt, dass die Enzymaktivitäten durch Bildung von Quotienten aus der Masse des gemessenen aktivierten Proteins zu der jeweils gewählten Ladekontrolle berechnet wird. Für die Bestimmung der Enzymaktivität der aktivierten Caspase 3, erfolgt die Berechnung durch die Bildung des Quotienten mit der Ladekontrolle GAPDH. Die Aktivität der aktivierten, phosphorylierten Stressaktivierte Kinase (SAPK) wird durch Quotienten Bildung mit der Gesamtmenge an SAPK/JNK bestimmt. Die p44/42-mitogen-aktivierte Proteinkinase (ERK 1/2) Aktivität berechnet sich aus der aktiven, phosphorylierten Form an der Gesamtmenge im untersuchten Lebergewebe. Für die Bestimmung der Enzymkonzentration der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) im explantierten Lebergewebe wird der Quotient aus der gespaltenen aktiven PARP-Menge zur Gesamtmenge errechnet.

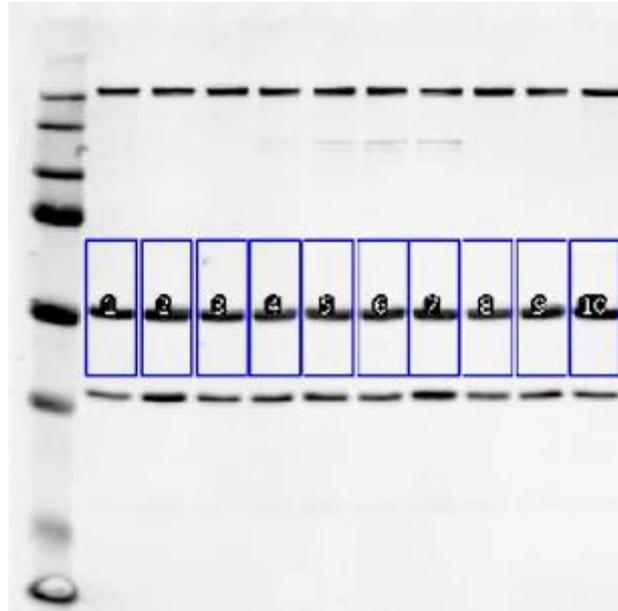
3.7.3 Optische Dichtemessung

Die Quantifizierung des Proteingehalts der untersuchten Proteinbanden der Western Blots erfolgte ebenfalls mit dem Programm „Image J“ und wurde über eine optische Dichtemessung erfasst. Die dabei erfasste Dichte verhielt sich direkt proportional zum Proteingehalt des Lebergewebes. Die auf Röntgenfilm dokumentierten Ergebnisse der Western Blots wurden zunächst eingescannt und dann am Computer weiterbearbeitet. Die Arbeitsschritte sahen folgendermaßen aus:

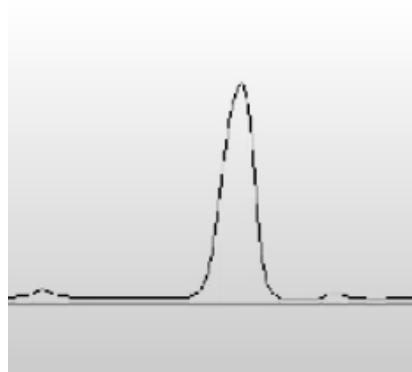
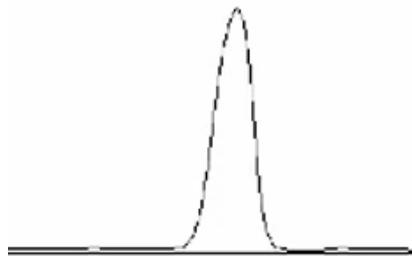
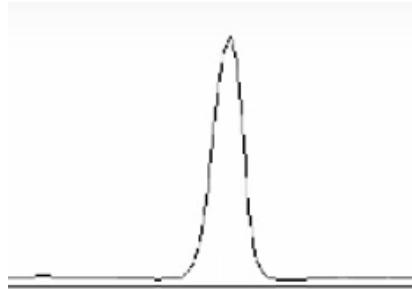
1. Exemplarisches Beispiel eines Western Blots mit Proteinstandardbande links, hier ohne Positiv- und Negativkontrolle. Das eingescannte Blotbild wird zunächst mit „Image J“ geöffnet.



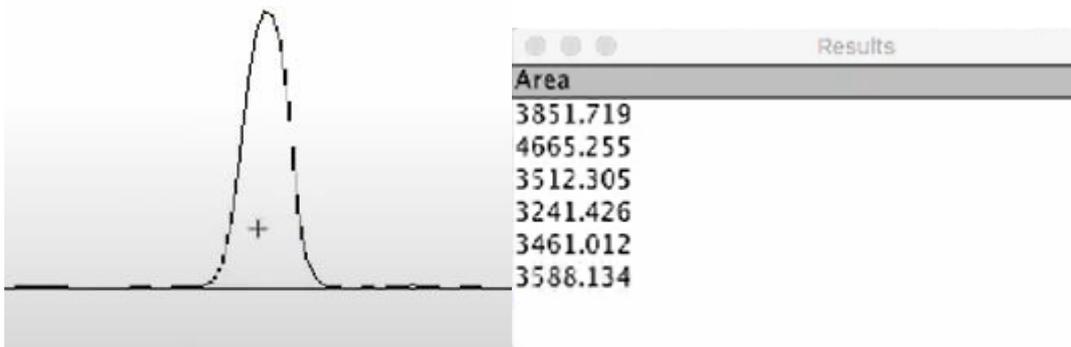
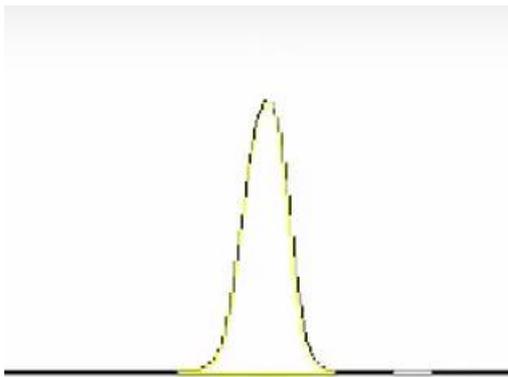
2. Danach erfolgt die Markierung der zu untersuchenden Proteinbanden mit einem Rechteck.
Das Programm führt eine automatische Nummerierung durch.



3. Aus jedem Rechteck bildet das Analyseprogramm eine Parabel, welches den vorhandenen Dichtewert je Parabel darstellt.



4. Über die manuelle Auswahl jeder Parabel wird deren Fläche unter der Kurve berechnet. Die errechnete Fläche entspricht dem Dichtewert und damit dem Proteingehalt. Die Einheit die durch das Programm angegeben wird, ist Pixel. Für die weitere Auswertung und statistischen Verfahren wurden die Western-Blot Ergebnisse als Relationen der aktivierten und damit phosphorylierten Anteile zum Gesamtanteil angegeben, so dass keine Einheit verwendet wird.



3.7.4 Statistische Verfahren

3.7.4.1 Deskriptive Statistik

Zur Quantifizierung und Auswertung der Ergebnisse erfolgte zunächst eine deskriptive Statistik mit Berechnung der Gruppenmittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler

des Mittelwertes. Hierzu diente das Programm GraphPad Prism 10, Version 10.0.2. der Firma Graphpad Software, Inc., La Jolla (USA). Die deskriptive Statistik mit Ploterstellung sowie die Varianzanalyse zum Signifikanznachweis der durchgeführten Experimente erfolgte ebenfalls mit selbigem Programm. Als statistisch signifikant werden Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$ angenommen.

3.7.4.2 Varianzanalyse und Post hoc Test

Mit dem Programm GraphPad Prism 10, Version 10.0.2. erfolgte auch die weitere statistische Auswertung und Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwerts. Die Varianzanalyse zum Signifikanznachweis der durchgeführten Experimente erfolgte ebenfalls mit selbigem Programm. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert $<0,05$ angenommen.

Die statistische Analyse der Daten wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA bei heterogener Standardabweichung mittels Brown-Forsythe ANOVA test durchgeführt. Eine ANOVA wird in der Statistik immer dann gewählt, wenn mehr als 2 Gruppen analysiert werden. Der eine einfaktorielle, gemessene abhängige Faktor, hier Zelltod entsprechend, wird mit einer unabhängigen Variabel, hier Reperfusionzeit/ Medikament verglichen. Die Heterogenität der Standardabweichung der untersuchten Ergebnisse wird mit dem Brown Forsythe Test nachgewiesen. Bei homogener Standardabweichung der Gruppen wurde die einfache einfaktorielle ANOVA berechnet. Sofern eine Signifikanz in der ANOVA festgestellt wurde und damit bewiesenermaßen ein Unterschied zwischen den Gruppen angenommen werden konnte, wurde in der Folge ein Post-hoc-Test, zur Feststellung der paarweisen Signifikanz zwischen den Gruppen durchgeführt.

Zeigte die Varianzanalyse eine homogene Verteilung der Standardabweichung zwischen den Gruppen, erfolgt der Post-hoc -Test nach Tukey; bei nicht homogener Standardabweichung nach Dunnett's T3 Test. Wurde in der Varianzanalyse keine Signifikanz nachgewiesen,

wurde kein Post-hoc-Test erhoben. *Der Post-hoc-Test zeigt ebenfalls die Differenzen der Mittelwerte. T-Tests wurden aufgrund des hohen Anstiegs des Fehlers 1. Art beim multiplen Testen nicht standardmäßig durchgeführt. Die multiple comparisons Analysen nach Tukey und Dunnett's T3 ersetzen einzelne t-Tests.*

3.8 Versuchsgruppen- und Protokolle

Es erfolgt die Darstellung der einzelnen Experimentreihen mit Induktion einer 90-minütigen Hyperperfusionsphase nach 75-%iger Leberresektion. Je Versuchsgruppe lag eine Gruppengröße $n = 6$ vor. Die operative Vorgehensweise wurde ausführlich unter 3.4.2 dokumentiert.

3.8.1 75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (Hyperperfusion Injury (HI) 90')

Nach Applikation der intraperitonealen Narkose mit Medetomidin und Ketamin erfolgte die Karotiskanülierung zum Monitoring der Makrohämodynamik bei der Hälfte der Versuchstiere pro Gruppe und die anschließende Medianlaparotomie mit 75%-ige Leberresektion, was zugleich eine Hyperperfusion zur Folge hatte, die über 90 Minuten durchgeführt wurde. Nach Ablauf der Zeit erfolgte die Resektion der verbliebenen Leberlappen (RMS und RPS), die Exsanguinierung und Euthanasie des Versuchstiers.

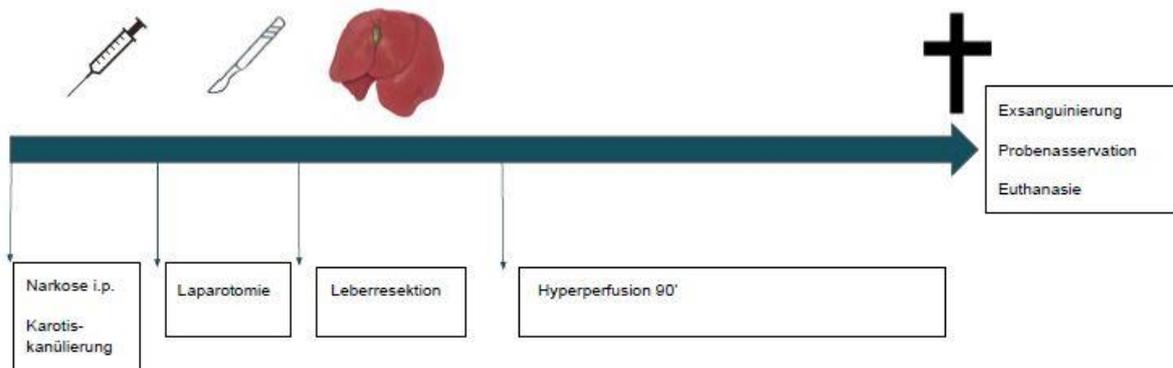


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Interventionsablaufs der Versuchsgruppe 75%-ige Leberresektion mit anschließender 90-minütiger Hyperperfusion ohne medikamentöse Vorbehandlung.

3.8.2 75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (HI 90') und Applikation von DMSO

Analog zum Ursprungsexperiment erfolgte die operative Intervention. Präoperativ wurde 30 Minuten vor Durchführung der Laparotomie DMSO intraperitoneal appliziert. Pro Versuchstier lag die applizierte Dosis bei 150 µl DMSO.

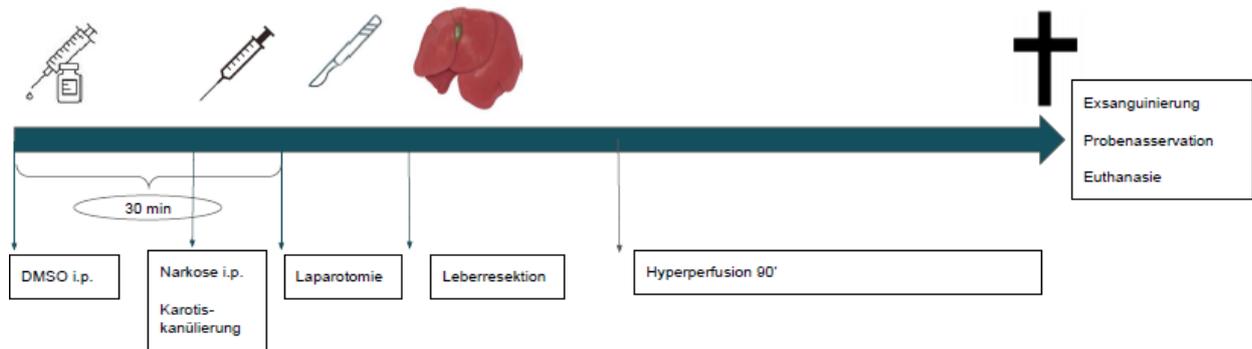


Abbildung 12. Schematische Darstellung des Interventionsablaufs der Versuchsgruppe 75%-ige Leberresektion mit anschließender 90-minütiger Hyperperfusion und Applikation der Trägerlösung DMSO.

3.8.3 75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (HI 90') und Applikation von Baicalein

30 Minuten präinterventionell erfolgte die Gabe von 120 mg/kg Körpergewicht Baicalein, was einer Menge von ungefähr 3 mg pro Maus entsprach. Für die Injektion von Baicalein wurde dieses in der Trägerlösung Dimethylsulfoxid (DMSO) a 150 µl gelöst.

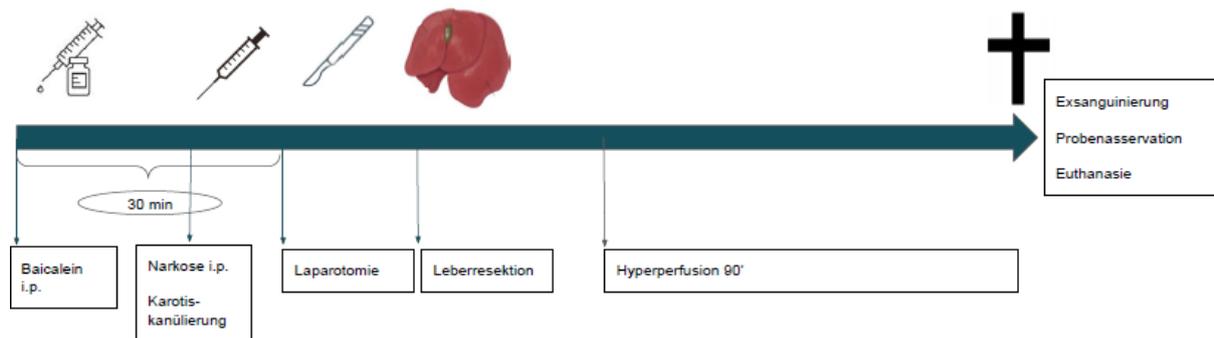


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Interventionsablaufs der Versuchsgruppe 75%-ige Leberresektion mit anschließender 90-minütiger Hyperperfusion und medikamentöser Vorbehandlung mit Baicalein.

3.8.4 75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (HI 90') und Applikation von Tacrolimus

Die Versuchstiere dieser Reihe erhielten 24 Stunden vor der Intervention eine intraperitoneale Gabe des Immunsuppressivums Tacrolimus mit einer Dosis von 300 µg/kg Körpergewicht. Tacrolimus wurde in 0,9%iger-NaCl Lösung aufgelöst und jedem Versuchstier wurden 150 µl injiziert, entsprechend einer Dosis von 75 µg.

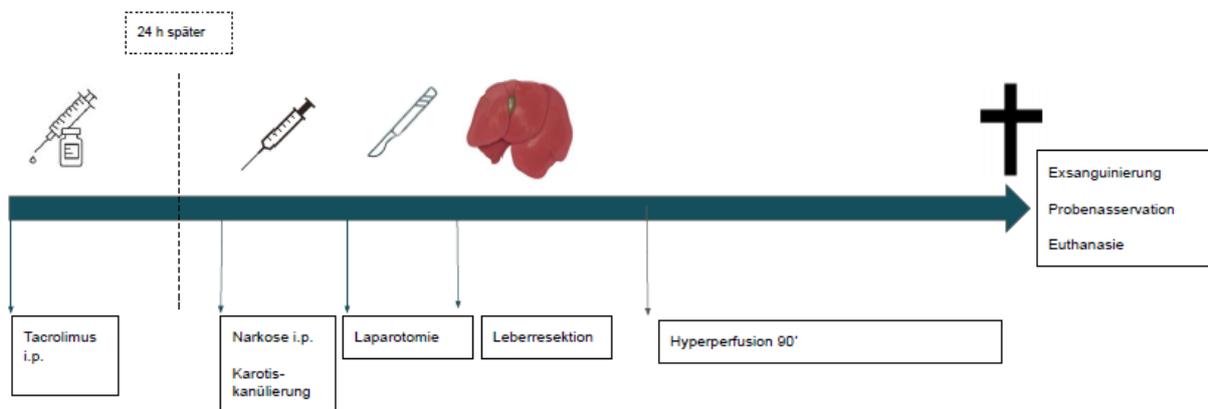


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Interventionsablaufs der Versuchsgruppe 75%-ige Leberresektion mit anschließender 90-minütiger Hyperperfusion und medikamentöser Vorbehandlung mit Tacrolimus.

3.8.5 75%-ige Leberresektion mit 90' Hyperperfusion (HI 90') und Applikation von Tacrolimus + Baicalein/DMSO

Wie schon in der vorherigen Versuchsgruppe erhielten die Mäuse 24 Stunden präinterventionell eine Dosis von 75 µg Tacrolimus intraperitoneal. Am Folgetag wurde die Leberresektion 30 Minuten, nach Gabe des in DMSO gelösten Baicaleins, durchgeführt.

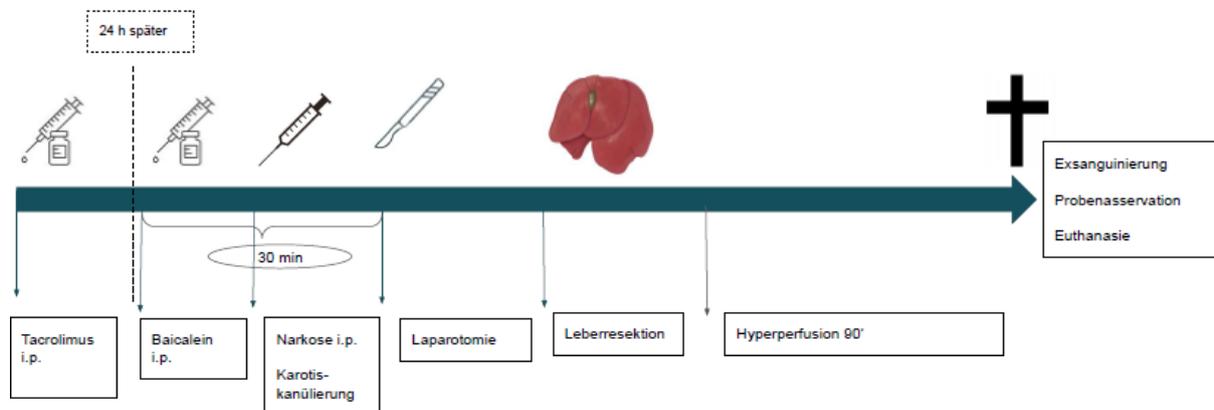


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Interventionsablaufs der Versuchsgruppe 75%-ige Leberresektion mit anschließender 90-minütiger Hyperperfusion und medikamentöser Vorbehandlung mit Tacrolimus und Baicalein.

3.8.6 75%-ige Leberresektion mit 120' und 240' Hyperperfusion (HI 120'/240')

Es erfolgte der Versuch die Hyperperfuisionszeit zu verlängern: auf 120 und 240 Minuten. Um diese Gruppen dann untereinander und mit der Gruppe, der über 90 Minuten durchgeführten Hyperperfuisionszeit, zu vergleichen. Die meisten Versuche konnten nicht erfolgreich terminiert werden, da die Versuchstiere in der Regel vor Ablauf der Beobachtungsintervalle verstarben. Einzelne Tiere dieser Gruppen stehen für einen Vergleich zur Verfügung.

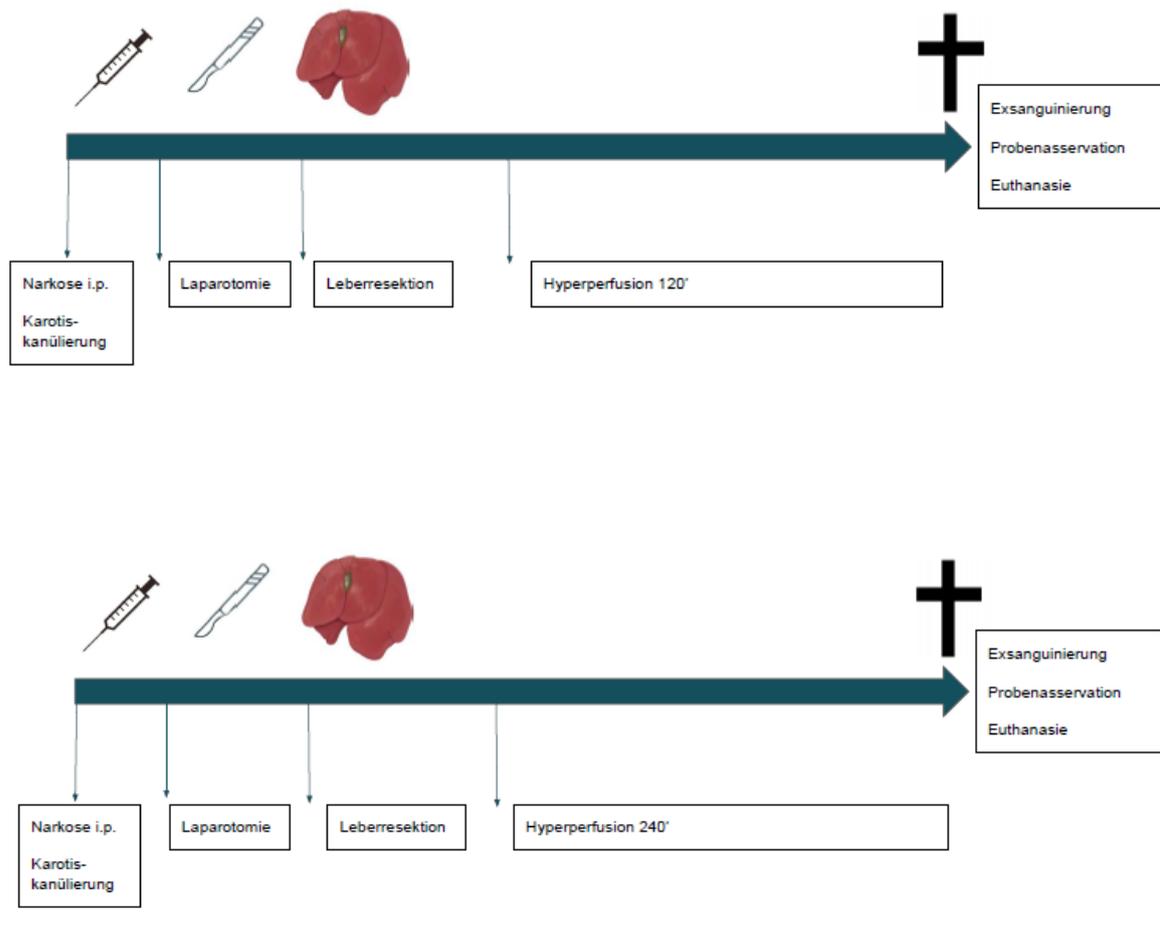


Abbildung 16 und 17: Schematische Darstellung des Interventionsablauf der Versuchsgruppe 75-%ige Leberresektion mit anschließender 120 und 240 -minütiger Hyperperfusion ohne medikamentöse Vorbehandlung.

3.8.7 Schein – Operation

Analog zu den Tieren der anderen Gruppen erfolgte eine intraperitoneale Narkose und Medianlaparotomie ohne Durchführung einer Leberresektion. Nach 90 Minuten wurden der RMS und RPS asserviert. Vergleich 3.4.4. Im Folgenden wird der englische Begriff „sham“ für die Scheingruppe immer wieder Verwendung finden.

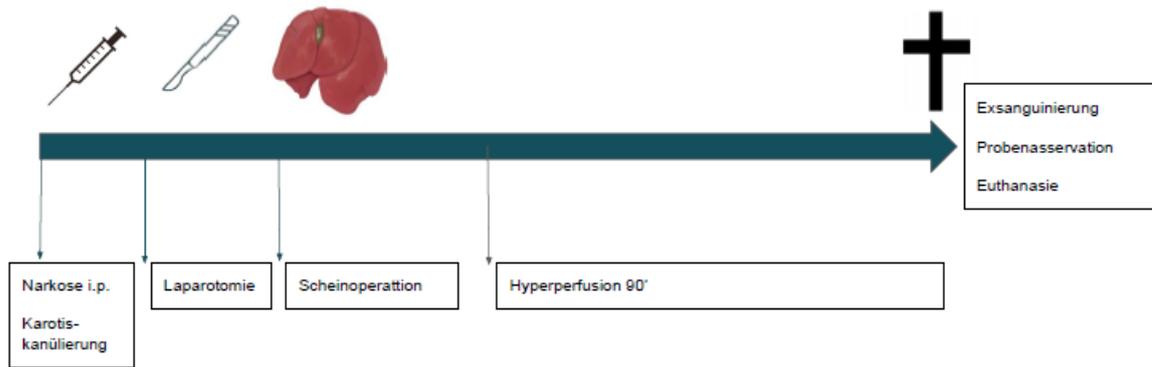


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Interventionsablauf der Versuchsgruppe Scheinoperation ohne Leberresektion mit anschließender 90 -minütiger Hyperperfusion ohne medikamentöse Vorbehandlung.

4. Ergebnisse

4.1 Auswirkungen des Hyperperfusionsschadens beim hepatischen small for size Syndrom auf den Zelltod

Für die Berechnung des prozentualen Anteils des entstandenen Zelltods an der Gesamtfläche, erfolgte nach Aufbereitung der Gewebeproben via TUNEL Assay (Vergleich 3.5.2 die unter 3.5.4.1.) die beschriebene Fluoreszenzmikroskopie und nachfolgende Auswertung mit dem Programm Image j 1.48v.

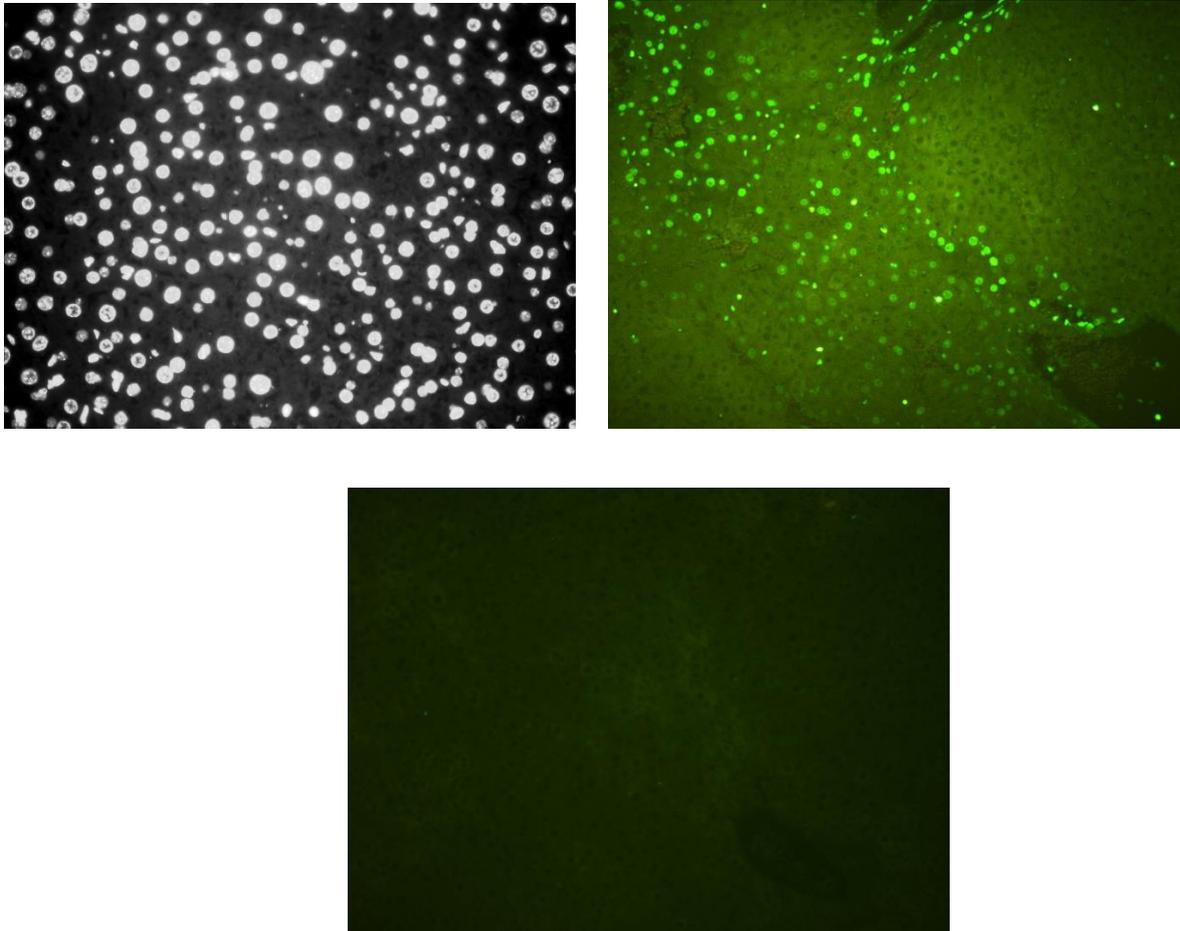


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis toter Zellen bei 10-facher-Vergrößerung bei einer Exitationswellenlänge von 450 nm und Detektionswellenlänge von 515 nm. Oben links: Positiv Kontrolle, oben rechts: Beispiel eines Lebergewebeschnittes nach 90' Hyperperfusion einer Small for Size Leber: tote Zellen leuchten grün, unten: Negativkontrolle.

4.1.1 Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten

4.1.1.1 Deskriptive Statistik

Zur Quantifizierung und Auswertung der Ergebnisse erfolgt zunächst eine deskriptive Statistik mit Berechnung der Gruppenmittelwerte und Standardfehler, sowie graphische Darstellung der Ergebnisse. Hierzu dient das Programm GraphPad Prism 10, Version 10.0.2. der Firma Graphpad Software, Inc., La Jolla (USA).

Im unten dargestellten Plot kann der Zelltodanteil an der Gesamtfläche in % pro Mittelwert einer untersuchten Gruppe abgelesen werden. Des Weiteren wird der Standardfehler des Mittelwertes der Graphik entnommen. Die hier geplotteten Gruppen bestehen aus der Scheingruppe und den Interventionsgruppen mit 75%-iger Leberresektion, sowie den, in der Folge der Experimente, unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten von 90, 120 und 240 Minuten. Dem Plot zu entnehmen ist, dass der Zelltodanteil in der Scheingruppe mit $0,017 \pm 0,004$ % am Niedrigsten liegt. Der Anteil toter Zellen am Gesamtgewebe beläuft sich in der Gruppe mit 90-minütiger Hyperperfusionsdauer auf $0,088 \pm 0,012$ %, bei 120-minütiger Hyperperfusionszeit auf $0,135 \pm 0,025$ % und bei 240-minütiger Hyperperfusion auf $0,061 \pm 0,008$ %. Der Zelltodanteil in der Gruppe mit 90-minütiger Hyperperfusionsdauer steigt im Vergleich zur Scheingruppe damit um den Faktor 5, bei 120-minütiger Hyperperfusion um den Faktor 7,6 und bei 240-minütiger Hyperperfusion um den Faktor 3,5.

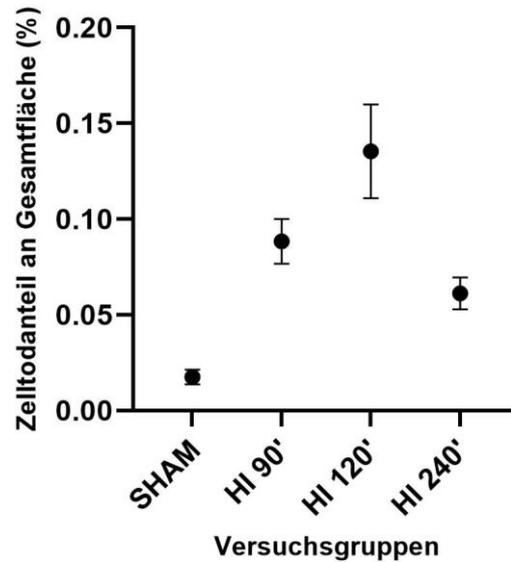


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Gruppenmittelwerte des Zelltodanteils an der Gesamtfläche des explantierten Lebergewebes in %, mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (Fehlerbalken).

4.1.1.2 Statistik: Varianzanalyse und post Hoc Test

Die Varianzanalyse (Brown Forsythe Anova test) zeigt eine statistische Signifikanz von $p < 0,0001$ für Unterschiede zwischen den abgebildeten Gruppen. Der post-hoc Test nach Dunnett weist hier statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Sham Gruppe und allen anderen Gruppen der verschiedenen Hyperperfusionszeiten nach. Im Vergleich der unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten wird eine statistische Signifikanz lediglich zwischen 120 und 240 Minuten Hyperperfusion gezeigt.

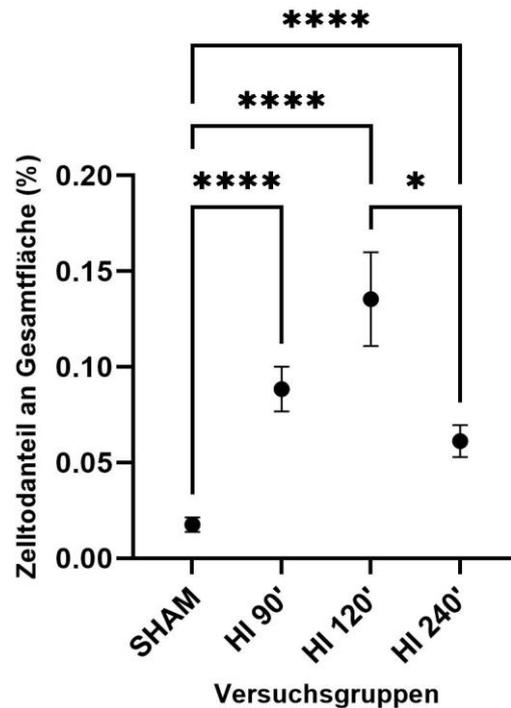


Abbildung 21: Graphische Darstellung der Gruppenmittelwerte des Zelltodanteils an der Gesamtfläche des explantierten Lebergewebes in %, mit Angabe des Standardfehlers des Mittelwertes (Fehlerbalken) und der statistischen Signifikanz mit * $p < 0,03$, **** $p < 0,0001$ in der durchgeführten ANOVA mit post hoc nach Dunett's T3 multiple comparisons test.

4.1.2 Auswertung des Zelltodanteils der unbehandelten und medikamentös behandelten Versuchsgruppen mit 90- minütiger Hyperperfusionszeit im small for size Syndrom

4.1.1.3 Deskriptive Statistik

Die graphische Darstellung Abb. 22 bildet alle Untersuchungsgruppen mit 90-minütiger Hyperperfusion nach 75-%iger Leberresektion ab. Die Untersuchungsgruppe ohne medikamentöse Behandlung weist einen Zelltodanteil am Gesamtgewebe von auf $0,088 \pm 0,012\%$ auf. **Alle Interventionsgruppen mit medikamentöser Behandlung dokumentieren eine Reduktion des prozentualen Zelltodanteils, gemessen am explantierten Gesamtgewebe.** Hierbei weist die mit Tacrolimus behandelte Gruppe den niedrigsten Zellzerfall mit $0,026 \pm 0,0054 \%$ auf, knapp darüber mit dem zweitniedrigsten Zelltodanteil liegt die Interventionsgruppe mit kombinierter Baicalein und Tacrolimus

Therapie mit $0,031 \pm 0,0062$ %. Die alleinige Therapie mit Baicalein zeigt eine Reduktion toter Zellen mit einem prozentualen Anteil von $0,045 \pm 0,010\%$ und liegt damit über dem prozentualen Anteil der Interventionsgruppe mit ausschließlicher Behandlung des Trägerstoffs DMSO und gemessen an allen Behandlungsgruppen am Höchsten. Die DMSO-Interventionsgruppe ergibt einen Zelltodanteil von $0,041 \pm 0,010\%$. Für die Behandlungsgruppen ergibt sich jeweils eine Reduktion des Zelltodanteils in % am Gesamtgewebe um den Faktor 0,30 für Tacrolimus und um den Faktor 0,29 in der kombinierten Medikamentengruppe.

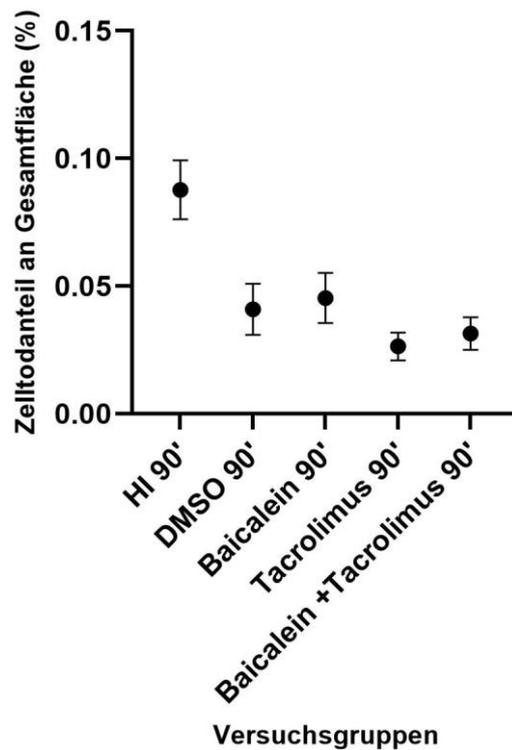


Abbildung 22: Graphische Darstellung der Gruppenmittelwerte des Zelltodanteils an der Gesamtfläche in % aller Untersuchungsgruppen ohne Behandlung (Hyperperfusion 90') und mit Behandlung, sowie Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (Fehlerbalken).

4.1.1.4 Varianzanalyse und Post-hoc-Test

In der Varianzanalyse kann ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,0001$ der Gruppen bezüglich ihres Zelltodanteils in % am Gesamtgewebe dokumentiert werden. Die

Differenzierung mittels post hoc Test ergab signifikante Unterschiede, die die Abb. 22. darstellt. Aus der Graphik wird entnommen, dass in den Experimenten mit Applikation von DMSO, Tacrolimus und Baicalein + Tacrolimus eine signifikante Zelltodreduktion erreicht wird. Die Signifikanz der alleinigen Baicalein Therapie wird lediglich knapp verfehlt mit einem p-Wert von 0,058, so dass auch hier grundsätzlich ein positiver Trend mit Zelltodreduktion verzeichnet wird.

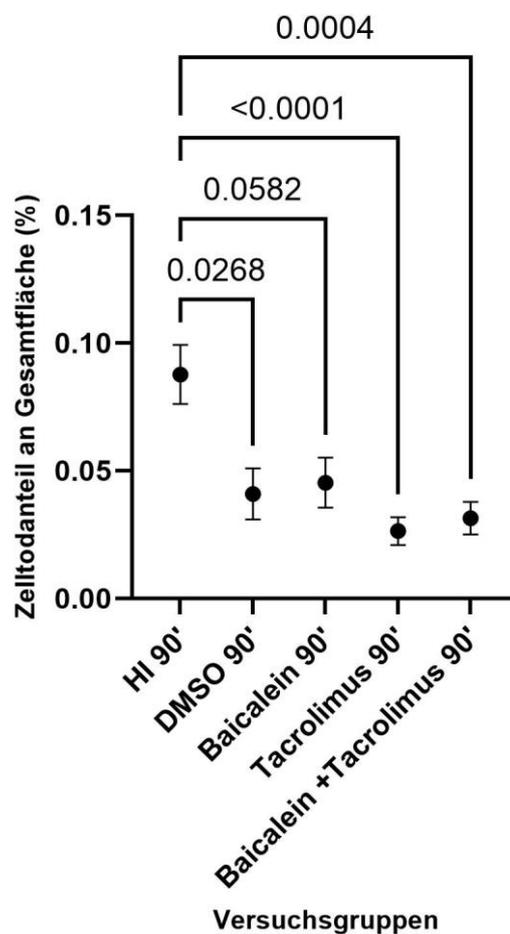


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Gruppenmittelwerte des Zelltodanteils an der Gesamtfläche in % aller Untersuchungsgruppen ohne Behandlung (Hyperperfusion 90') und mit Behandlung, sowie Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (Fehlerbalken) und der p-Werte mit Signifikanznachweis.

4.2 Auswirkungen des Hyperperfusionsschadens beim hepatischen small for size Syndrom auf proapoptotische und lebenserhaltene Enzyme

Für die Analyse des Effekts des Hyperperfusionsschaden im small for size Syndrom auf die Enzymaktivität der proapoptotischen Enzyme Caspase 3, JNK und PARP sowie der lebenserhaltenden Kinase ERK erfolgt die Auswertung über die nachgewiesene Proteinmenge des jeweiligen Enzyms. Die Proteinmenge wird durch eine herbeigeführte Chemilumineszenzreaktion mit Hilfe des Western Blot in Licht umgewandelt und auf Röntgenfilm festgehalten. Die dokumentierten Proteinbanden stimmen in ihrer Dichte mit dem effektiven Proteingehalt proportional überein.

Zunächst wird der Effekt der unterschiedlichen Beobachtungszeiten gegenüber der scheinoperierten Versuchsgruppe bezüglich der vier untersuchten Enzyme ausgewertet. Darauf folgt die Analyse der Enzymaktivitäten in der unbehandelten Versuchsgruppe mit 90-minütiger Hyperperusionszeit im small for size Syndrom und den vier Behandlungsgruppen mit Applikation von DMSO, Baicalein (+DMSO), Tacrolimus, sowie der kombinierten Behandlung mit Baicalein und Tacrolimus.

4.2.1 Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperusionszeiten

für Caspase 3

4.2.1.1 Deskriptive Statistik

Der Plot zeigt für Sham einen Aktivitätsquotienten von Caspase-3 mit einem Mittelwert von $0,0615 \pm 0,0089$ an. Der Aktivitätsquotient des Enzyms steigt von $0,75 \pm 0,14$ für HI von 90' über $1,32 \pm 0,12$ für HI 120' zunächst linear an, bevor er in der Gruppe HI 240' wieder auf $0,854 \pm 0,036$ abnimmt. Damit steigt der Aktivitätsquotient von Caspase-3 in der Gruppe mit 90-minütiger Hyperperfusion um den Faktor 12, in der Gruppe mit 120-minütiger Hyperperfusion um den Faktor 22 und bei 240-minütiger Hyperperfusion um den Faktor 13.

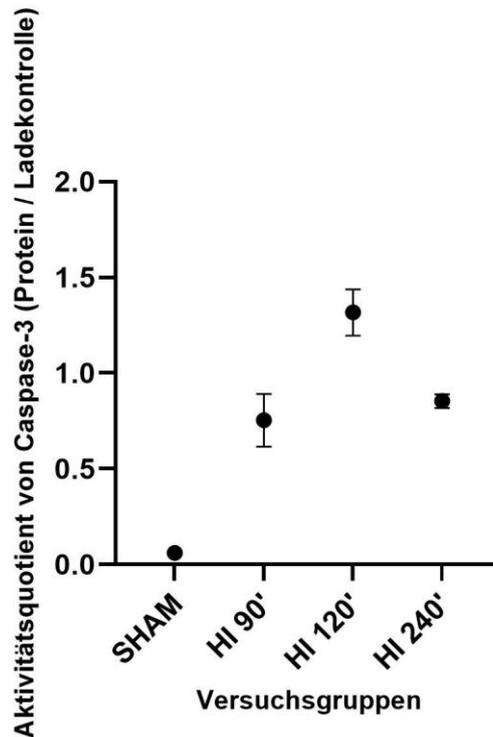


Abbildung 24: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten von aktivierter Caspase 3 zur Ladekontrolle mit GAPDH, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die Scheingruppe (SHAM) und die Untersuchungsgruppen mit unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten (HI 90', HI 120', HI 240') nach 75%-iger Leberresektion sind abgebildet. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes.

4.2.1.2 Varianzanalyse und post-hoc Test

Die Varianzanalyse ergibt eine statistische Signifikanz mit $p < 0,0001$ für Unterschiede zwischen den Gruppen, sodass zum Vergleich der Gruppen untereinander eine post-hoc Analyse erfolgt. Die gemessene Aktivität der aktivierten Caspase-3 zeigt eine statistisch signifikante Erhöhung zwischen der Sham Gruppe und allen Hyperperfusionsgruppen, sowie im Vergleich der 90-minütigen zur 120-minütigen Hyperperfusionsgruppe an.

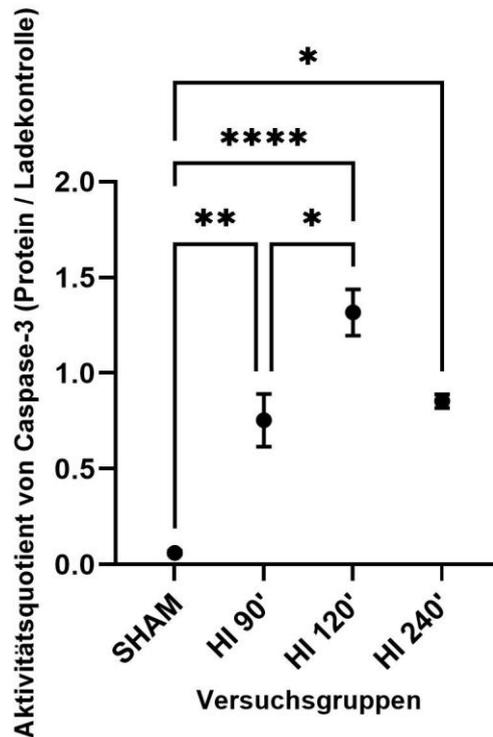


Abbildung 25: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten von aktivierter Caspase- 3 zur Ladekontrolle mit GAPDH, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die Scheingruppe (SHAM) und die Untersuchungsgruppen mit unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten (HI 90', HI 120', HI 240') nach 75%-iger Leberresektion sind abgebildet. Statistik: ordinary one- way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes Angabe der statistischen Signifikanz mit * $p < 0.03$, ** $p < 0,0076$, **** $p < 0,0001$.

4.2.2 Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten für JNK

4.2.2.1 Deskriptive Statistik

Der proapoptotische Aktivitätsquotient von aktivierter SAPK/JNK am Gesamt-SAPK/JNK liegt in der Gruppe mit 90-minütiger Hyperperfusionszeit mit einem Mittelwert von $2,73 \pm 0,74$ mit Abstand am Höchsten. Die Mittelwerte in der Gruppe mit 240-minütiger Hyperperfusion liegen mit $0,033 \pm 0,027$ ähnlich niedrig wie in der Gruppe scheinoperierter Tiere mit $0,0543 \pm 0,0050$. In der Gruppe mit 120-minütiger Hyperperfusionsdauer lag die Enzymaktivität bei $0,27 \pm 0,14$, was einer Reduktion um den Faktor 0,1 entspricht.

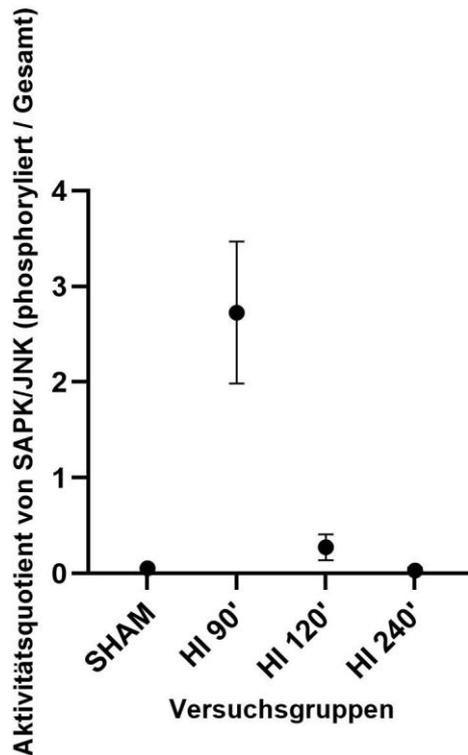


Abbildung 26: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten aktivierter phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt- SAPK/JNK, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die Scheingruppe (SHAM) und die Untersuchungsgruppen mit unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten (HI 90', HI 120', HI 240') nach 75%-iger Leberresektion sind abgebildet. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes

4.2.2.2 Varianzanalyse und post-hoc Test

Die ANOVA zeigt eine statistische Signifikanz von $p=0,0052$ für die gesuchten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bezüglich der Enzymaktivität von JNK. Die post-hoc Analyse dokumentiert statistisch signifikante Unterschiede zwischen den, im unten stehenden Plot, angegebenen Gruppen. Für die HI 90' Gruppe ergibt sich zu jeder anderen Versuchsgruppe eine statistische Signifikanz, welche für die in dieser Arbeit erörterten Fragen die größte Relevanz aufweist.

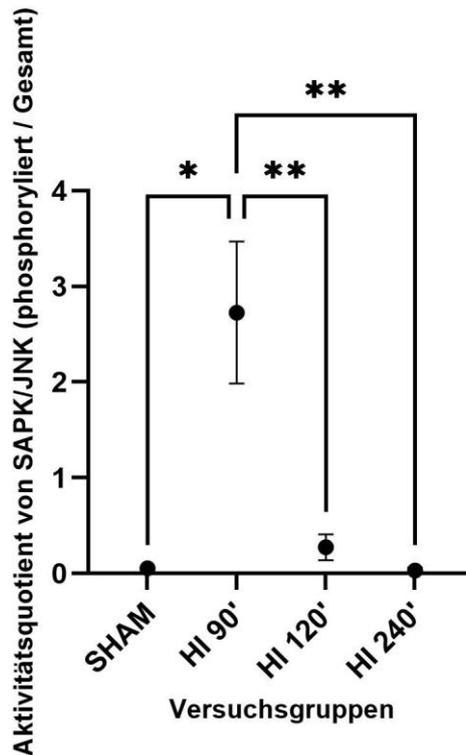


Abbildung 27: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten von aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt- SAPK/JNK, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die Scheingruppe (SHAM) und die Untersuchungsgruppen mit unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten (HI 90', HI 120', HI 240') nach 75%-iger Leberresektion sind abgebildet. Statistik: ordinary one- way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes Angabe der statistischen Signifikanz mit * $p < 0.0105$, ** $p < 0,009$.

4.2.3 Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten für ERK

4.2.3.1 Deskriptive Statistik

Das Ausgangsniveau der Enzymaktivität der lebenserhaltenden Kinase ERK in der SHAM-Gruppe beläuft sich auf ein Niveau von $0,085 \pm 0,022$. Die größte Enzymaktivität wird mit $12,3 \pm 2,5$ im Mittel für HI 120' berechnet, was einer Steigerung um den Faktor 144 entspricht, dicht dahinter folgt die HI 90' Gruppe mit $11,6 \pm 2,6$. In der HI 240' Gruppe sinkt das Aktivitätsniveau auf $7,8 \pm 3,6$.

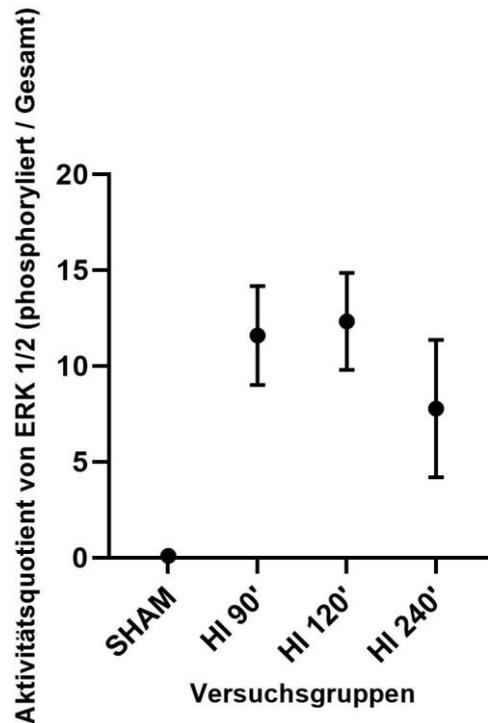


Abbildung 28: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten aktivierter phosphorylierter ERK1/2 und Gesamt-ERK, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die Scheingruppe (SHAM) und die Untersuchungsgruppen mit unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten (HI 90', HI 120', HI 240') nach 75%-iger Leberresektion sind abgebildet. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes

4.2.3.2 Varianzanalyse

Durchgeführt wird eine ANOVA zum Nachweis statistischer Signifikanz zum Beweis von Unterschieden zwischen den Gruppen. Der p Wert liegt hier bei $p = 0,0231$. Die ANOVA ist statistisch signifikant. Post-hoc ergibt sich eine statistische Signifikanz zwischen der SHAM-Gruppe und den Gruppen HI nach 90' und HI 120' Hyperperfusionsdauer.

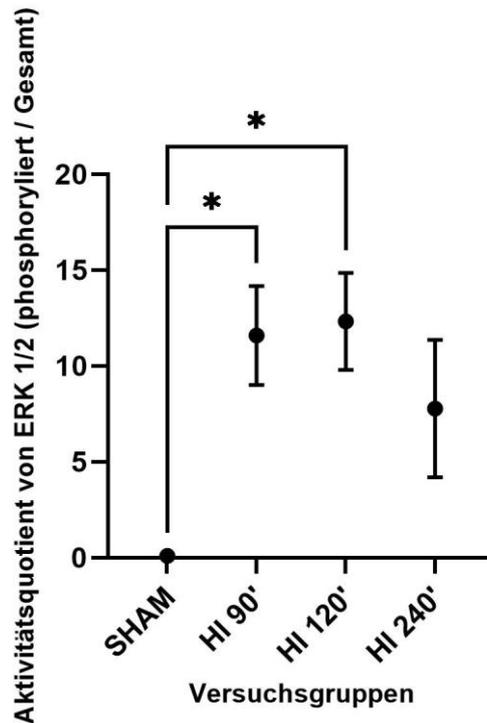


Abbildung 29: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten von aktivierter, phosphorylierter ERK 1/2 und Gesamt- ERK, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die Scheingruppe (SHAM) und die Untersuchungsgruppen mit unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten (HI 90', HI 120', HI 240') nach 75%-iger Leberresektion sind abgebildet. Statistik: ordinary one- way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes Angabe der statistischen Signifikanz mit * $p < 0.03$.

4.2.4 Scheingruppe und unterschiedliche Hyperperfusionszeiten für PARP

4.2.4.1 Deskriptive Statistik

Der angefertigte Plot weist eine konstante, wenn auch geringfügige Zunahme des Aktivitätsquotienten aus gespaltenem PARP zu Gesamt-PARP in der HI 90' und HI 120' Gruppe mit Mittelwerten von $0,079 \pm 0,020$ und $0,828 \pm 0,045$ im Vergleich zur Sham Gruppe mit $0,082 \pm 0,008$ auf. In der Gruppe HI 240' ist der Aktivitätsquotient gegenüber der Scheingruppe um den Faktor 100 erhöht mit $8,0 \pm 1,0$.

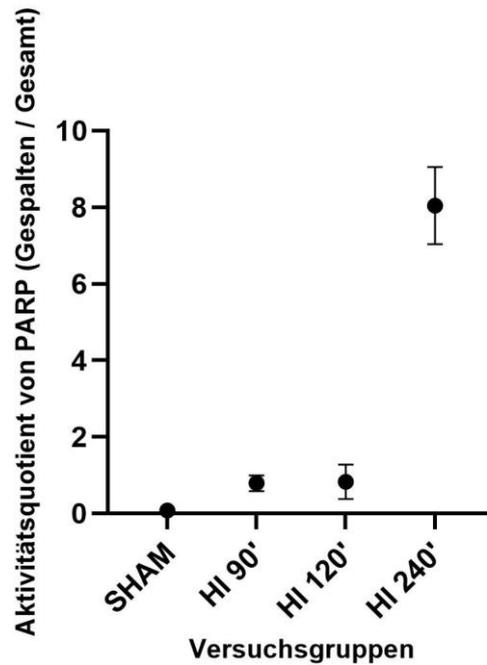


Abbildung 30: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten gespaltenener aktivierter PARP und Gesamt-PARP, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die Scheingruppe (SHAM) und die Untersuchungsgruppen mit unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten (HI 90', HI 120', HI 240') nach 75%-iger Leberresektion sind abgebildet. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes

4.2.4.2 Varianzanalyse

Varianzanalytisch bestätigt sich eine statistische Signifikanz, $p < 0,0001$. Post-hoc Ergebnisse mit Nachweis statistischer Unterschiede zwischen den Gruppen sind in der Abbildung 31 gezeigt.

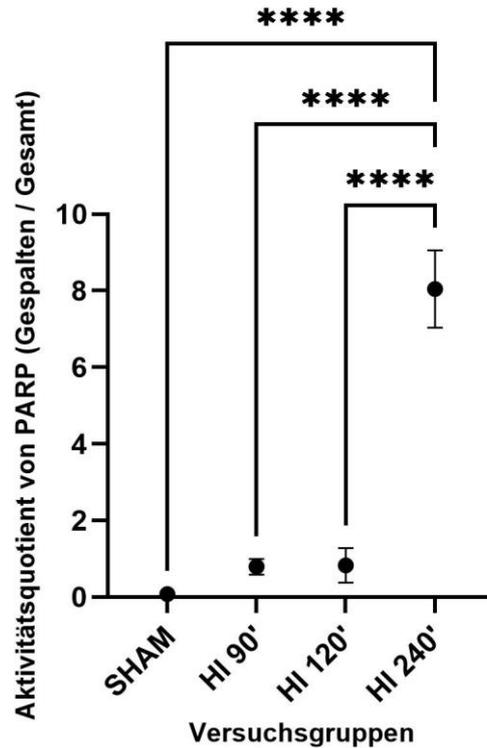


Abbildung 31: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten von aktivierter, gespaltenen und Gesamt- PARP, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die Scheingruppe (SHAM) und die Untersuchungsgruppen mit unterschiedlichen Hyperperfusionszeiten (HI 90', HI 120', HI 240') nach 75%-iger Leberresektion sind abgebildet. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes Statistik: ordinary one- way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test. Angabe der statistischen Signifikanz mit **** $p < 0.0001$.

4.3 Auswirkungen der Behandlung mit DMSO, Baicalein, Tacrolimus und der kombinierten Therapie Baicalein + Tacrolimus auf das small for size Syndrom bei 90-minütiger Hyperperfusion auf proapoptotische Enzyme

4.3.1 Auswirkungen auf die Caspase 3 Aktivität

4.3.1.1 Deskriptive Statistik

In allen Versuchsgruppen mit medikamentöser Behandlung hat sich eine deutliche Reduktion der Effektorcaspase der Apoptose eingestellt. In der unbehandelten Versuchsgruppe HI 90' liegt der Aktivitätsquotient von Caspase 3 bei $0,86 \pm 0,10$. Die deutlichste Aktivitätsreduktion stellt sich mit einem Aktivitätsquotienten von Caspase-3 mit $0,40 \pm 0,02$ in der Gruppe mit

DMSO-Applikation ein und ist damit um den Faktor 0,5 reduziert und ist damit um die Hälfte gesunken. Die Kombination mit Baicalein + DMSO ergibt eine Reduktion, die geringfügig über der der DMSO- Gruppe liegt mit $0,44 \pm 0,27$, sodass die Medikation mit Baicalein keinen überzeugenden zusätzlichen Effekt erzielt. Die Behandlungsgruppe mit Tacrolimus liegt mit dem Aktivitätsquotienten von $0,606 \pm 0,059$ auf gleichem Niveau wie die Gruppe der kombinierten Therapie mit $0,609 \pm 0,047$ und damit um den Faktor 0,7 niedriger.

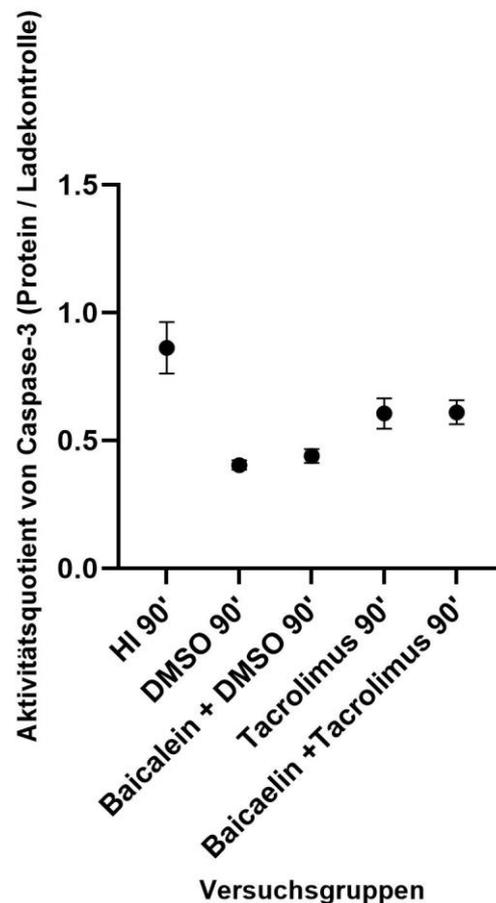


Abbildung 32: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten aktivierter Caspase-3 im Verhältnis zu deren Ladekontrolle GAPDH, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die unbehandelte Versuchsgruppe mit 75%-iger Leberresektion und 90-minütiger Hyperperfusionszeit (HI 90'), und die vier Behandlungsgruppen mit Applikation der angegebenen Medikamente mit ebenfalls 90-minütiger Hyperperfusionszeit sind dargestellt. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes.

4.3.1.2 Varianzanalyse

Eine statistische Signifikanz zeigt die einfache one-way ANOVA mit einem p-Wert von $< 0,0001$ an. Der Vergleich aller Gruppenmittelwerte untereinander in der post hoc Analyse nach Tukey erbringt statistisch signifikante Unterschiede zwischen der unbehandelten Versuchsgruppe und jeder anderen Medikamentengruppe.

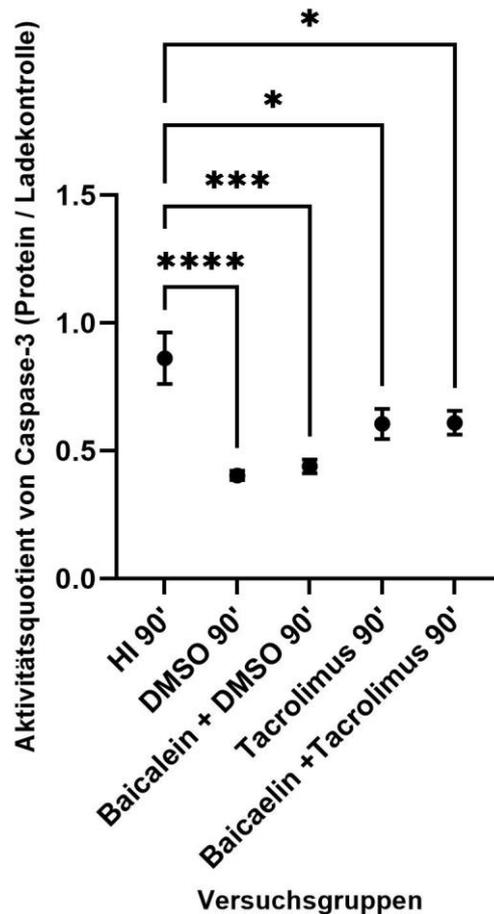


Abbildung 33: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten aktivierter Caspase-3 im Verhältnis zu deren Ladekontrolle GAPDH, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die unbehandelte Versuchsgruppe mit 75%-iger Leberresektion und 90-minütiger Hyperperfusionszeit (HI 90'), und die vier Behandlungsgruppen mit Applikation der angegebenen Medikamente mit ebenfalls 90-minütiger Hyperperfusionszeit sind dargestellt. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes Statistik: ordinary one-way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test. Angabe der statistischen Signifikanz mit **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,0002$, * $p < 0,037$.

4.3.2 Auswirkungen auf die SAPK/JNK Aktivität

4.3.2.1 Deskriptive Statistik

Die Auswertung der medikamentösen Effekte auf die SAPK/JNK Aktivität der untersuchten Gruppen zeigt insbesondere in der unbehandelten Versuchsgruppe und der Baicalein (+DMSO) behandelten Gruppe eine vergleichsweise große Streuung. Insgesamt ergibt sich insbesondere für die kombinierte Behandlungsgruppe, Tacrolimus-Gruppe und DMSO-Gruppe eine überwiegende Reduktion des Aktivitätsquotienten von SAPK/JNK. Das Ausgangsniveau des Aktivitätsquotienten von SAPK/JNK liegt in der unbehandelten Gruppe bei $2,73 \pm 0,74$. Die Baicalein-Gruppe erfährt eine Reduktion um 0,4 auf $2,32 \pm 0,44$, gefolgt von der Tacrolimus Interventionsgruppe mit einem Aktivitätsniveau von $0,76 \pm 0,35$, in der kombinierten Therapiegruppe dann von $0,592 \pm 0,096$ und für die DMSO-Gruppe von $0,33 \pm 0,18$, was in umgekehrter Reihenfolge je Gruppe einer Reduktion um den Faktor 0,12 für DMSO, 0,22 für die kombinierte Therapie, 0,27 für Tacrolimus, 0,85 für Baicalein ergibt.

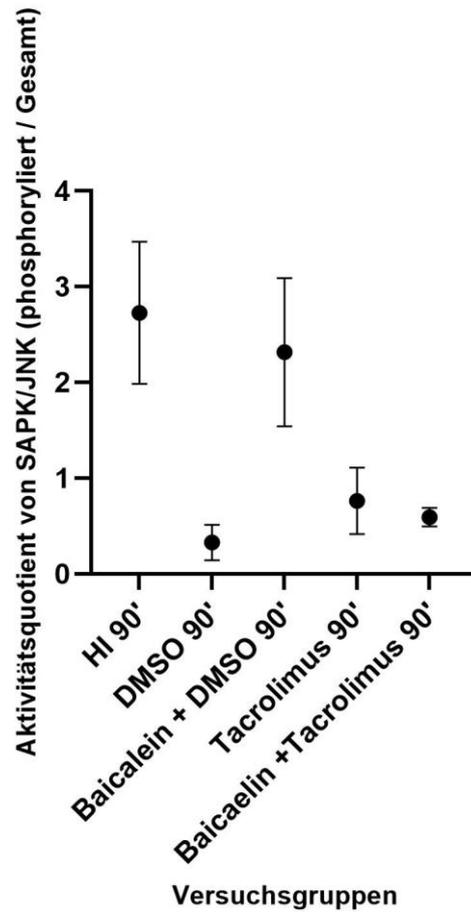


Abbildung 34: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter SAPK/JNK und Gesamt-SAPK-JNK, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die unbehandelte Versuchsgruppe mit 75%-iger Leberresektion und 90-minütiger Hyperperfusionszeit (HI 90'), und die vier Behandlungsgruppen mit Applikation der angegebenen Medikamente mit ebenfalls 90-minütiger Hyperperfusionszeit sind dargestellt. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes

4.3.2.2 Varianzanalyse

Die bei heterogener Standardabweichung mit Brown-Forsythe ANOVA berechnete Analyse ergibt eine statistische Signifikanz für die Unterschiede unter den Gruppen mit $p = 0,0145$. Post hoc liegen die Ergebnisse für alle Gruppenvergleiche untereinander im nicht signifikanten Bereich, so dass aufgrund der eindeutig positiven ANOVA davon ausgegangen werden kann, dass die Medikamente Einfluss nehmen. Für eine klare Differenzierung, welche Gruppe sich statistisch signifikant von der Gruppe mit 90' Hyperperfusion unterscheidet bzw. am Ende gesichert eine Wirkung hat, wäre eine Statistik mit größerer Zahl an Individuen zu wiederholen. Der grundsätzliche Trend der Ergebnisse kann dennoch

der deskriptiven Statistik entnommen wird. Es ist in der gesamten statistischen Analyse die einzige Brown-Forsythe ANOVA bei heterogener Standardabweichung ohne statistische Signifikanz im post-hoc Test. Zur genaueren statistischen Beurteilung des vielversprechendsten deskriptiven Ergebnisses, wird für die Gruppen HI 90' und die kombinierten Medikamentengruppe ein t-Test durchgeführt. Dieser ungepaarte Welch's t-Test bei heterogener Varianz der beiden Gruppen ergibt eine statistische Signifikanz mit $p=0,0280$ und bestätigt das deskriptive Ergebnis somit mit statistischer Signifikanz.

Das Problem des kumulierten Fehlers zweiter Art für den t-Test wird hier vermieden, indem dieser hier einmalig zum Einsatz kommt.

4.3.3 Auswirkungen auf die ERK 1/2 Aktivität

4.3.3.1 Deskriptive Statistik

Das Ausgangsniveau des ERK 1/2 Aktivitätsquotienten in der unbehandelten Interventionsgruppe beträgt $11,6 \pm 2,6$, in allen Versuchsgruppen mit Ausnahme der der kombinierten Therapie ergibt sich eine Reduktion des Aktivitätsquotienten für ERK 1/2. Die deutlichste Reduktion weist erneut die DMSO-Gruppe mit $5,3 \pm 2,1$ und damit eine Verringerung um das 2,4-Fache auf. Für die Baicalein-Reduktion zeigt sich eine Aktivitätsabnahme um den Faktor 1,3 mit einem Mittelwert von $9,1 \pm 1,6$. In der Tacrolimusgruppe liegt das Aktivitätsniveau im Mittel ganz ähnlich mit $9,2 \pm 3,6$. Interessanterweise wird in der Gruppe der Medikamentenkombination ein ERK 1/2-Aktivitätsanstieg registriert. Dieser liegt mit $17,7 \pm 3,6$ um den Faktor 1,5 höher gegenüber der unbehandelten Gruppe.

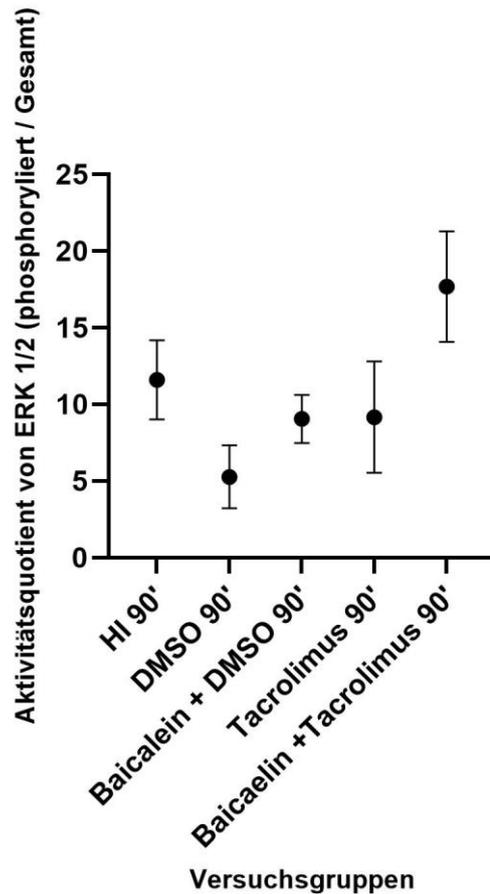


Abbildung 35: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK 1/2 und Gesamt- ERK 1/2, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die unbehandelte Versuchsgruppe mit 75%-iger Leberresektion und 90-minütiger Hyperperfusionszeit (HI 90'), und die vier Behandlungsgruppen mit Applikation der angegebenen Medikamente mit ebenfalls 90-minütiger Hyperperfusionszeit sind dargestellt. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes

4.3.3.2 Varianzanalyse

Mit einem p-Wert von 0,045 ist die ANOVA statistisch signifikant. Post hoc ergibt sich lediglich eine statistische Signifikanz im Vergleich zwischen DMSO und Baicalein + Tacrolimus. Insgesamt kann von einem negativen Regulationstrend nach medikamentöser Applikation gesprochen werden in Bezug auf die ERK 1/2 Aktivität mit Ausnahme der Gruppe, welche eine kombinierte Therapie erhalten hat. Die dort eindeutige Aktivitätszunahme wird in der Diskussion beleuchtet.

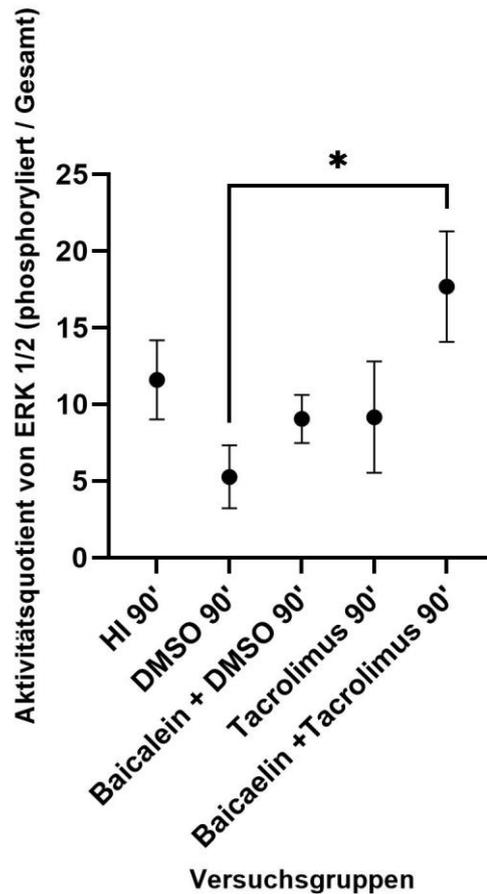


Abbildung 36: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, phosphorylierter ERK 1/2 und Gesamt- ERK 1/2, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die unbehandelte Versuchsgruppe mit 75%-iger Leberresektion und 90-minütiger Hyperperfusionszeit (HI 90'), und die vier Behandlungsgruppen mit Applikation der angegebenen Medikamente mit ebenfalls 90-minütiger Hyperperfusionszeit sind dargestellt. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes Statistik: ordinary one- way ANOVA und Tukey's multiple comparisons test. Angabe der statistischen Signifikanz * $p < 0,026$.

4.3.4 Auswirkungen auf die PARP-Aktivität

4.3.4.1 Deskriptive Statistik

Gegenüber der unbehandelten Gruppe zeigt sich ein eindeutiger Regulationstrend mit Zunahme des PARP- Aktivitätsquotienten in der Gruppe der behandelten Tiere mit DMSO und Tacrolimus. Die Kombinationstherapie und alleinige DMSO-Behandlung ergeben keine Aktivitätsreduktion.

Für die unbehandelte Gruppe liegt das Aktivitätsniveau von gespaltenem PARP zu PARP-Gesamt bei $0,79 \pm 0,22$. Nach Baicalein- Behandlung ergibt sich mit $0,787 \pm 0,075$ keine Reduktion des Aktivitätsniveaus, ebenso wenig mit $0,804 \pm 0,068$ für die kombinierte

Therapie. In der DMSO-Gruppe lässt sich eine Erhöhung auf ein Aktivitätsniveau von $2,55 \pm 0,38$ und in der Tacrolimus-Gruppe auf ein Niveau von $1,8 \pm 0,6$ ausmachen.

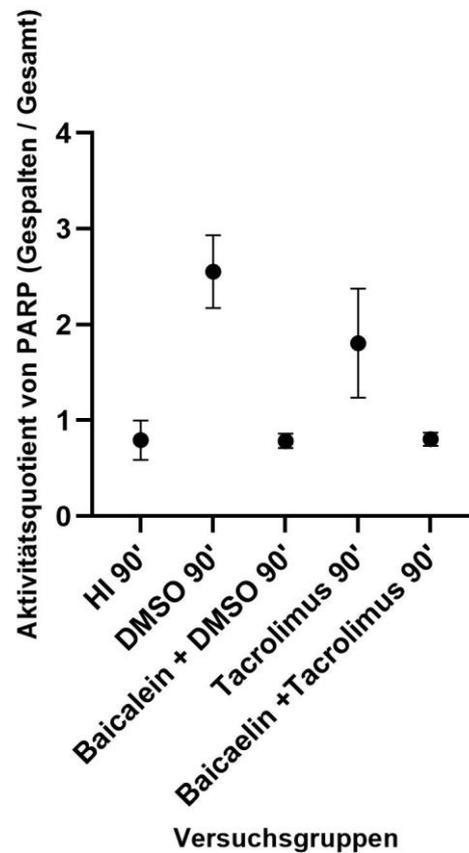


Abbildung 37: Graphische Darstellung des Gruppenmittelwerts des Aktivitätsquotienten aus aktivierter, gespalteener PARP und Gesamt-PARP, nach Proteinbestimmung im explantierten Lebergewebe mittels Western Blot. Die unbehandelte Versuchsgruppe mit 75%-iger Leberresektion und 90-minütiger Hyperperfusionszeit (HI 90'), und die vier Behandlungsgruppen mit Applikation der angegebenen Medikamente mit ebenfalls 90-minütiger Hyperperfusionszeit sind dargestellt. Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes

4.3.4.2 Varianzanalyse

Bei heterogener Standardabweichung wird die Varianzanalyse mittels Brown-Forsythe-ANOVA test durchgeführt und erbringt eine statistische Signifikanz von $p = 0,0286$. Die post-hoc Analyse zur Veranschaulichung, welche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen im Vergleich vorliegen, ergibt keine signifikante Aussage.

5. Diskussion

Für einen Großteil von Lebererkrankungen im Endstadium bietet die Leberresektion, Lebertransplantation oder Leberteiltransplantation die letzte Chance auf Heilung.

Die unmittelbar mit der operativen Therapie der Resektion und Teillebertransplantation verbundenen Auswirkungen bestimmen über den Therapieerfolg. Aufgrund dieses bestimmenden Ausmaßes des komplexen perioperativen (Ischämie-) und Re- bzw. Hyperperfusionsschaden, ist die Vermeidung und Abschwächung dieser Komplikation, seit über 60 Jahren Gegenstand und Ziel der Forschung.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, den Hyperperfusionsschaden nach majorer Hepatektomie fokussiert zu untersuchen. Im Speziellen soll das, mit dem Hyperperfusionsschaden assoziierte Ausmaß an Zelltod, die dahinter liegende Zelltodform, als auch mögliche ausschlaggebende pathophysiologische Signalkaskaden evaluiert und verschiedene Therapieansätze erprobt werden.

5.1 Diskussion der Ergebnisse

5.1.1 Zelltod im Lebergewebe nach unterschiedlichen

Hyperperfusionsintervallen

Die TUNEL Assay Analysen und deren Quantifizierung des Zelltodanteils am Gesamtgewebe zeigen, dass der Hyperperfusionsschaden signifikant in den verbleibenden 25% Lebergewebe, nach 75-%iger Leberresektion, mit der Dauer zunächst linear ansteigt und dann wieder fällt.

Die deskriptive Statistik der Scheingruppe und unterschiedlichen Reperfusionzeiten, entspricht im Trend der angenommenen Hypothese, dass durch die Intervention und Hyperperfusion ein Zellschaden mit Zellzerfall eintritt und unter den verschiedenen Beobachtungsintervallen Differenzen zu verzeichnen sind. Zwischen 90 und 120 Minuten lässt sich ein linearer Anstieg des Zelltodanteils erfassen. Dass nach 240-minütiger

Hyperperfusionszeit der Zelltodanteil am Gesamtgewebe im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen mit 90 und 120 Minuten Hyperperfusionszeit wieder abnimmt, unterstreicht die Vermutung, dass intrinsische Reparaturmechanismen innerhalb des Hyperperfusionsschadens ab einem gewissen Zeitpunkt aktiviert werden und den eingetretenen Schaden mindern oder eine andere Form von Zelltod überwiegt und Apoptose ablöst.

Das Ergebnis, dass der Zelltodanteil mit steigender (Hyper-) Perfusionszeit zunimmt, deckt sich mit den wenigen anderen tierexperimentellen Studien zum alleinigen Hyperperfusionsschaden wie der Arbeit um Xie et al (263) und vielfältigen Quellen zum gut erforschten Ischämie-Reperfusionsschaden. Anders als in der Arbeit von Xie et al, weisen die vorliegenden Experimente ihren gemessenen Höhepunkt an Zellschaden nach 120 Minuten und nicht nach 60 Minuten auf. Dabei ist anzumerken, dass bzgl. des Zelltodnachweises und Leberschadens unterschiedliche Methoden und Parameter verwendet wurden und somit kein exakter Vergleich und keine exakte Übereinstimmung der Ergebnisse vorliegen kann. Die Abnahme des Zelltodanteils mit Fortschreiten der Organschädigung über eine Hyperperfusionsdauer über 240 Minuten hinaus, erscheint primär widersprüchlich, deckt sich aber aus prinzipieller Sichtweise mit Untersuchungen aus frühen Experimenten zum Zelltod nach Ischämie und Reperfusion nach Lebertransplantation an der Ratte, Rentsch et al (264). Hier kann das Einsetzen von Zellproliferation und Reparaturmechanismen eine mögliche Ursache sein. Aus der Forschung ist die Annahme bekannt, dass Zelltod (im Ischämie-Reperfusionsschaden) in Form von Nekrose nach ungefähr 180 Minuten makroskopisch detektierbar ist. Daher kann postuliert werden, dass die Zellregeneration kurze Zeit später eintreten muss. Die im Rahmen der Nekrosebildung, entstehenden Bläschen, welche Plasmamembranvorsprüngen entsprechen und im Rahmen der, durch ATP-Verlusts vermittelten MPT auftreten, ist zumindest in Teilen nachweislich reversibel (73,109,265). Auch zeigen sich Nachweise für Zellerholung nach stattgefundenener Apoptose, insbesondere für Zellen, die eine Caspase-Aktivierung und Bildung apoptotischer Körper zeigen. Dieser Prozess findet unter dem Namen Anastase statt (265).

Eine andere Erklärung bietet die Überlegung, dass das Gewebe überwiegend bereits nekrotisch ist. Nekrose und fortgeschrittener Zelltod sind via TUNEL Assay nicht detektierbar, da dieser explizit dem Apoptose Nachweis dient. Es gibt auch kritische Arbeiten, wie die von Kraupp et al, die postulieren, dass der TUNEL Assay in der Diskriminierung zwischen den verschiedenen Formen des Zelltods scheitert (266).

Die Zellregeneration stellt einen sehr komplexen Gegenmechanismus zum Zellschaden dar, der zahlreiche hepatotrope Faktoren, Zytokine, Signalwege und Transkriptionsfaktoren umfasst (267). Das anfängliche Lebervolumen spielt hinsichtlich des Regenerationsmechanismus eine tragende Rolle. Fehlen nur geringe Volumenanteile findet die Regeneration über Zellhypertrophie statt, bei großen Leberresektionen über Hypertrophie und Zellproliferation zu gleichen Anteilen (268).

Die Hepatozytenregeneration erfolgt über unterschiedliche Proliferationsstimuli, die durch die Leberresektion direkt bedingt werden können (267,269–271). Einer der wichtigsten Stimuli ist der Scheer-Stress (272). Die vollständige Leberregeneration eines 30% des Gesamtvolumens fassenden grafts in Nagetieren ist vollständig nach 3 Tagen nahezu abgeschlossen. Bei Menschen dauert die Leberregeneration durchschnittlich 3 Monate. Die DNA- Synthese erreicht nach 7-10 Tagen im menschlichen Organismus ihren Höhepunkt (267,273,274).

Die Schlussfolgerung, dass Zellregeneration bei 240 Hyperperfusion bereits eingesetzt hat, wird durch die Untersuchung der proapoptotischen Enzyme im Folgenden bekräftigt.

5.1.2 Proapoptotische Enzyme in den unterschiedlichen Hyperperfusionsgruppen

In allen Gruppen zeigt sich analog zum Anstieg des Zelltodanteils bis 120 Minuten Hyperperfusion ein Anstieg der proapoptotischen Enzyme. Für Caspase 3 ist dieser Anstieg linear bis 120 Minuten. Auch ERK zeigt in der Gruppe mit 120-minütiger Hyperperfusionszeit die höchste Aktivität. Der Aktivitätsquotient für das proapoptotische Enzym JNK ist in der

Gruppe mit 90 Minuten Hyperperfusion am Höchsten. Allen Aktivitätsquotienten von ERK, JNK und Caspase 3 gemein ist ein Aktivitätsabfall bei 240 Minuten Hyperperfusion.

JNK liegt hier auf dem Niveau der Schein Gruppe. Caspase 3 fällt, das Aktivitätsniveau liegt allerdings noch höher als in der Gruppe mit 90-minütiger Hyperperfusion. Für ERK zeigt sich bei 240 Minuten Hyperperfusion ein Abfall des Aktivitätsniveaus unterhalb des Niveaus bei 90 Minuten. Diese Ergebnisse bestätigen die beiden primären Vermutungen aus der Analyse des TUNEL Assays, dass der Zelltodmechanismus zwischen 120 und 240 Minuten Hyperperfusion die Zelltodform von Apoptose hinzu Nekrose oder anderen im TUNEL-Assay nicht detektierbaren Zelltodformen wechselt oder/und aber Zellregeneration einsetzt. Beide Hypothesen lassen sich durch die Literatur unterstützen und können aus den Erörterungen der Einleitung gestützt werden (Vergleich 1.3).

Aus der Arbeit um Yu B et al geht hervor, dass ERK 1/2 in der Lage ist Caspase 3 zu hemmen und somit auch anti-apoptotische Einflüsse nehmen kann. Da das Caspase 3 Niveau in den hier durchgeführten Experimenten jedoch über dem von ERK 1/2 bleibt, ist zumindest zu mutmaßen, dass ERK 1/2 hier nicht Caspase 3 hemmt und nicht anti-apoptisch wirkt (74).

Für PARP unterscheidet sich die Beobachtung im Vergleich zu den anderen Enzymen deutlich. Hier zeigt sich ein massiver Anstieg des Aktivitätsquotienten in der Gruppe mit der längsten Hyperperfusionszeit (240 Minuten). Für die 90 und 120-minütige Hyperperfusion wird ebenfalls ein Enzymaktivitätsquotienten Anstieg gemessen. Zunächst einmal scheint dieses Ergebnis der Erwartung zu entsprechen, da PARP durch Caspase 3 gespalten wird und somit anfällt und Apoptose vermittelt (275). Weiter oben wurde aufgezeigt (Vergleich Kapitel 1.10), dass je nach Ausmaß des Zellschadens, PARP unterschiedlich wegweisende Richtungen in Hinblick auf das Überleben oder den Tod einer Zelle einnimmt. Wissenschaftlich nachgewiesen ist, dass bei einem massiven Zellschaden die PARP-initiierte Nekrose überwiegt (223,226). PARP-1 ist andererseits in der Lage das Überleben

von Gewebe zu fördern, indem es das Gleichgewicht der Zelltodprogramme zwischen Autophagie und Nekrose verschiebt (276).

Ein anderer Erklärungsansatz im PARP- Anstieg und Caspase 3 Abfall liegt in der weiter oben beschriebenen Caspase- unabhängigen Aktivierung von PARP über AIF und der sogenannten Zelltodform Parthanatos (224,225,227,228,277). Hier wäre dann allerdings entsprechend ein Zelltodanstieg im TUNEL Assay zu erwarten, wobei die Frage offenbleibt, ob die Zelltodform des Parthanatos mit TUNEL hätte nachgewiesen werden können müssen, das gleiche gilt letztlich auch, wie schon erklärt, für Nekrose. An sich muss die klare Aussage getroffen werden, dass das für die Experimente verwendete TUNEL Assay Kit der Firma Sigma Aldrich nach Packungsbeilage dem Nachweis von Apoptose dient (245,278). Und dennoch ist kritisch für die Einordnung der vorliegenden Experimentergebnisse zu berücksichtigen, dass wissenschaftliche Publikationen aufzeigen, dass TUNEL-Assay nicht ausschließlich Apoptose demaskiert und nachweist (241,266,279).

Diese Hypothesen und Forschungsergebnisse berücksichtigend, geht ein hohes Ausmaß an Zellschaden mit hoher PARP-Aktivierung einher und initiiert Nekrose. In unseren Experimenten korreliert ein massiv erhöhtes PARP-Niveau nach 240 Minuten Hyperperfusion mit reduziertem Zelltod Nachweis im TUNEL-Assay. Das gemessene PARP-Aktivitätsniveau ist somit, wie dargelegt, am ehesten Nekrose bedingend. Immer davon ausgehend, dass der durchgeführte TUNEL Assay Apoptose spezifisch nachweist und eben nicht Nekrose. Die andere und doch geringer wahrscheinliche Interpretation ist, dass PARP DNA-reparierend fungiert oder noch als nachweisbares Apoptose-Produkt des vorher stattgefundenen Zelltods via Apoptose nachzuweisen bleibt (280). Die Halbwertszeit von PARP, bei Abwesenheit von zellulärem Stress, liegt allerdings bei unter 40 Sekunden (280). Die Literatursuche liefert keine bekannte durchschnittliche Halbwertszeit für den Nachweis von PARP nach Zelltod (275–277,280,281).

Für das SFSS im Mausmodell kann geschlussfolgert werden, dass primär Apoptose bis 120 Minuten Hyperperfusion als Zelltodform dominiert und zwischen 120 und 240 Minuten

Hyperperfusionszeit die Hepatozyten mutmaßlich die Zelltodform ändern oder aber in Zellregeneration übergehen. Die Arbeitsgruppe mutmaßt eher den Übergang in die Nekrose oder auch eine Koexistenz von Zellregeneration und weiterem Zelltod in anderer Form als Apoptose. Die genauen Signalkaskaden und entsprechenden Rollen der verantwortlichen Proteine sind nach wie vor nicht vollumfänglich geklärt und gilt es weiter zu erforschen.

Die Funktion von ERK, bezogen auf das Überleben oder den Tod einer Zelle, ist multifunktional und kann in beide Richtungen gesteuert werden. Während die antiproliferative Wirkung durch ERK-Aktivierung bereits besser erforscht ist, sind die Mechanismen, die dem ERK1/2-vermittelten Zelltod zugrunde liegen, noch unklarer. Gegenstand der Forschung ist ebenfalls, welche spezifischen Reize unter welchen Bedingungen dazu führen, dass ERK-vermittelt Zelltod oder Zellreparatur stattfindet (213,282,283).

Abhängig von den Zelltypen und der Art der Reize ist eine ERK-Aktivierung verbunden mit dem intrinsischen apoptotischen Weg, der durch die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und der Aktivierung der Initiator-Caspase 9 und Caspase 3 gekennzeichnet ist, oder mit dem extrinsischen apoptotischen Weg, der auf der Aktivierung der Initiator-Caspase-8 beruht. Auch die Expression des Todesrezeptors kann ERK-vermittelt stattfinden und extrinsische Apoptose einleiten (213). Die vorliegenden Experimente weisen über die Korrelation des Nachweises von Zelltod im TUNEL-Assay mit den Aktivitätsquotienten von JNK, ERK und Caspase 3 einen Zusammenhang zwischen dem Hyperperfusionsschadens im SFSS und ERK vermittelter Apoptose auf. Zu mutmaßen ist ferner, dass bei parallel linearem Anstieg von ERK und Caspase 3, intrinsisch vermittelte Apoptose stattfindet und ERK über die intrinsische Signalkaskade ebenfalls Caspase 3 aktiviert und damit Apoptose einleitet.

Die pub med Recherche zur Einordnung der Ergebnisse bezüglich der Rolle von ERK in den aktuellen Forschungsstand hat keine überzeugende Mehrheit dafür ergeben, dass ERK-Aktivierung im (Ischämie-) Hyperperfusionsschaden oder auch in Modellen zum Hyperperfusionsschaden zu einer Zellerholung oder erhöhtem Zellüberleben führt. Einzig

und allein eine Arbeit aus 2021 konnte aufweisen, dass eine Narkose mit Remifentanyl im 70%igen Leberresektionsmodell von Mäusen, über eine Hochregulation von ERK eine Verbesserung der Leberregeneration nach Hepatektomie hat (284). Die Korrelation muss unter Berücksichtigung der anderen und gegensätzlichen Forschungsdaten kritisch bewertet werden (74,95).

Das proapoptotische Enzym JNK zeigt seinen, in diesen Experimenten gemessenen, Aktivitätshöhepunkt bei 90 Minuten. In der Gruppe mit 120-minütiger Hyperperfusion zeigt sich ebenfalls ein Anstieg, dieser bleibt jedoch gering. Für die Gruppe mit 240-minütiger Hyperperfusion liegt das Niveau auf Scheingruppen Ebene. Daraus wird gefolgert, dass JNK vermittelte Apoptose vor allem in den ersten 90 Minuten während des Hyperperfusionsschadens im SFSS stattfindet. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem aktuellen Wissensstand zur Aktivierung und Rolle von JNK im hepatischen IRI und unterstreichen die Bedeutsamkeit, die JNK vermittelter Zelltod, genauer: Apoptose, für den Re- und Hyperperfusionsschaden einnimmt. Aus der Forschung zum hepatischen IRI ist geläufig, dass insbesondere Stress und Inflammation, unter anderem ROS vermittelt, zur Aktivierung von JNK führen (285–291).

Die Forschungsgruppe um D. Crenesse et al hat für den Ischämie-Reperfusionsschaden im Rattenmodell mit warmer Ischämie über 120 Minuten und einer Reperfusion über 240 Minuten den Zusammenhang zwischen JNK und der Entstehung von Apoptose beobachtet. In verschiedenen Arbeiten mit in vivo Experimenten im Rattenmodell gelang es Crenesse zum einen den Zusammenhang zwischen hepatischem IRI und Caspasen-aktiviertem Zelltod aufzuzeigen und dabei zu belegen, dass die Inhibition von JNK-1 Apoptose verhinderte (233,292–296).

Der Höhepunkt der arteriellen und portalvenösen Hyperperfusion, liegt nach tierexperimentellen Studien an der Ratte und dem Schwein zufolge bei 60 Minuten (51,78). Dann treten reaktive Sauerstoffspezies, durch das Hyperperfusion- bedingte Überangebot von Sauerstoff, auf den Plan (Vergleich Kapitel 1.2.1.2 und Abb. 2) und aktivieren JNK. JNK

zählt hier zu den entscheidenden, durch ROS aktivierten, proapoptotischen Enzymen (Vergleich Abbildung 3) (74). Als Mediator für Inflammation, sowie durch den direkten Einfluss auf die Mitochondrien, verursacht JNK Apoptose (297,298). Die Ergebnisse der Experimente unterstützen den aktuellen Wissensstand und unterstreichen die Relevanz von JNK induzierten pathophysiologischen Signalkaskaden bis hin zum Zelltod im SFSS. Hinsichtlich der Aktivitätsquotientenanstiege und zeitlichen Korrelation der Enzyme im Vergleich von Caspase 3, ERK und JNK bis 120 Minuten Hyperperfusion und des im TUNEL Assay nachgewiesenen Zelltods, lässt sich des Weiteren die Hypothese erhärten, dass Apoptose maßgeblich für den Hyperperfusionsschaden im SFSS verantwortlich ist.

5.1.3 Effekt der medikamentösen Intervention auf den Zelltod

Der Anteil an Zelltod am Gesamtgewebe wird durch die Medikamentenapplikation in allen Gruppen statistisch signifikant reduziert. Am Deutlichsten wird diese Reduktion, in der mit Tacrolimus behandelten Gruppe, gefolgt von Tacrolimus und Baicalein, DMSO und zuletzt Baicalein.

Die protektive Wirkung von Tacrolimus auf den Hyperperfusionsschaden im small for size Syndrom ist auf unterschiedliche etablierte Effekte zurückzuführen (Vergleich Kapitel 1.6). Dazu zählen die Verbesserung der Mikrozirkulation, Reduktion freier Radikale und Entzündungskaskaden, Förderung der mitochondrialen Stabilität, Inhibition der Apoptose, und Geweberegeneration (198). Für den Hyper- als auch für den klassischen Reperfusionsschaden ist insbesondere diese vielfältige antiinflammatorische Wirkung von Tacrolimus zu beachten (194,198). Die Versuchsergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit der Inflammation für die Pathophysiologie des SFSS.

Die Tacrolimus bedingte Inhibition von TNF alpha, IL-1 und IL-6 führt zur Unterdrückung der akute Phase Reaktion, Neutrophilenmigration, ROS und MAP-Kinasen-, inklusive JNK-Aktivierung, Vermeidung der Fas-abhängigen Apoptose, Organdysfunktion, sowie über NF-KB Inhibition zur Reduktion der Leukozytenakkumulation und Suppression der Inflammation

fördernden Kupferzellen (190,197). Die immunsuppressive Wirkung von Tacrolimus entfaltet sich über die spezifische CD4+- und CD8+-T-Zell-Inhibition. Für Transplantate ist diese Wirkung entscheidend, um die T-Zell-abhängige Abstoßungsreaktion zu unterbinden. Auch die T-Zell-abhängige inflammatorische Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen wird unterbunden (73,299–302)

Bereits Garcia-Criado et al haben 1997 herausgearbeitet, dass Tacrolimus eine protektive Wirkung durch Inhibition unterschiedlicher proinflammatorischer Signalkaskaden im hepatischen IRI erzielt (303). Kristo et al zeigten 2011 in einer randomisierten Studie mit intraportaler Tacrolimus Applikation bei orthotopen Lebertransplantationen, dass es zu einer signifikanten Reduktion der Inflammation und Immunantwort in den Lebertransplantaten kam (304). Analog zu Forschungsergebnissen zum hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden, zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Inflammation als Mediator für den Hyperperfusionsschaden betrachtet werden muss. Die Inflammation spielt für den Reperfusionsschaden und Hyperperfusionsschaden eine fundamentale Schlüsselrolle, weil sie einerseits am Anfang der pathophysiologischen Signalkaskade steht und andererseits permanent unterhalten wird, was die Zellschädigung ungehindert fortsetzt (Vergleich Kapitel 1.2.1.2). Das Durchbrechen dieses Inflammations- und Teufelskreislaufs gelingt durch den Einsatz von Tacrolimus. Die signifikante Zelltodreduktion durch den Einsatz von Tacrolimus, die mit deutlichem Abstand zu den anderen Versuchsgruppen mit medikamentöser Intervention dokumentiert wird, unterstreicht die Bedeutsamkeit der Inflammation im SFSS.

Zu Beginn des Hyperperfusionsschadens führt die Reoxygenierung und das erhöhte Sauerstoffangebot zur Entstehung freier Sauerstoffradikale (ROS), welche Endothel- und Gewebeschaden bedingen, der wiederum zur Aktivierung von Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten mit globaler inflammatorischer Antwort führt und den Gewebeschaden weiter aggraviert. Thrombozytenakkumulation mündet in Mikrozirkulationsstörung. In der frühen Reperfusionsphase wird über die Thrombozytenadhäsion am Gefäßendothel hepatozelluläre Apoptose induziert. Vermittelt wird die Mikrozirkulationsstörung mit

konsekutiver Apoptose durch Fibrinogenablagerung auf dem interzellulären Adhäsionsmolekül ICAM-1 (305). Es konnte gezeigt werden, dass Tacrolimus als Antagonist des inflammatorisch wirksamen Thrombozyten-aktivierenden-Faktors (PAF – platelet activating factor) diese Form der initialen Mikrozirkulationsstörungen unterbindet (306,307). Weiter führt Tacrolimus zur verbesserten Mikrozirkulation über die Inhibition der Endothelin-1 Expression (180,308).

Zu den, den inflammatorischen Kreislauf unterhaltenden, Adhäsionsmolekülen gehören neben den bereits erwähnten Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und VCAM-1 (Vergleich Kapitel 1.2.1.2) Adhäsionsmoleküle der Selektinfamilie (L-Selectin, P-Selektin und E-Selektin). Diese Zelloberflächenmoleküle binden zu Beginn der initialen Endothelverletzung an Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen und führen neben der Aktivierung der Inflammationskaskade auch zur Zirkulation der Zellen und Diapedese in das beschädigte Gewebe, wo sie akkumulieren und den Zellschaden befeuern (309–313) Über die Inhibition von NF-KB erreicht Tacrolimus eine Reduktion der Transkription von ICAM-1 Genen und P-Selektin mit konsekutiver Verringerung der Leukozytenakkumulation und Migration (303,314).

Der Transkriptionsfaktor NF-KB wird durch Tacrolimus effizient inhibiert, was zu einer drastischen Reduktion in der Genexpression von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Immunrezeptoren sowie den beschriebenen Zelladhäsionsmolekülen führt. Tacrolimus hemmt die genetische Expression multipler Interleukine, TNF alpha und die Interferon gamma mit nachweislicher Unterdrückung der Inflammation und reduziertem Zellschaden nach Reperfusion (315,316).

Wie bereits weiter oben erwähnt, führt die TNF alpha und IL-6 Suppression durch Tacrolimus sowohl direkt in der frühen Reperusionsphase zur zentralen Inhibition der Inflammationskaskade mit nachgeschalteter Zellschädigung durch lokal verursachten Schaden, als auch zur Unterdrückung der Rekrutierung von Neutrophilen (Vergleich auch Kapitel 1.6 und 1.2.1.2, Vergleich Abbildung 1- 3) (198).

Die Aufrechterhaltung des zellulären ATP-Gehalts, die Unterdrückung der Bildung freier Radikale und mögliche antioxidative Aktivitäten bewirken einen Tacrolimus-induzierten Schutz vor freien Radikalen (198) (194,317). Für den hepatischen IRI ist die genaue Entstehung von ROS gut erforscht und in eine frühe, intermediäre und späte Phase gegliedert. ROS entstehen hier unmittelbar durch die Hyperoxygenierung nach Ischämie, die mit einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration einhergeht und zu einem ungeordneten Anstieg von ROS mit zellulären und mitochondrialen Veränderungen führt, die irreversibel sind und Zelltod bedingen (Vergleich Abbildung 2) (71). ROS zählen zu den wichtigsten Mediatoren des inflammatorischen Zellschadens im IRI (194,318). Die Forschungsergebnisse dieser Arbeit lassen mutmaßen, dass auch für das SFSS ROS vermittelte Inflammation eine Schlüsselrolle einnimmt und Tacrolimus bei der Inhibition dieses Zellschadens eine wichtige therapeutische Rolle zukommt.

Die initiale Mikrozirkulationsstörung im Hyperperfusionsschaden mit bedingter Zellschädigung führt zur Aktivierung der Zellimmunität und Endothelzellen, Neutrophilen und Kupferzellen, welche für die ROS-Freisetzung verantwortlich sind. Für die Phasen des IRI gilt, dass Kupferzellen in frühen Phasen der Reperfusion (die ersten 120 Minuten) und Neutrophile in späten Phasen der Reperfusion (ab 120 Minuten) die Hauptquelle der ROS-Produktion inne haben (71). Die Neutrophilenmigration, ist wie schon beschrieben, u.a. Zytokin und Chemokin abhängig. Aktivierung der Neutrophilen schädigt die Hepatozyten direkt über Freisetzung von Oxidantien, Myeloperoxidase und Proteasen (62). Tacrolimus ist in der Lage die Myeloperoxidase explizit zu inhibieren (62). Auch die Kupferzell Aktivierung und Neutrophilenakkumulation wird durch Tacrolimus inhibiert (62,305). ROS entstehen weiterhin durch die massive Lipidperoxidation, die nach partieller Hepatektomie eintritt (319–321). Auch die Mitochondrien sind maßgeblich an der Produktion von ROS beteiligt. Mitochondriale Antioxidantien-Level, wie die Glutathionperoxidase, sinken nach partieller Hepatektomie ab, während mitochondriale Proteine vermehrt oxidiert werden, als Resultat der gestörten mitochondrialen Permeabilität mit beeinträchtigter oxidativer Phosphorylierung

(322–325). Aus der Forschung zum hepatischen IRI ist wiederum bekannt, dass Tacrolimus in der Lage ist den ROS vermittelten Zellschaden zu mildern (303,326).

Die Signalwege der Inflammationsreaktion sind vielfältig und auf den verschiedenen Ebenen der Signalkaskade im SFSS vertreten. Tacrolimus ist in der Lage gezielt in die Mechanismen der pathophysiologischen Signalkaskade einzugreifen und auf diverse hepatoprotektive Weise den Hyperperfusionsschaden abzuschwächen. Für genauere Aussagen bezüglich der Inhibition einzelner Zytokine, Proteine und Enzyme, bedarf es spezifischer Experimente.

Ferner lassen die Ergebnisse schlussfolgern, dass das Gleichgewicht zwischen chirurgisch experimentell induziertem Zelltod und anschließender Zellregeneration durch Tacrolimus zugunsten der Zellprotektion und Promotion der Zellregeneration verschoben wird. Hyperglykämie und Diabetes mellitus treten als Nebenwirkungen der systemischen Tacrolimusmediation durch Inhibition der Transkription für Insulin codierender Gene, Unterdrückung der Insulinausschüttung und Induktion von β -Zell Apoptose im Pankreas (327–329). Hypertrichiose, vermehrtes Nagelwachstum und Gingivahyperplasie sind weitere Nebenwirkungen die bei post-Transplant Patienten unter einer immunsuppressiven Therapie mit Tacrolimus beobachtet werden und Anzeichen für einen shift Richtung Zellproliferation aufzeigen (330–332). Die genauen Signalkaskaden, die den Wachstums- und Proliferationsreiz bedingen, sind aus der Literatur nicht bekannt. Postuliert wird eine Forcierung der Fibroblasten und Kollagensynthese (333). In den 90er Jahren wurden hypertrophe Kardiomyopathie bei Kindern beobachtet (334). Die Haupttodesursache nach Lebertransplantation sind Malignome. Das gilt sowohl für das Neuauftreten von Krebs, als auch das Wiederauftreten von malignen Lebertumoren nach Transplantation (335,336). Dies sind die Ergebnisse einer klinisch randomisierten Studie von Rodríguez-Perálvarez et al aus dem Jahr 2022 mit 13 922 Patienten. Allen gemein ist die erhöhte Exposition mit Tacrolimus als Immunsuppressivum. Die aktuelle Forschung und nationalen wie internationalen Leitlinien beschäftigt sich seit Jahren daher mit der richtigen Dosis für die gewünschten therapeutischen Effekte und Minimierung der unerwünschten Nebenwirkungen (337). Eine

2021 erschienene Studie zum Mundhöhlenkarzinom zeigt einen anti-carcinogenen Effekt durch die medikamentöse Therapie mit Tacrolimus, der auf einen Tacrolimus bedingten Zellzyklusarrest in der G1/S Phase zurückgeführt wird (338). Aus den geschilderten Studienergebnissen und den bekannten pathophysiologischen Mechanismen lassen sich zwei Hauptthesen schlussfolgern: die Dosis der immunsuppressiven Therapie mit Tacrolimus ist entscheidend für den Schlüsselmoment, in dem entschieden wird, ob Zelltod oder Zellproliferation überwiegen, als auch die Hypothese, dass Tacrolimus neben den vielen Eingriffen in der antiinflammatorischen Signalkaskade, eben auch selbst den Zellzyklus regulieren kann. Für die Studie zum Mundhöhlenkarzinom wird gezeigt, dass die Inhibierung von c-myc cyclinD1 und cyclinE1 Expression zum Zellzyklusarrest führt. Für diese Arbeit scheint die Frage interessant, welche Tacrolimus bedingte Gen-Inhibierung den Zelltod im Hyperperfusionsschaden unterbindet und Regeneration ankurbelt. p53 ist an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt und kann über eine Hochregulation Zellzyklusarrest einleiten und nimmt auch für den Zelltod im Reperfusionsschaden eine wichtige Rolle ein (339). Andererseits weisen die Ergebnisse dieser Arbeit daraufhin, dass eine Tacrolimus bedingte JNK-Inhibition mit konsekutiver Reduktion der p53 Phosphorylierung zu verminderter Apoptose führt.

Die Baicaleinbehandlung weist von allen Medikamenten die geringste Zelltodreduktion für den Hyperperfusionsschaden auf, dennoch ist diese deutlich. Das Leberzellüberleben wird hier durch die antioxidativen Eigenschaften von Baicalein vermittelt. Unsere Arbeitsgruppe konnte in einer Arbeit zum Ischämie-Reperfusionsschaden im Mausmodell mit 60-minütiger Ischämie und Reperfusion aufzeigen, dass diese antioxidative Wirkung auf der Hemmung der 12/15-LOX fußt und eine nachweisbare Korrelation mit einem gesteigertem Gluthationmetabolismus und Glutathion-4-Peroxidase einhergeht und somit zu einer Abnahme von oxidativem Stress führt (64). Die durch oxidativen Stress bedingte Oxidation von Membranlipiden und Steigerung des zellulären Peroxidmilieus ist ein häufiger Einstieg für die Ferroptose, die durch lipidbasierte reaktive Sauerstoffspezies Zelltod bedingt (327).

Es kann daher festgehalten werden, dass Inflammation, Apoptose und Ferroptose eine Rolle bei der Entstehung des SFSS spielen.

Die zuvor beschriebene (Vergleich 1.5) anti-inflammatorische, konkreter anti-oxidative Wirkung von DMSO spiegelt sich in den TUNEL-Analysen der Versuchsgruppe mit reduziertem Zelltod wider und die Ergebnisse bestätigen den hepatoprotektiven Effekt des Lösungsmittels. Die Anti-Inflammation führt immer auch zu einer verbesserten Mikrozirkulation.

Insgesamt zeigt Baicalein die geringste mildernde Wirkung auf den Hyperperfusionsbedingten Zelltod. Die günstige Wirkung von Tacrolimus wird durch die Kombination beider Medikamente reduziert, ist aber immer noch intensiv genug, um in der kombinationstherapierten Gruppe ein besseres Ergebnis, hinsichtlich der Zelltodreduktion, zu erzielen, als durch die alleinige Applikation von Baicalein.

Die mangelnden synergetischen Effekte der Kombinationstherapie und damit ausbleibende Überlegenheit einer dualen Medikation, gegenüber einer alleinigen Medikamentengabe, ist möglicherweise auf eine erhöhte Hepatotoxizität zurückzuführen. Jedes einzelne Medikament für sich Baicalein, DMSO und Tacrolimus weist eine gewisse Hepatotoxizität auf, die durch die Kombination verstärkt scheint und dadurch weitere Zelltodreduktion verhindert (64,165,171,328–330). Die Arbeit von Drefs et al unserer Arbeitsgruppe unterstreicht diese Vermutung, da dort Schein-operierte Tiere mit Medikamentenapplikation höhere Zelltodraten aufwiesen, als diese in Schein Experimenten ohne Medikation (64).

Um genauere Aufschlüsse über die, den Zelltod reduzierenden Signalkaskaden und Angriffspunkte der Medikamente zu erhalten, werden nun die Ergebnisse bezüglich der proapoptischen Enzyme diskutiert.

5.1.4 Effekt medikamentöser Interventionen bei 90- minütiger

Hyperperfusionszeit auf proapoptotische Proteinaktivität

Die proapoptotischen Enzyme Caspase 3, JNK und ERK weisen für alle Gruppen der medikamentösen Behandlung eine eindeutige und statistisch signifikante Reduktion auf.

Die stärkste Reduktion für die genannten drei Proteine, erfährt die allein mit dem Trägerstoff DMSO untersuchte Gruppe. Bekannt für DMSO ist eine hepatoprotektive, anti-inflammatorische Wirkung, sodass vermutet werden kann, dass über eine anti-inflammatorische Behandlung eine frühe, in der Signalkaskade up-stream gelegene Inhibition des inflammatorisch vermittelten Zellschadens im SFSS erzielt wird und die proapoptotischen Enzyme dadurch nicht aktiviert werden (170–172)(173–176). Dass, die im SFSS entstehende Inflammation vor allem ROS vermittelt getriggert wird, lässt sich aus der Forschung zum Reperfusionsschaden und dessen ROS-vermittelter Aggravierung ableiten (Vergleich 1.2.1.2) (63–67,69,117,139,198,331,332).

Gleichzeitig lässt sich schlussfolgern, dass weitere wichtige Mediatoren, die über Zellüberleben und Zelltod bestimmen, eine wesentliche Rolle in der Zelltod Initiation im SFSS spielen, da DMSO bezogen auf den makroskopischen Zelltodnachweis, nicht die stärkste Reduktion aufwies.

Die duale Applikation von Baicalein und Tacrolimus ergibt einen signifikanten Anstieg des Aktivitätsquotienten für ERK. Je nach Interpretation der ERK-Rolle für das SFSS kann hier ein toxischer Schaden durch die medikamentöse Kombinationstherapie vermutet werden, was auch am wahrscheinlichsten scheint. Die TUNEL Analyse weist zwar eine verminderte Zelltodrate auf, jedoch fällt diese deutlich geringer aus, als für die anderen Interventionsgruppen.

Für PARP zeigt sich in allen Experimenten mit medikamentöser Behandlung ein anderer Trend. In den mit DMSO und Tacrolimus behandelten Gruppen wird ein statistisch signifikanter Anstieg des Proteins nachgewiesen. Für die mit Baicalein und die kombinierte

Behandlungsgruppe mit Baicalein und Tacrolimus ergibt sich keine Veränderung für die gemessene PARP-Aktivität im Vergleich mit der Schein Gruppe. Bereits in der medikamentnaiven Versuchsreihe mit aufsteigenden Perfusionszeiten ergibt sich kein Anstieg des Proteins bis 120 Minuten Reperfusion.

Bezüglich der Rolle von PARP für den Zelltod im SFSS stellen die aktuellen Ergebnisse lediglich eine Momentaufnahme dar, und es bleiben Fragen offen. Interessant erschiene beispielsweise eine Versuchsreihe mit 240-minütiger Hyperperfusion und Medikamentenintervention. Würde das PARP-Niveau bei medikamentöser Intervention weiter steigen, während der Zelltodnachweis fällt? Und sich somit eine weitere Bestätigung ergeben, dass PARP für Regeneration im SFSS steht. Oder gegenteilig belegt werden, dass hohe PARP-Level für Zelltod stehen? Weiterführende Fragen sind: führt die medikamentöse Wirkung von DMSO und Tacrolimus toxizitätsbedingt zu mehr PARP-vermittelter Apoptose über andere, hier nicht erforschte, Signalkaskaden? Oder sind die Enzymlevel Ausdruck hepatoprotektiver Wirkung der Substanzen Tacrolimus und DMSO. Hier wäre eine Halbwertszeit Messung von PARP nach Zelltod weiterführend hilfreich, um die Ergebnisse besser einzuordnen.

Für Caspase 3 und JNK sind die Ergebnisse der Experimente klarer und entsprechen den angenommenen Hypothesen, dass der Zelltod im Hyperperfusionsschaden des SFSS, Apoptose vermittelt stattfindet und durch die applizierten Medikamente positiv beeinflusst werden kann. Beide proapoptotischen Proteine werden in allen Medikamentengruppen supprimiert und Zelltod nachweislich reduziert, so dass der Rückschluss aus den vorherigen Experimenten unterstrichen wird und Apoptose vermittelter Zelltod eine entscheidende Rolle im SFSS zugesprochen werden kann. Die stärkste Reduktion wird durch die alleinige Applikation von DMSO beobachtet, dicht gefolgt von den anderen Interventionsgruppen.

Schlussfolgernd wird festgehalten, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen des Hyperperfusionsschadens im SFSS beitragen. Zelluntergang spielt nachweislich eine

wegweisende Rolle im Hyperperfusionsschaden bis 120 Minuten. Und zwar in Form von Apoptose. Bei 240 Minuten Reperfusion bleibt die Frage offen, ob Zellregeneration bereits eingesetzt hat oder die Form des Zelltods wechselt. Des Weiteren lässt sich mutmaßen, dass die spezifischen Arten des Zelltods im SFSS nicht nur Apoptose, sondern auch Ferroptose, wahrscheinlich Parthanatos und Inflammation umfassen. Die Applikation des Lösungsmittels DMSO, des Flavons Baicaleins, des Calcineurininhibitors Tacrolimus und die Kombination dieser Medikamente führen alle zur Inhibition des Zelltods. Durch eine Kombination der Medikamente wird keine weitere Wirkungsverstärkung erzielt, ferner lässt sich ein toxischer Effekt auf die Leber mutmaßen. Nachweislich zeigt sich eine Schlüsselrolle im hyperperfusionbedingten Zelltod für die proapoptotischen Enzyme JNK, ERK und Caspase 3, deren Reduktion in direktem Zusammenhang mit Zelltodreduktion steht. Die genaue Rolle und das Verhalten von PARP für den Hyperperfusionsschaden gilt es wie oben geschildert weiter zu untersuchen. Festgehalten werden kann, dass einer Vielzahl weiterer Zelltod vermittelnder Mediatoren eine tragende Rolle zukommt und weitere pathophysiologische Mechanismen für den Hyperperfusionsschaden verantwortlich sind.

6. Ausblick

Die Arbeit leistet mit den in-vivo durchgeführten Experimenten einen Beitrag zum besseren Verständnis für das SFSS selbst, als auch für die verantwortliche Pathophysiologie, insbesondere bezüglich der Zelltodmechanismen. Dadurch ergeben sich unter Berücksichtigung und Einordnung in den aktuellen Forschungsstand zu diesem Themengebiet ebenfalls Rückschlüsse auf die Ursachen, die dem Zelluntergang im SFSS zugrunde liegen. Vor allem hat die Arbeit mögliche Therapiestrategien aufgewiesen, um den Leberzellschaden im SFSS abzuschwächen und molekularpathologische Hinweise in den verantwortlichen Zusammenhang geliefert. Die angewandten Medikamente stellen sich alle als überwiegend gute Therapieoptionen im Einsatz gegen den Hyperperfusionsschaden des SFSS dar. Die hier erfolgte Untersuchung der proapoptotischen Proteine ergibt Aufschluss über deren spezifische Wirkung auf die Signalkaskaden des Zelltods. Weiter zu erforschen und hier nicht abschließend geklärt, bleibt die Rolle von PARP in Hinblick auf den Zelltod und das Zellüberleben im SFSS. Besonders hervorzuheben ist die positive Auswirkung von DMSO als anti-inflammatorische Substanz und Tacrolimus als Multiplayer auf den Zelltod im SFSS. Unsere Ergebnisse unterstreichen die entscheidende und tragende Rolle der Inflammation für den Hyperperfusionsschaden im SFSS und bieten eine Grundlage für weitere Überlegungen und Forschung in diesem Bereich zur Verbesserung des outcomes marginaler Lebertransplantate und Lebervolumina post resectionem. Experimente mit klassischen antiinflammatorischen Medikamenten erscheinen eine Erprobung wert. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass ein frühes Eingreifen up-stream in die pathophysiologische Signalkaskade mit besseren Ergebnissen einhergeht, als mit Medikamenten, die erst down stream Zelltod verhindern. Das beste Abschneiden hinsichtlich der Inhibition von Zelltod und der untersuchten Signalkaskaden liefert Tacrolimus und scheint auf die duale immunsuppressive, als auch direkt anti-inflammatorische Wirkung zurückzuführen zu sein. Das Medikament greift sowohl frühzeitig als auch weiter down stream in die Signalkaskade ein (Vergleich 1.6). Somit ergeben sich wertvolle Therapieansätze, sowohl für die majoren

Hepatektomien, als auch für die Lebertransplantation zur Verbesserung des outcomes des SFSS, welches für über 60% der postoperativen Todesfälle verantwortlich ist (29).

7. Zusammenfassung

Leberresektionen, Lebertransplantationen und vor allem Leberteiltransplantationen spielen in der viszeralchirurgischen Medizin eine wichtige Rolle, als oft letzte kurative Therapieoption für Menschen mit virusassoziierten, entzündlichen nutritiv und alkoholbedingten Lebererkrankungen sowie primär und sekundären Lebertumoren. Insbesondere vor dem Hintergrund des weltweiten Organspende Mangels hat die Leberteiltransplantation an Bedeutung gewonnen. Im Jahr 2023 wurden 1628 Lebertransplantationen in Europa nach Angabe von Eurotransplant durchgeführt, davon mindestens 14% als Lebendspende. Zu den schwerwiegenden und prognosebestimmenden Komplikationen der Leberresektion und Leberteiltransplantation gehört das small for size Syndrom. Die hier vorliegende Forschungsarbeit soll zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Signalkaskaden, des noch nicht vollständig verstandenen small for size Syndrom beitragen und mögliche Therapieansätze aufzeigen. Die etablierten Mechanismen der Pathophysiologie umfassen das Parenchymvolumen, die portalvenöse Hyperperfusion und Pfortaderdruckerhöhung, die arterielle Pufferantwort mit konsekutiver arterieller Hypoperfusion, molekulargenetische Überexpression von Endothelin-1 und Stickstoffmonoxidmangel mit sinusoidaler Mikrozirkulationsstörung und Nekrose und Apoptose, sowie die Immunantwort und Schädigung der intestinalen Mukosa. Die ungestörte Mikrozirkulation ist entscheidend für die Regeneration des Leberparenchyms. Früh nach Einsetzen der Reperfusion kommt es zur Zytokinaktivierung und Aktivierung von Inflammationsmediatoren wie IL-6, IL-15 und TNF alpha, die über Adhäsionsmolekül Aktivierung zur Migration von Neutrophilen und Endothelzellen führen. Für die eigentliche Entstehung des SFSS ist weiterhin essentiell, dass über das Überangebot von Sauerstoff während der Reperusionsphase, reaktive Sauerstoffspezies entstehen. ROS aggravieren den Schaden, da sie eine mitochondriale Dysfunktion verursachen und das Mikrogefäßsystem weiter stören. Die in späteren Phasen des Reperfusionsschadens wirkenden Neutrophilen vermitteln Entzündungsreaktionen,

ebenso auch Kupffer-Zellen, dendritische Zellen, Lympho- und Monozyten, die weiter proinflammatorische Zytokine ausschütten und darüber Zelltod vermitteln.

Die Untersuchung der Fragestellung erfolgt mit einer 75%-igen Leberresektion von C57BL/6-Mäusen unter peritoneal applizierter Narkose. Für den Hyperperfusionsschaden wurden Intervalle zwischen 90 und 240 Minuten gewählt, die bekannterweise zur Initiierung hepatotoxischer Prozesse führen. Eine medikamentöse Intervention mit dem Ziel einer therapeutischen Unterbindung der Zelltod auslösenden Signalkaskaden wird mit Baicalein und Tacrolimus sowie der Kombination beider Medikamente mit 90-minütiger Hyperperfusion erprobt. TUNEL-Assay Analysen geben Aufschluss über den Zelltodanteil im Leberparenchym. Die weitere Analyse, vermuteter relevanter pathophysiologischer Signalkaskaden des Zelltods, erfolgt mit Hilfe der Untersuchung der proapoptotischen Enzyme JNK, ERK, C3 und PARP via Western Blot. Die Ergebnisse werden durch eine deskriptive Statistik und Varianzanalyse erhoben.

Die Experimente zeigen, dass mit der Dauer des Hyperperfusionsschaden der Zelltodanteil in Form von Apoptose am Gesamtgewebe bis 120 Minuten Reperfusion linear ansteigt und dann abfällt. Analog zum Anstieg des Apoptoseanteils im Gesamtgewebe bis 120 Minuten Hyperperfusion, erfasst die Western-Blot Analyse einen Anstieg der proapoptotischen Enzyme JNK, C3 und ERK mit Abfall der Enzymaktivität und des Apoptoseanteils im TUNEL-Assay bei 240 Minuten Hyperperfusion. PARP hingegen steigt in der Aktivität kontinuierlich an und erreicht bei 240 Minuten das höchste Aktivitätsniveau. Für alle Hyperperfusiongruppen zeigt sich eine statistisch signifikante Reduktion des Zelltodanteils am Gesamtgewebe nach medikamentöser Intervention, für Tacrolimus ist der Effekt am ausgeprägtesten. Die Kombination der Medikamente erzielt keine weitere Abschwächung der Apoptoserate. Der Effekt der Medikation auf die proapoptotischen Enzyme ergibt eine signifikante Reduktion für Caspase 3, JNK und ERK. Die stärkste Reduktion wird durch die alleinige Applikation von DMSO erzielt. Für PARP zeigt die Behandlung mit DMSO und

Tacrolimus einen Enzymanstieg, in der kombinierten Medikationsgruppe und Baicalein-Gruppe bleibt das Enzymlevel auf Scheingruppen Niveau.

Die Experimente bestätigen die Erwartung, dass mit Anstieg der Reperfusiondauer auch der Hyperperfusionsschaden zunimmt und Zellzerfall linear ansteigt. Der lineare Anstieg der Apoptoserate im TUNEL-Assay deckt sich mit dem Anstieg der proapoptotischen Enzyme. Für die Interventionsgruppe mit 240 Minuten Hyperperfusionsschaden lässt der Abfall der proapoptotischen Enzyme und der Apoptoserate vermuten, dass Signalkaskaden der Zellregeneration initiiert wurden.

Die Effekte der medikamentösen Behandlung mit signifikanter Abnahme der Apoptose im Lebergewebe und Reduktion der Enzyme der pathophysiologischen Signalkaskaden unterstreichen die Schlüsselrolle von Inflammation, Apoptose und Ferroptose für die Entstehung des small for size Syndrom. Insbesondere die inhibierende Wirkung von Tacrolimus auf den Zelltod unterstreicht die Wichtigkeit der Inflammation in der Pathophysiologie des SFSS. Proinflammatorische Reize stehen am Anfang des Hyperperfusionsschadens und unterhalten diesen kontinuierlich. Tacrolimus besitzt die Eigenschaft an verschiedenen Schlüsselstellen der Inflammationskaskade über Inhibition von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Kupffer-Zellen und Immunzellen Zellregeneration und Überleben zu fördern. Die Behandlung mit Baicalein wirkt insbesondere über dessen antioxidative Qualität und Inhibition von Ferroptose. DMSOs anti-inflammatorische Wirkung und die dadurch verbesserte Mikrozirkulation verhindern bereits in der frühen Reperusionsphase das Einsetzen zellschädigender Signalkaskaden mit konsekutivem Zelltod. Mangelnde synergetische Effekte der Medikamente werden auf die erhöhte Hepatotoxizität zurückgeführt. Mit Blick auf die proapoptotischen Enzyme und den höchsten Anstieg von JNK bei 90 Minuten kann, in Zusammenschau mit den TUNEL-Analysen, festgestellt werden, dass die Inflammation und die damit verbundene Induktion reaktiver Sauerstoff-Spezies zur JNK vermittelten Apoptose führt und ihren Höhepunkt bei 90 Minuten Hyperperfusion hat.

Die durchgeführte Arbeit leistet einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathophysiologie des SFSS und weist mögliche medikamentöse Interventionsstrategien auf.

8. Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Jens Werner, Direktor der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Großhadern, meinen Dank dafür aussprechen, dass ich diese Arbeit als Doktorandin seiner Klinik absolvieren durfte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Markus Rentsch, heute Chefarzt und Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Klinikums Ingolstadt und zu Zeiten der Experimente Bereichsleiter der kolorektalen Chirurgie und Leiter des Darmkrebszentrum an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Prof. Dr.med. Markus Rentsch, hat mir während des Studiums in etlichen Famulaturen und im Praktischen Jahr umfängliche Einblick in die Viszeralchirurgie gewährt und mit seinem großen Wissen, seinem Geschick, der Freude an der Chirurgie und Haltung zur Arbeit ist er bis heute eine beispielelose Inspirationsquelle. Ausdrücklich danke ich ihm dafür, dass er mir das er auf die Fertigstellung der Dissertation kein Ablaufdatum geklebt hat.

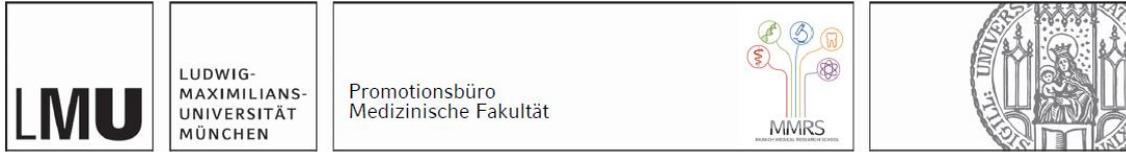
Meinem Betreuer Herrn Dr. med. Moritz Drefs, Facharzt für Allgemein- und Viszeralchirurgie bin ich zu Dank verpflichtet, für seine gewissenhafte und gründliche Anleitung sowie Einweisung in die Durchführung aller Experimente, die er mir mit beispielloser Präzision beibrachte und für die weitergehende Betreuung.

Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern der chirurgischen Forschung und nephrologischen Forschung danken, in deren Laboren die Experimente durchgeführt wurden und ohne deren Unterstützung die Versuchsdurchführung nicht annähernd so gut funktioniert hätte: hierzu zählen Anne Wagner, Christina Dengler und Simon Gahr.

Bei Kathrin Braese bedanke ich mich für den lehrreichen Austausch zur Statistik.

Paul Hafemann danke ich von ganzem Herzen für seine bedingungslose Unterstützung.

9. Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Falkenburger, Sophia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die Rolle der Perfusionsdauer auf den Hyperperfusionsschaden des small for size Syndrom und Erprobung medikamentöser Therapiestrategien mit genauerem Blick auf pathophysiologische Signalkaskaden des small for size Syndrom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Oldenburg, 30.06.2025

Ort, Datum

Sophia Falkenburger

Unterschrift Doktorandin

10. Akademischer Lebenslauf

05/2008	Abitur
08/2008 – 08/2009	Weltwärts Freiwilligendienst des Bundesministeriums für Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
09/2009 – 05/2016	Studium der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilian-Universität, München
08/2016	Approbation
12/2016 – 02/2022	Facharztausbildung Innere Medizin an der Universitätsklinik für Innere Medizin, Oldenburg
04/2022	Facharzt Innere Medizin
02/2022 – dato	Weiterbildung Kardiologie an der Universitätsklinik für Innere Medizin und Kardiologie, Oldenburg

11. Abkürzungsverzeichnis

12/15-LOX	12/15-Lipoxygenase
12S/ 15S-HpETE	12S/15S-Hydroperoxyeicosatetraensäure
3'-OH	3' Hydroxidion
ACI	Arteria carotis interna
ADCD	Autophagy dependent cell death, (Autophagie-abhängiger Zelltod)
AIF	Apoptosis inducing factors, (Apoptose induzierender Faktor)
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance, (Varianzanalyse)
AP-1	Aktivator Protein 1
AP-3	Aktivator Protein 3
Apaf-1	Apoptose Protease-aktivierender Faktor-1
Apo3L/DR3	Apolipoprotein L3/Death Receptor 3
Apo2L/ DR4	Apolipoprotein L2/Death Receptor 4
Apo2L/DR5	Apolipoprotein L2/Death Receptor 4
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure Assay
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
C 3	Caspase 3
Ca ²⁺	Calcium
CAD	Calcium abhängige Adhäsionsmoleküle
Cyt-C	Cytochrom C
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

DTT	Diethiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular-signal regulated kinases, (Extrazelluläre Signale regulierte Kinasen)
FADD	Fas-Associating Death Domain- Containing Protein, (Fas-assoziiertes Todesdomänen-enthaltendes Protein)
FasL/FasR	Fas-Ligand/Fas-Rezeptor
FLR	Future Liver Remnant, (zukünftiger Leberrest)
GAPDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GPX 4	Glutathionperoxidase
GRWR	Graft to recipient weight ratio, (Gewichtsverhältnis von Transplantat zu Empfängergewicht)
GSH	Glutathion
HABR	Hepatic arterial buffer response, (Hepatische arterielle Pufferantwort)
HI	Hyperperfusionsschaden
HO-1	Häm Oxygenase
HRP	Horseradish peroxidase
Hsp-70	Hitze schock Protein 70
HtrA2/Omi	HtrA serine peptidase 2, Homo sapiens
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
ICD	Immunogener Zelltod
IL 15	Interleukin 15
IL-1	Interleukin 1
IL-1-β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin 6
INF-γ	Interferon gamma

IRE1	Inosit requiring Enzym 1
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden
ISGLS	International Study Group on Liver Surgery
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinase
KC	Kupfferzellen
LAS	left anterior segment, (linkes anteriores Segment)
LDCD	lysosome-dependent cell death, (Lysosomen-abhängiger Zelltod)
LDLT	Living donor liver transplantation (Lebendonortransplantation)
LOX	Lipoxygenasen
LPS	left posterior segment, (linkes posteriores Segment)
MAP-Kinasen	Mitogen-activated protein kinases, (Mitogen aktivierte Proteinkinasen)
MnTBAP	Zellpermeables Mimetikum und Peroxynitrit-Fänger
MPT	Mitochondriale Permeabilitätstransition
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCCD	Nomenclature Committee on Cell Death
NF-AT	Nuklearfaktor aktivierter T-Zellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O ₂	Sauerstoff
OS	Omentale segment, (omentales Segment)
p53	Tumorsuppressor Protein 53

PAF	Platlet activating factor, (Thrombozyten aktivierender Faktor)
PARP	Poly-ADP-ribose Polymerase
PL•	Phospholipidradikals
PLOO•	Phospholipid-Peroxy-Radikal
PLOOHs	Phospholipid Hydroperoxiden
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	Right anterior segment, (Rechtes anteriores Segment)
RBP4	Retinol-bindendes Protein 4
RI	Reperfusionsschaden
RMS	Right middle segment, (Rechtes mittleres Segment)
ROS	Reactive oxygen species, (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPS	Right posterior segment, (Rechtes posteriores Segment)
SAPK	Stress-activated protein kinases, Stress aktivierte Proteinkinases)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SFSS	Small for size Syndrom, (small for size Syndrom)
SLPI	Sekretorischer Leukozyten-Protease-Inhibitor
Smac/DIABLO	Second mitochondria derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI
SOD	Superoxid-Dismutase
SOD	Superoxiddismutase
TdT	Tensid Natriumlarlylsulfat
TMMP	Transition of mitochondrial membrane permeability, (Transition der

	mitochondrialien Membranpermeabilität)
TNF alpha	Tumornekrosefaktor alpha
TRADD	Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein, (Tumornekrosefaktor Rezeptor Type 1 assoziiertes Todesdomänenprotein)
TRAF	Tumor Necrosis Receptor associated factor, (Tumornekroserezeptor assoziiierter Faktor)
TUNEL (TdT)	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase mediated dUTP nick end labeling
UPR	Unfolded protein response, (Entfaltete Proteinantwort)
VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
VCI	Vena cava inferior
ENA-78	Epithelial neutrophil activating protein 78, (Epithelneutrophiles aktivierendes Protein 78)
X/XOD	Xanthinoxidase

12. Literaturverzeichnis

1. Hepatologie: Erkrankungsinzidenz nimmt zu [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/198203/Hepatologie-Erkrankungsinzidenz-nimmt-zu>
2. Informationen zur Leberzirrhose, als häufigste Ursache der HE - Norgine Deutschland [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://www.norgine.de/informationen-zur-leberzirrhose-als-haeufigste-ursache-der-he/#:~:text=In%20Deutschland%20leiden%20rund%205.000,alkoholische%20und%20nicht%20alkoholische%20Fettleber>
3. „total zentral: die Leber!“. Volkskrankheit Fettleber – immer häufiger und meist unentdeckt - Deutsche Leberhilfe e.V. [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://www.leberhilfe.org/total-zentral-die-leber-volkskrankheit-fettleber-immer-haeufiger-und-meist-unentdeckt/>
4. Meirelles Júnior RF erreira, Salvalaggio P, Rezende MB runo de, Evangelista AS, Guardia BD ella, Matiolo CE duardo L, u. a. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. Einstein (Sao Paulo) [Internet]. 1. Januar 2015 [zitiert 17. Februar 2024];13(1):149–52. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25993082/>
5. Baum P, Diers J, Lichthardt S, Kastner C, Schlegel N, Germer CT, u. a. Originalarbeit Sterblichkeit und Komplikationen nach viszeralchirurgischen Operationen. Dtsch Arztebl Int. 1. November 2019;116(44):739–46.
6. Deutsche Stiftung Organtransplantation H. DSO Jahresbericht 2023. [zitiert 24. Mai 2024]; Verfügbar unter: www.dso.de
7. Overview of hepatic resection - UpToDate [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://www.uptodate.com.bfdproxy55.bfd-online.de/contents/overview-of-hepatic-resection?search=leberresektion&source=search_result&selectedTitle=1~145&usage_type=default&display_rank=1
8. Indikationen_LeberTX.png (PNG-Grafik, 960 × 540 Pixel) [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://dso.de/DSO-Infografiken/Indikationen_LeberTX.png
9. Ursachen für eine Lebertransplantation Vor der Transplantation Transplantation [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://lebertransplantation.eu/transplantation/vor-der-transplantation/ursachen-fuer-eine-lebertransplantation>
10. Clavien PA, Strasberg SM. Terminology of Liver Anatomy and Resections: The Brisbane 2000 Terminology. Atlas of Upper Gastrointestinal and Hepato-Pancreato-Biliary Surgery [Internet]. 2007 [zitiert 24. Mai 2024];313–7. Verfügbar unter: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-68866-2_36
11. Papamichail M, Pizantias M, Heaton ND. Minimizing the risk of small-for-size syndrome after liver surgery. Apr 1, 2022 S. 113–33.

12. Referenz Allgemein- und Viszeralchirurgie: Leber und Gallenwege. Referenz Allgemein- und Viszeralchirurgie: Leber und Gallenwege. 3. Mai 2022;
13. Reddy SK, Barbas AS, Turley RS, Steel JL, Tsung A, Marsh JW, u. a. A standard definition of major hepatectomy: resection of four or more liver segments. HPB (Oxford) [Internet]. 2011 [zitiert 11. Februar 2023];13(7):494. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC3133716/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21333716/)
14. Bahr R. Leberresektion bei benignen, malignen und parasitären Erkrankungen der Leber: Indikation und Risiko*. DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift [Internet]. 1984 [zitiert 9. Februar 2023];109(45):1730–5. Verfügbar unter: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2008-1069445>
15. Masuda Y, Yoshizawa K, Ohno Y, Mita A, Shimizu A, Soejima Y. Small-for-size syndrome in liver transplantation: Definition, pathophysiology and management [Internet]. Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International Elsevier (Singapore) Pte Ltd; Aug 1, 2020 S. 334–41. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32646775/>
16. Die Geschichte der Organ- und Gewebetransplantation [Internet]. [zitiert 28. Juni 2022]. Verfügbar unter: <https://www.organspende-info.de/zahlen-und-fakten/geschichte/>
17. Deutsche Stiftung Organtransplantation DSO Jahresbericht [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://dso.de/organspende/statistiken-berichte/jahresbericht>
18. Anteil_LeberTX_Lebendspende.png (PNG-Grafik, 960 x 540 Pixel) [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://dso.de/DSO-Infografiken/Anteil_LeberTX_Lebendspende.png
19. Eurotransplant - Statistics [Internet]. [zitiert 9. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://statistics.eurotransplant.org/index.php?search_type=overview&search_text=9023
20. Dahm F, Georgiev P, Clavien PA. Small-for-size syndrome after partial liver transplantation: Definition, mechanisms of disease and clinical implications. American Journal of Transplantation. November 2005;5(11):2605–10.
21. Strobel O, Büchler MW. High mortality after liver resections in Germany. Chirurg [Internet]. 1. Januar 2020 [zitiert 9. Februar 2023];91(1):78. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00104-019-01069-7>
22. Riddiough GE, Christophi C, Jones RM, Muralidharan V, Perini M v. A systematic review of small for size syndrome after major hepatectomy and liver transplantation. HPB Apr 1, 2020 S. 487–96.
23. Asencio JM, Vaquero J, Olmedilla L, García Sabrido JL. „ Small-for-flow“ syndrome: Shifting the „ size“ paradigm. Med Hypotheses. Mai 2013;80(5):573–7.

24. Hibi T, Kitagawa Y. Small-for-size syndrome in LT. *Clin Liver Dis (Hoboken)* [Internet]. Oktober 2017 [zitiert 13. Juli 2018];10(4):93–6. Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/10.1002/cld.666>
25. Glanemann M, Eipel C, Nussler AK, Vollmar B, Neuhaus P. Hyperperfusion syndrome in small-for-size livers. *Eur Surg Res* [Internet]. November 2005 [zitiert 10. Februar 2024];37(6):335–41. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16465057/>
26. Rajakumar A, Kaliamoorthy I, Rela M, Mandell MS. Small-for-Size Syndrome: Bridging the Gap between Liver Transplantation and Graft Recovery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* [Internet]. 1. September 2017 [zitiert 1. Juli 2022];21(3):252–61. Verfügbar unter: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1089253217699888>
27. Rajekar H. Small-for-size syndrome in adult liver transplantation: A review. *Indian Journal of Transplantation* [Internet]. 1. April 2013 [zitiert 13. Juli 2018];7(2):53–8. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212001713000452>
28. Emond JC, Renz JF, Ferrell LD, Rosenthal P, Lim RC, Roberts JP, u. a. 544-554 C). Bd. 224, *ANNALS OF SURGERY*. Lippincott-Raven Publishers; 1996.
29. Famularo S, Nefotyou K, Fotiadis N, Khan N, Foxton M, Khan AZ. Small-for-Size Liver Syndrome: a Case Series with a Proposal for Management Based on Portal Flow Modulation. *J Gastrointest Cancer* [Internet]. 18. Juni 2015 [zitiert 13. Juli 2018];46(2):185–9. Verfügbar unter: <http://link.springer.com/10.1007/s12029-015-9701-8>
30. Makuuchi M. Living donor liver transplantation: looking back at my 30 years of experience. *Surg Today*. 1234;49:288–94.
31. Ikegami T, Kim JM, Jung DH, Soejima Y, Kim DS, Joh JW, u. a. Conceptual changes in small-for-size graft and small-for-size syndrome in living donor liver transplantation. Bd. 33, *Korean Journal of Transplantation*. Korean Society for Transplantation; 2019. S. 65–73.
32. Taniguchi M, Shimamura T, Todo S, Furukawa H. Small-for-size syndrome in living-donor liver transplantation using a left lobe graft. *Surg Today* [Internet]. 1. Juni 2015 [zitiert 13. Februar 2023];45(6):663–71. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24894564/>
33. Hill MJ, Hughes M, Jie T, Cohen M, Lake J, Payne WD, u. a. Graft weight/recipient weight ratio: how well does it predict outcome after partial liver transplants? *Liver Transpl*. 2009;15(9):1056–62.
34. Soejima Y, Shimada M, Suehiro T, Hiroshige S, Ninomiya M, Shiotani S, u. a. Outcome analysis in adult-to-adult living donor liver transplantation using the left lobe. *Liver Transpl*. 1. Juni 2003;9(6):581–6.
35. Kiuchi T, Tanaka K, Ito T, Oike F, Ogura Y, Fujimoto Y, u. a. Small-for-size graft in living donor liver transplantation: how far should we go? *Liver Transpl*. 1. September 2003;9(9).

36. Eipel C, Abshagen K, Vollmar B. „Small-for-size“. *Der Chirurg*. 2012;83(3):238–46.
37. Kawasaki S, Makuuchi M, Matsunami H, Hashikura Y, Ikegami T, Nakazawa Y, u. a. Living related liver transplantation in adults. *Ann Surg*. 1998;227(2):269–74.
38. Hashikura Y, Makuuchi M, Kawasaki S, Matsunami H, Ikegami T, Nakazawa Y, u. a. Successful living-related partial liver transplantation to an adult patient. *Lancet*. 14. Mai 1994;343(8907):1233–4.
39. Yu HC, You H, Lee H, Jin ZW, Moon J II, Cho BH. Estimation of standard liver volume for liver transplantation in the Korean population. *Liver Transplantation*. Juni 2004;10(6):779–83.
40. Yoshizumi T, Taketomi A, Kayashima H, Yonemura Y, Harada N, Ijichi H, u. a. Estimation of Standard Liver Volume for Japanese Adults. *Transplant Proc*. Juni 2008;40(5):1456–60.
41. Pan N, Lv X, Liang R, Wang L, Liu Q. Suppression of graft regeneration, not ischemia/reperfusion injury, is the primary cause of small-for-size syndrome after partial liver transplantation in mice. *PLoS One*. 2014;9(4).
42. Ikegami T, Kim JM, Jung DH, Soejima Y, Kim DS, Joh JW, u. a. Conceptual changes in small-for-size graft and small-for-size syndrome in living donor liver transplantation. Bd. 33, *Korean Journal of Transplantation*. Korean Society for Transplantation; 2019. S. 65–73.
43. Hwang S, Lee SG, Lee YJ, Sung KB, Park KM, Kim KH, u. a. Lessons learned from 1,000 living donor liver transplantations in a single center: how to make living donations safe. *Liver Transpl*. Juni 2006;12(6):920–7.
44. Suh KS, Suh SW, Lee JM, Choi YR, Yi NJ, Lee KW. Recent advancements in and views on the donor operation in living donor liver transplantation: a single-center study of 886 patients over 13 years. *Liver Transpl*. 1. März 2015;21(3):329–38.
45. Botha JF, Langnas AN, Daniel Campos B, Grant WJ, Freise CE, Ascher NL, u. a. Left lobe adult-to-adult living donor liver transplantation: small grafts and hemiportocaval shunts in the prevention of small-for-size syndrome. *Liver Transpl [Internet]*. Mai 2010 [zitiert 30. Juni 2022];16(5):649–57. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20440774/>
46. Moller JE, Hillis GS, Oh JK, Seward JB, Reeder GS, Wright RS, u. a. Left atrial volume: a powerful predictor of survival after acute myocardial infarction. *Circulation*. Mai 2003;107(17):2207–12.
47. Yadav K, Shrikhande S, Goel M. Post Hepatectomy Liver Failure: Concept of Management. *J Gastrointest Cancer*. 26. November 2014;45(4):405–13.
48. Kaido T, Mori A, Ogura Y, Hata K, Yoshizawa A, Iida T, u. a. Lower limit of the graft-to-recipient weight ratio can be safely reduced to 0.6% in adult-to-adult living donor liver transplantation in combination with portal pressure control. *Transplant Proc*. 1. Juli 2011;43(6):2391–3.

49. Soin AS, Chaudhary RJ, Pahari H, Pomfret EA. A Worldwide Survey of Live Liver Donor Selection Policies at 24 Centers with a Combined Experience of 19 009 Adult Living Donor Liver Transplants. *Transplantation*. 1. Februar 2019;103(2):E39–47.
50. Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, u. a. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation*. 27. Januar 1999;67(2):321–7.
51. Xie P, Quan L, Xie S, Chen B, Wei K, Ren J, u. a. Quantitative study of liver hemodynamic changes in rats with small-for-size syndrome by the 4D-CT perfusion technique. *British Journal of Radiology*. 2019;92(1098).
52. Man K, Lo CM, Ng IOL, Wong YC, Qin LF, Fan ST, u. a. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes. *Arch Surg [Internet]*. 2001 [zitiert 12. Februar 2023];136(3):280–5. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11231846/>
53. Pathophysiologic Observations and Histopathologic Recognitio... : The American Journal of Surgical Pathology [Internet]. [zitiert 13. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://journals.lww.com/ajsp/Abstract/2006/08000/Pathophysiologic_Observations_and_Histopathologic.9.aspx
54. Fondevila C, Hessheimer AJ, Taurá P, Sánchez O, Calatayud D, De Riva N, u. a. Portal hyperperfusion: mechanism of injury and stimulus for regeneration in porcine small-for-size transplantation. *Liver Transpl [Internet]*. März 2010 [zitiert 9. Februar 2024];16(3):364–74. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20209596/>
55. Man K, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Fung PCW, Liang TB, u. a. Graft Injury in Relation to Graft Size in Right Lobe Live Donor Liver Transplantation: A Study of Hepatic Sinusoidal Injury in Correlation With Portal Hemodynamics and Intra-graft Gene Expression. *Ann Surg [Internet]*. Februar 2003 [zitiert 12. Februar 2023];237(2):256. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC1522144/>
56. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*. 1. Februar 2001;181(2):160–6.
57. Fondevila C, Hessheimer AJ, Taurá P, Sánchez O, Calatayud D, de Riva N, u. a. Portal hyperperfusion: Mechanism of injury and stimulus for regeneration in porcine small-for-size transplantation. *Liver Transplantation*. März 2010;16(3):364–74.
58. Rajakumar A, Kaliamoorthy I, Rela M, Mandell MS. Small-for-Size Syndrome: Bridging the Gap Between Liver Transplantation and Graft Recovery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth [Internet]*. 23. September 2017 [zitiert 13. Juli 2018];21(3):252–61. Verfügbar unter: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1089253217699888>
59. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury - PubMed [Internet]. [zitiert 12. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10431706/>
60. Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, u. a. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med [Internet]*. 2001 [zitiert 12. Februar 2023];7(6):693–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11385506/>

61. Schwartz SM. A protective player in the vascular response to injury. *Nat Med* [Internet]. 2001 [zitiert 12. Februar 2023];7(6):656–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11385495/>
62. Sawada T, Inoue K, Tanabe D, Kawamoto S, Tsuji T, Tashiro S. Experimental Studies on Protective Effects of FK506 Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *J Med Invest* [Internet]. 2016 [zitiert 12. Juli 2018];63(3–4):262–9. Verfügbar unter: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/63/3.4/63_262/_article
63. Zhong Z, Connor HD, Froh M, Bunzendahl H, Lind H, Lehnert M, u. a. Free Radical-Dependent Dysfunction of Small-for-Size Rat Liver Grafts: Prevention by Plant Polyphenols. *Gastroenterology*. 2005;129(2):652–64.
64. Drefs M, Thomas MN, Guba M, Angele MK, Werner J, Conrad M, u. a. Modulation of Glutathione Hemostasis by Inhibition of 12/15-Lipoxygenase Prevents ROS-Mediated Cell Death after Hepatic Ischemia and Reperfusion. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2017 [zitiert 7. Februar 2023];2017. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28811867/>
65. Li J, Cao F, Yin H liang, Huang Z jian, Lin Z tao, Mao N, u. a. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* [Internet]. 1. Februar 2020 [zitiert 25. Februar 2023];11(2). Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC6997353/>
66. Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology, and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 1. April 2021 [zitiert 25. Februar 2023];22(4):266. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC8142022/>
67. Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med*. 20. Mai 2020;152:175–85.
68. Hirschhorn T, Stockwell BR. The development of the concept of ferroptosis. *Free Radic Biol Med*. 1. März 2019;133:130–43.
69. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, u. a. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem* [Internet]. 1. Mai 2018 [zitiert 28. Februar 2023];46(4):1650–67. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29694958/>
70. Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA. Rodent models of hepatic ischemia–reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms. *Journal of Surgical Research*. 1. Oktober 2014;191(2):399–412.
71. Nakazato PCG, Victorino JP, Fina CF, Mendes KDS, Gomes MCJ, Evora PRB, u. a. Liver ischemia and reperfusion injury. Pathophysiology and new horizons in preconditioning and therapy. *Acta Cir Bras* [Internet]. 1. August 2018 [zitiert 8. Februar 2024];33(8):723–35. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30208134/>
72. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull* [Internet]. 1. Januar 2004 [zitiert 9. Februar 2024];70(1):71–86. Verfügbar unter: <https://dx.doi.org/10.1093/bmb/ldh025>

73. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* [Internet]. 1. Oktober 2003 [zitiert 17. Februar 2023];125(4):1246–57. Verfügbar unter: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016508503012095/fulltext>
74. Yu B, Zhang Y, Wang T, Guo J, Kong C, Chen Z, u. a. MAPK Signaling Pathways in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *J Inflamm Res.* 2023;16:1405–18.
75. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 1. August 2003 [zitiert 9. Februar 2024];18(8):891–902. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1440-1746.2003.03056.x>
76. Lauth WW, Legare DJ, D’Almeida MS. Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). *Am J Physiol* [Internet]. 1985 [zitiert 13. Februar 2023];248(3 Pt 2). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2579585/>
77. Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Kondi A, Gamaletsos E, Theodoraki K, Kehagias D, u. a. Hemodynamic interaction between portal vein and hepatic artery flow in small-for-size split liver transplantation. *Transplant International* [Internet]. 1. Juli 2002 [zitiert 12. Februar 2023];15(7):355–60. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-2277.2002.tb00178.x>
78. Kelly DM, Demetris AJ, Fung JJ, Marcos A, Zhu Y, Subbotin V, u. a. Porcine partial liver transplantation: A novel model of the “small-for-size” liver graft. *Liver Transplantation* [Internet]. 1. Februar 2004 [zitiert 12. Februar 2023];10(2):253–63. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lt.20073>
79. Yang ZF, Poon RT, Luo Y, Cheung CK, Ho DW, Lo CM, u. a. Up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in small-for-size liver grafts enhances macrophage activities through VEGF receptor 2-dependent pathway. *J Immunol* [Internet]. 15. August 2004 [zitiert 13. Februar 2023];173(4):2507–15. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15294966/>
80. Yang ZF, Ho DWY, Chu ACY, Wang YQ, Fan ST. Linking inflammation to acute rejection in small-for-size liver allografts: the potential role of early macrophage activation. *Am J Transplant* [Internet]. Februar 2004 [zitiert 13. Februar 2023];4(2):196–209. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14974940/>
81. The association between enteric bacterial overgrowth and gastrointestinal motility after subtotal liver resection or portal vein obstruction in rats - PubMed [Internet]. [zitiert 13. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7516192/>
82. Kasravi FB, Wang L, Wang XD, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatology.* Januar 1996;23(1):97–103.
83. Xiao L, Li F, Wei B, Li B, Tang CW. Small-for-size syndrome after living donor liver transplantation: Successful treatment with a transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Liver Transplantation* [Internet]. 1. September 2012 [zitiert 23. Juni

- 2022];18(9):1118–20. Verfügbar unter:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lt.23457>
84. Hessheimer AJ, Fondevila C, Taurá P, Muñoz J, Sánchez O, Fuster J, u. a. Decompression of the portal bed and twice-baseline portal inflow are necessary for the functional recovery of a small-for-size graft. *Ann Surg.* Juni 2011;253(6):1201–10.
 85. Ikegami T, Onda S, Furukawa K, Haruki K, Shirai Y, Gocho T. Small-for-size graft, small-for-size syndrome and inflow modulation in living donor liver transplantation. Bd. 27, *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences.* Blackwell Publishing Asia; 2020. S. 799–809.
 86. Oura T, Taniguchi M, Shimamura T, Suzuki T, Yamashita K, Uno M, u. a. Does the permanent portacaval shunt for a small-for-size graft in a living donor liver transplantation do more harm than good? *American Journal of Transplantation* [Internet]. 1. Januar 2008 [zitiert 13. Februar 2023];8(1):250–2. Verfügbar unter: <http://www.amjtransplant.org/article/S1600613522056787/fulltext>
 87. Ito K, Akamatsu N, Ichida A, Ito D, Kaneko J, Arita J, u. a. Splenectomy is not indicated in living donor liver transplantation. *Liver Transplantation.* 1. November 2016;22(11):1526–35.
 88. Bogetti D, Panaro F, Jarzembowski T, Sankary H, Benedetti E, Testa G. Hepatic venous outflow reconstruction in adult living donor liver transplants without portal hypertension. *Clin Transplant* [Internet]. 1. April 2004 [zitiert 13. Februar 2023];18(2):222–6. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1399-0012.2003.00146.x>
 89. Hernandez-Alejandro R, Sharma H. Small-for-size syndrome in liver transplantation: New horizons to cover with a good launchpad. *Liver Transplantation* [Internet]. 1. November 2016 [zitiert 23. Juni 2022];22(S1):33–6. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lt.24513>
 90. Feng Y, Han Z, Gu B, Li X, Wang B, Guo F, u. a. A Novel Method for the Prevention and Treatment of Small-for-Size Syndrome in Liver Transplantation. *Dig Dis Sci* [Internet]. 1. September 2020;65(9):2619–29. Verfügbar unter: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10620-020-06055-2>
 91. Miller CM, Quintini C, Dhawan A, Durand F, Heimbach JK, Kim-Schluger HL, u. a. The international liver transplantation society living donor liver transplant recipient guideline. *Transplantation.* 2017;101(5):938–44.
 92. Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J. Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 [zitiert 11. Februar 2023];2015. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25861623/>
 93. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery* [Internet]. Mai 1994 [zitiert 26. Juni 2018];81(5):637–47. Verfügbar unter: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.1800810504>

94. Kim Y il. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* [Internet]. 2003 [zitiert 11. Februar 2023];10(3):195–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14605975/>
95. Yue J, López JM. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1. April 2020 [zitiert 18. Februar 2023];21(7). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32231094/>
96. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
97. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep* [Internet]. 18. Januar 2019 [zitiert 15. Februar 2023];39(1). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30530866/>
98. vande Walle L, Lamkanfi M, Vandenameele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: An overview. *Cell Death Differ.* März 2008;15(3):453–60.
99. Saelens X, Festjens N, vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenameele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 12. April 2004;23(16 REV. ISS. 2):2861–74.
100. van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenameele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: A Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* 2002;9(10):1031–42.
101. Hill MM, Adrain C, Martin SJ. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv.* 2003;3(1):19–26.
102. Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: Apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene.* 19. April 2001;20(17):2122–33.
103. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* (1979). 28. August 1998;281(5381):1305–8.
104. Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, u. a. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry.* 19. Dezember 1997;272(51):32401–10.
105. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 9. März 2001 [zitiert 18. Februar 2023];276(10):7320–6. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11058599/>
106. TECHNOLOGY CS. Regulation of Apoptosis Overview. *Cell.* 2014;2014.
107. Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and Necrosis in the Liver. *Compr Physiol* [Internet]. 2013 [zitiert 18. Februar 2023];3(2):977–1010. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC3867948/>

108. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* [Internet]. 1995 [zitiert 18. Februar 2023];146(1):3. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC1870771/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/146/1/3/)
109. Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Fleischer B, Galle PR. The role of apoptosis versus oncotic necrosis in liver injury: Facts or faith? [zitiert 28. Februar 2023]; Verfügbar unter: www.elsevier.com/locate/jhep
110. Dannappel M, Vlantis K, Kumari S, Polykratis A, Kim C, Wachsmuth L, u. a. RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis. *Nature* [Internet]. 2014 [zitiert 18. Februar 2023];513(7516):90–4. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25132550/>
111. Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl* [Internet]. September 2010 [zitiert 28. Februar 2023];16(9):1016–32. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20818739/>
112. Labbé K, Saleh M. Pyroptosis: A Caspase-1-Dependent Programmed Cell Death and a Barrier to Infection. *The Inflammasomes* [Internet]. 2011 [zitiert 18. Februar 2023];17–36. Verfügbar unter: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-0348-0148-5_2
113. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, u. a. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 25. Mai 2012;149(5):1060–72.
114. Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, Fridman DJ, u. a. RAS–RAF–MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* [Internet]. 6. Juni 2007 [zitiert 25. Februar 2023];447(7146):864. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC3047570/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18355723/)
115. Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol* [Internet]. 21. März 2008 [zitiert 25. Februar 2023];15(3):234–45. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18355723/>
116. Conrad M, Pratt DA. The chemical basis of ferroptosis. *Nature Chemical Biology* 2019 15:12 [Internet]. 18. November 2019 [zitiert 25. Februar 2023];15(12):1137–47. Verfügbar unter: <https://www.nature.com/articles/s41589-019-0408-1>
117. Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* [Internet]. 1. April 1995 [zitiert 25. Februar 2023];30(4):277–90. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1007/BF02536034>
118. Kuhn H, Banthiya S, van Leyen K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2015 [zitiert 25. Februar 2023];1851(4):308. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC4370320/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25132550/)
119. Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* [Internet]. 1. Januar 1995 [zitiert 25. Februar 2023];251(C):3–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7651209/>

120. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 23. August 2016 [zitiert 25. Februar 2023];113(34):E4966–75. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27506793/>
121. Friedmann Angeli JP, Krysko D v., Conrad M. Ferroptosis at the crossroads of cancer-acquired drug resistance and immune evasion. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 1. Juli 2019 [zitiert 25. Februar 2023];19(7):405–14. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31101865/>
122. Proneth B, Conrad M. Ferroptosis and necroinflammation, a yet poorly explored link. *Cell Death Differ* [Internet]. 1. Januar 2019 [zitiert 25. Februar 2023];26(1):14–24. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30082768/>
123. van Leyen K, Kim HY, Lee SR, Jin G, Arai K, Lo EH. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke*. 2006;37(12):3014–8.
124. Fang X, Wang H, Han D, Xie E, Yang X, Wei J, u. a. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 12. Februar 2019 [zitiert 26. Februar 2023];116(7):2672–80. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC6377499/>
125. Chu B, Kon N, Chen D, Li T, Liu T, Jiang L, u. a. ALOX12 is required for p53-mediated tumor suppression through a distinct ferroptosis pathway. *Nat Cell Biol* [Internet]. 1. Mai 2019 [zitiert 25. Februar 2023];21(5):579. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC6624840/>
126. Singh NK, Rao GN. Emerging role of 12/15-Lipoxygenase (ALOX15) in human pathologies. *Prog Lipid Res* [Internet]. 1. Januar 2019 [zitiert 26. Februar 2023];73:28. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC6338518/>
127. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, u. a. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab* [Internet]. 3. September 2008 [zitiert 26. Februar 2023];8(3):237–48. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18762024/>
128. Pallast S, Arai K, Wang X, Lo EH, van Leyen K. 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *J Neurochem* [Internet]. November 2009 [zitiert 26. Februar 2023];111(3):882–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19737346/>
129. Conrad DJ. The arachidonate 12/15 lipoxygenases. A review of tissue expression and biologic function. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 1999 [zitiert 26. Februar 2023];17(1–2):71–89. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10436860/>
130. Jin G, Arai K, Murata Y, Wang S, Stins MF, Lo EH, u. a. Protecting Against Cerebrovascular Injury: Contributions of 12/15-Lipoxygenase to Edema Formation After Transient Focal Ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* [Internet]. 1. September 2008 [zitiert 25. Februar 2023];39(9):2538. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC2754072/>

131. Vandenabeele P, Galluzzi L, vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Oktober 2010 [zitiert 26. Februar 2023];11(10):700–14. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20823910/>
132. Rodríguez-Lara SQ, Cardona-Munõz EG, Ramírez-Lizardo EJ, Totsuka-Sutto SE, Castillo-Romero A, Garcíá-Cobián TA, u. a. Alternative Interventions to Prevent Oxidative Damage following Ischemia/Reperfusion. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2016 [zitiert 26. Februar 2023];2016. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC5225393/>
133. Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the Mitochondrial Permeability Transition in Apoptotic and Necrotic Death After Ischemia / Reperfusion Injury to Hepatocytes. *Curr Mol Med*. 25. März 2005;3(6):527–35.
134. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, u. a. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 1. März 2018;25(3):486–541.
135. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* [Internet]. 25. Juni 2019 [zitiert 18. Februar 2023];43(6):582–92. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbin.11137>
136. Hammond JS, Guha IN, Beckingham IJ, Lobo DN. Prediction, prevention and management of postresection liver failure. *Br J Surg* [Internet]. September 2011 [zitiert 10. Februar 2024];98(9):1188–200. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21725970/>
137. Suppression of Graft Regeneration, Not Ischemia/Reperfusion Injury, Is the Primary Cause of Small-for-Size Syndrome after Partial Liver Transplantation in Mice - PMC [Internet]. [zitiert 9. Februar 2024]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3977924/>
138. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic knockout models. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [Internet]. 3. März 2013 [zitiert 9. Februar 2024];19(11):1683. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC3607745/>
139. Karatzas T, Neri AA, Baibaki ME, Dontas IA. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: Time and percentage-related pathophysiological mechanisms. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2014;191(2):399–412. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2014.06.024>
140. Manning MW, Kumar PA, Maheshwari K, Arora H. Post-Reperfusion Syndrome in Liver Transplantation-An Overview. 2020 [zitiert 8. Februar 2024]; Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2019.02.050>
141. Moore HB, Yaffe H, Pomposelli JJ, Wachs M, Bak T, Kennealey P, u. a. Detection of early allograft dysfunction at 30 min of reperfusion in liver transplantation: An intraoperative diagnostic tool with real time assessment of graft function. *Am J Surg* [Internet]. 1. Dezember 2020 [zitiert 8. Februar 2024];220(6):1518–25. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32907708/>

142. Eshkenazy R, Dreznik Y, Lahat E, Zakai BB, Zendel A, Ariche A. Small for size liver remnant following resection: prevention and management. *Hepatobiliary Surg Nutr* [Internet]. Oktober 2014 [zitiert 8. Februar 2024];3(5):303–12. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25392842/>
143. Kelly DM, Demetris AJ, Fung JJ, Marcos A, Zhu Y, Subbotin V, u. a. Porcine partial liver transplantation: A novel model of the “small-for-size” liver graft. *Liver Transplantation* [Internet]. 1. Februar 2004 [zitiert 12. Februar 2023];10(2):253–63. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/lt.20073>
144. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic knockout models. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [Internet]. 3. März 2013 [zitiert 28. Februar 2023];19(11):1683. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC3607745/>
145. *Phytochemistry Research Progress* - Google Books [Internet]. [zitiert 22. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://books.google.de/books?id=l5Mo0M5CqQcC&q=%22Baicalein%22+and+%22thymus+vulgaris%22&pg=PA42&redir_esc=y#v=snippet&q=%22Baicalein%22%20and%20%22thymus%20vulgaris%22&f=false
146. Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T, u. a. Remarkable Synergies between Baicalein and Tetracycline, and Baicalein and β -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol* [Internet]. 1. April 2005 [zitiert 22. Februar 2023];49(4):391–6. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1348-0421.2005.tb03732.x>
147. Taira Z, Yabe K, Hamaguchi Y, Hirayama K, Kishimoto M, Ishida S, u. a. Effects of Sho-saiko-to extract and its components, Baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Food and Chemical Toxicology* [Internet]. Mai 2004 [zitiert 5. Februar 2024];42(5):803–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15046826/>
148. Lai CC, Huang PH, Yang AH, Chiang SC, Tang CY, Tseng KW, u. a. Baicalein Reduces Liver Injury Induced by Myocardial Ischemia and Reperfusion. <https://doi.org/10.1142/S0192415X16500294>. 10. Mai 2016;44(3):531–50.
149. Song L, Yang H, Wang HX, Tian C, Liu Y, Zeng XJ, u. a. Inhibition of 12/15 lipoxygenase by baicalein reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via modulation of multiple signaling pathways. *Apoptosis* [Internet]. 2014 [zitiert 22. Februar 2023];19(4):567–80. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24248985/>
150. Lee JH, Lee SR. The Effect of Baicalein on Hippocampal Neuronal Damage and Metalloproteinase Activity Following Transient Global Cerebral Ischaemia. *Phytotherapy Research* [Internet]. 1. November 2012 [zitiert 22. Februar 2023];26(11):1614–9. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.4644>
151. Liu A, Huang L, Fan H, Fang H, Yang Y, Liu S, u. a. Baicalein pretreatment protects against liver ischemia/reperfusion injury via inhibition of NF- κ B pathway in mice. 2014

- [zitiert 22. Februar 2023]; Verfügbar unter:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2014.11.014>
152. Inhibition of cancer cell proliferation and prostaglandin E2 synthesis by *Scutellaria baicalensis* - PubMed [Internet]. [zitiert 22. Februar 2023]. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12874003/>
 153. Kimura Y, Yokoi K, Matsushita N, Okuda H. Effects of Flavonoids Isolated from *Scutellariae Radix* on the Production of Tissue-type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor-1 Induced by Thrombin and Thrombin Receptor Agonist Peptide in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [Internet]. 12. April 2011 [zitiert 22. Februar 2023];49(8):816–22. Verfügbar unter:
<https://academic.oup.com/jpp/article/49/8/816/6152961>
 154. Chen M, Xiao H, Chen B, Bian Z, Kwan HY. The advantages of using *Scutellaria baicalensis* and its flavonoids for the management of non-viral hepatocellular carcinoma. *J Funct Foods*. 1. März 2021;78:104389.
 155. Liu B, Jian Z, Li Q, Li K, Wang Z, Liu L, u. a. Baicalein protects Human melanocytes from H₂O₂-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway. 2012 [zitiert 22. Februar 2023]; Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.015>
 156. Shen YC, Chiou WF, Chou YC, Chen CF. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. [zitiert 22. Februar 2023]; Verfügbar unter: www.elsevier.com/locate/ejphar
 157. Huang HL, Wang YJ, Zhang QY, Liu B, Wang FY, Li JJ, u. a. Hepatoprotective effects of baicalein against CCl₄-induced acute liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [Internet]. 12. Dezember 2012 [zitiert 22. Februar 2023];18(45):6605. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC3516202/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516202/)
 158. Wu YL, Lian LH, Wan Y, Nan JX. Baicalein inhibits nuclear factor-κB and apoptosis via c-FLIP and MAPK in D-GalN/LPS induced acute liver failure in murine models. *Chem Biol Interact* [Internet]. 5. Dezember 2010 [zitiert 22. Februar 2023];188(3):526–34. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20850421/>
 159. Li J, Wang H, Shi X, Zhao L, Lv T, Yuan Q, u. a. Anti-proliferative and anti-migratory effects of *Scutellaria strigillosa* Hemsley extracts against vascular smooth muscle cells. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 10. Mai 2019 [zitiert 9. Juni 2024];235:155–63. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30763696/>
 160. Ku SK, Lee HG, Bae JS. Inhibitory effect of baicalin, baicalein and wogonin on secretory group IIA phospholipase A2. *Arch Pharm Res* [Internet]. 1. Oktober 2015 [zitiert 9. Juni 2024];38(10):1865–72. Verfügbar unter:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25564337/>
 161. Zong J, Zhang DP, Zhou H, Bian ZY, Deng W, Dai J, u. a. Baicalein protects against cardiac hypertrophy through blocking MEK-ERK1/2 signaling. *J Cell Biochem*

- [Internet]. 1. Mai 2013 [zitiert 9. Juni 2024];114(5):1058–65. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcb.24445>
162. Cheng PY, Lee YM, Wu YS, Chang TW, Jin JS, Yen MH. Protective effect of baicalein against endotoxic shock in rats in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol.* 15. März 2007;73(6):793–804.
 163. Lee YM, Cheng PY, Chim LS, Kung CW, Ka SM, Chung MT, u. a. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, improves cardiac contractile function in endotoxaemic rats via induction of heme oxygenase-1 and suppression of inflammatory responses. *J Ethnopharmacol.* 26. April 2011;135(1):179–85.
 164. GESTIS-Stoffdatenbank [Internet]. [zitiert 4. März 2023]. Verfügbar unter: <https://gestis.dguv.de/data?name=027190>
 165. Thompson DC. DMSO. *South Med J* [Internet]. 1990 [zitiert 4. März 2023];83(6):725. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1694048/>
 166. Medical use of dimethyl sulfoxide (DMSO) - PubMed [Internet]. [zitiert 4. März 2023]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3916302/>
 167. Brayton CF. Dimethyl Sulfoxide (DMSO): a review. 1985;
 168. DMSO - NATUR & HEILEN [Internet]. [zitiert 4. März 2023]. Verfügbar unter: <https://www.naturundheilen.de/wissensschatz/artikel/dmsol/>
 169. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, u. a. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep* [Internet]. 1. Dezember 2019 [zitiert 4. März 2023];9(1). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30874586/>
 170. Jacob3 SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology.* 1986;23:14–27.
 171. Huang SH, Wu CH, Chen SJ, Sytwu HK, Lin GJ. Immunomodulatory effects and potential clinical applications of dimethyl sulfoxide. *Immunobiology* [Internet]. 1. Mai 2020 [zitiert 4. März 2023];225(3). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31987604/>
 172. Li YM, Wang H bin, Zheng JG, Bai XD, Zhao ZK, Li JY, u. a. Dimethyl sulfoxide inhibits zymosan-induced intestinal inflammation and barrier dysfunction. *World J Gastroenterol.* 14. Oktober 2015;21(38):10853–65.
 173. Sahin M, Avsar FM, Ozel H, Topaloglu S, Yilmaz B, Pasaoglu H, u. a. The effects of dimethyl sulfoxide on liver damage caused by ischemia-reperfusion. Bd. 36, *Transplantation Proceedings.* 2004. S. 2590–2.
 174. Akyürek N, Kafali EM, Muhtaroglu S. The effects of dimethylsulfoxide on experimental hepatic ischemia. *Swiss Surg* [Internet]. 2000 [zitiert 4. März 2023];6(1):23–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10709433/>
 175. The comparison of electron microscopy and scintigraphy in determining the protective effect of dimethylsulphoxide (DMSO) on ischemia/reperfusion injury through Pringle

- maneuver - PubMed [Internet]. [zitiert 4. März 2023]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11462927/>
176. Kucuk C, Ok E, Yilmaz Z, Sozuer E, Muhtaroglu S, Arar M. The effects of dimethylsulfoxide in experimental obstructive jaundice. *Acta Chir Belg*. 2003;103(4):392–5.
 177. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, u. a. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 1987 [zitiert 19. Februar 2023];40(9):1256–65. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2445722/>
 178. Jusko WJ, Thomson AW, Fung J, McMaster P, Wong SH, Zylber-Katz E, u. a. Consensus document: therapeutic monitoring of tacrolimus (FK-506). *Ther Drug Monit* [Internet]. 1995 [zitiert 19. Februar 2023];17(6):606–14. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8588229/>
 179. Letko E, Bhol K, Pinar V, Foster CS, Ahmed AR. Tacrolimus (FK 506). *Ann Allergy Asthma Immunol* [Internet]. 1999 [zitiert 19. Februar 2023];83(3):179–90. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10507260/>
 180. St. Peter SD, Moss AA, Mulligan DC. Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver Transplantation*. 2003;9(2):105–16.
 181. Fung JJ, Starzl TE. FK506 in Solid Organ Transplantation. *Ther Drug Monit* [Internet]. 1995 [zitiert 19. Februar 2023];17(6):592. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC2954618/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10507260/)
 182. James DG. A new immunosuppressant: tacrolimus. *Postgrad Med J* [Internet]. 1996 [zitiert 19. Februar 2023];72(852):586. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8977938/>
 183. Pratschke S, Arnold H, Zollner A, Heise M, Pascher A, Schemmer P, u. a. Results of the TOP Study. *Transplant Direct* [Internet]. 2016;2(6):e76. Verfügbar unter: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01845228-201606000-00009>
 184. Pratschke S, Eder M, Heise M, Nadalin S, Pascher A, Schemmer P, u. a. Protocol TOP-Study (tacrolimus organ perfusion): A prospective randomized multicenter trial to reduce ischemia reperfusion injury in transplantation of marginal liver grafts with an ex vivo tacrolimus perfusion. *Transplant Res*. 2013;2(1):1–7.
 185. Busuttil RW, Lake JR. Role of tacrolimus in the evolution of liver transplantation. *Transplantation* [Internet]. 15. Mai 2004 [zitiert 19. Februar 2023];77(9). Verfügbar unter: https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2004/05151/ROLE_OF_TACROLIMUS_IN_THE_EVOLUTION_OF_LIVER.2.aspx
 186. Jeng L bin, Lee SG, Soin AS, Lee WC, Suh KS, Joo DJ, u. a. Efficacy and safety of everolimus with reduced tacrolimus in living-donor liver transplant recipients: 12-month results of a randomized multicenter study. *American Journal of Transplantation*. 1. Juni 2018;18(6):1435–46.

187. Kristo I, Wilflingseder J, Kainz A, Marschalek J, Wekerle T, Mühlbacher F, u. a. Effect of intraportal infusion of tacrolimus on ischaemic reperfusion injury in orthotopic liver transplantation: a randomized controlled trial. *Transpl Int* [Internet]. September 2011 [zitiert 20. Februar 2023];24(9):912. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC3359429/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21511111/)
188. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A, u. a. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* [Internet]. 27. August 1997 [zitiert 12. Juli 2018];64(4):594–8. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293871>
189. Gómez-Lechón MJ, Serralta A, Donato MT, Jiménez N, O’connor E, Castell J V, u. a. The immunosuppressant drug FK506 prevents Fas-induced apoptosis in human hepatocytes. [zitiert 20. Februar 2023]; Verfügbar unter: www.elsevier.com/locate/biochempharm
190. Crenesse D, Laurens M, Heurteaux C, Cursio R, Saint-Paul MC, Schmid-Alliana A, u. a. Rat liver ischemia-reperfusion-induced apoptosis and necrosis are decreased by FK506 pretreatment. [zitiert 20. Februar 2023]; Verfügbar unter: www.elsevier.com/locate/ejphar
191. Pratschke S, Bilzer M, Gr€ U, Angele M, Tufman A, Jauch KW, u. a. Tacrolimus Preconditioning of Rat Liver Allografts Impacts Glutathione Homeostasis and Early Reperfusion Injury.
192. Hüser N, Doll D, Altomonte J, Werner M, Kriner M, Preissel A, u. a. Graft preconditioning with low-dose tacrolimus (FK506) and nitric oxide inhibitor aminoguanidine (AGH) reduces ischemia/reperfusion injury after liver transplantation in the rat. *Arch Pharm Res* [Internet]. Februar 2009 [zitiert 20. Februar 2023];32(2):215–20. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19280151/>
193. Takeichi T, Uemoto S, Minamiguchi S, Takeyoshi I, Inomata Y, Tanaka K, u. a. Effect of ONO-4057 and tacrolimus on ischemia-reperfusion injury of the liver. *World Journal of Gastroenterology : WJG* [Internet]. 12. Dezember 2009 [zitiert 20. Februar 2023];15(45):5712. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC2789225/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20789225/)
194. Garcia-Criado FJ, Lozano-Sanchez F, Fernandez-Regalado J, Valdunciel- Garcia JJ, Parreno-Manchado F, Silva-Benito I, u. a. Possible tacrolimus action mechanisms in its protector effects on ischemia-reperfusion injury [5]. *Transplantation*. 15. Oktober 1998;66(7):942–3.
195. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A, u. a. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation*. 27. August 1997;64(4):594–8.
196. Protective effect of FK 506 on hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation: influence on hepatic microcirculation - PubMed [Internet]. [zitiert 20. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7533410/>

197. Sakr MF, Zetti GM, Hassanein TI, Farghali H, Nalesnik MA, Gavalier JS, u. a. FK 506 ameliorates the hepatic injury associated with ischemia and reperfusion in rats. *Hepatology* [Internet]. 1991 [zitiert 20. Februar 2023];13(5):947–51. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1709412/>
198. St. Peter SD, Moss AA, Mulligan DC. Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver Transplantation* [Internet]. 1. Februar 2003 [zitiert 20. Februar 2023];9(2):105–16. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12548502/>
199. Seki E, Brenner DA, Karin M. A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 [zitiert 26. Februar 2023];143(2):307. Verfügbar unter: </pmc/articles/PMC3523093/>
200. Langiewicz M, Graf R, Humar B, Clavien PA. JNK1 induces hedgehog signaling from stellate cells to accelerate liver regeneration in mice. *J Hepatol* [Internet]. 28. April 2018 [zitiert 13. Juli 2018]; Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29709677>
201. Duval H, Mbatchi SF, Grandadam S, Legendre C, Loyer P, Ribault C, u. a. Reperfusion stress induced during intermittent selective clamping accelerates rat liver regeneration through JNK pathway. *J Hepatol* [Internet]. April 2010 [zitiert 8. Februar 2024];52(4):560–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20207439/>
202. Kamata H, Honda SI, Maeda S, Chang L, Hirata H, Karin M. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* [Internet]. 11. März 2005 [zitiert 26. Februar 2023];120(5):649–61. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15766528/>
203. Seki E, Brenner DA, Karin M. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 [zitiert 26. Februar 2023];143(2):307–20. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22705006/>
204. Zhou W, Zhang Y, Hosch MS, Lang A, Zwacka RM, Engelhardt JF. Subcellular site of superoxide dismutase expression differentially controls AP-1 activity and injury in mouse liver following ischemia/reperfusion. *Hepatology* [Internet]. 2001 [zitiert 26. Februar 2023];33(4):902–14. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11283855/>
205. Theruvath TP, Czerny C, Ramshesh VK, Zhong Z, Chavin KD, Lemasters JJ. C-Jun N-terminal kinase 2 promotes graft injury via the mitochondrial permeability transition after mouse liver transplantation. *Am J Transplant* [Internet]. September 2008 [zitiert 26. Februar 2023];8(9):1819–28. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18671679/>
206. Theruvath TP, Snoddy MC, Zhong Z, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in liver ischemia and reperfusion: role of c-Jun N-terminal kinase 2. *Transplantation* [Internet]. 27. Mai 2008 [zitiert 26. Februar 2023];85(10):1500–4. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18497693/>

207. Beraza N, Lüdde T, Assmus U, Roskams T, Borghot S vander, Trautwein C. Hepatocyte-specific IKK gamma/NEMO expression determines the degree of liver injury. *Gastroenterology* [Internet]. 2007 [zitiert 26. Februar 2023];132(7):2504–17. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17570222/>
208. Martin P, Pognonec P. ERK and cell death: cadmium toxicity, sustained ERK activation and cell death. *FEBS J* [Internet]. Januar 2010 [zitiert 26. Februar 2023];277(1):39–46. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19843171/>
209. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* [Internet]. 1. Januar 2010 [zitiert 26. Februar 2023];277(1):2–21. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x>
210. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* [Internet]. Januar 2010 [zitiert 26. Februar 2023];277(1):2–21. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19843174/>
211. Subramaniam S, Unsicker K. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J* [Internet]. Januar 2010 [zitiert 26. Februar 2023];277(1):22–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19843173/>
212. Chu CT, Levinthal DJ, Kulich SM, Chalovich EM, DeFranco DB. Oxidative neuronal injury. *Eur J Biochem* [Internet]. 1. Juni 2004 [zitiert 12. Februar 2024];271(11):2060–6. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.2004.04132.x>
213. Sugiura R, Satoh R, Takasaki T. ERK: A Double-Edged Sword in Cancer. ERK-Dependent Apoptosis as a Potential Therapeutic Strategy for Cancer. *Cells* [Internet]. 1. Oktober 2021 [zitiert 11. Februar 2024];10(10). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34685488/>
214. McCubrey JA, LaHair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. September 2006 [zitiert 12. Februar 2024];8(9–10):1775–89. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16987031/>
215. Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *Biofactors* [Internet]. 2003 [zitiert 12. Februar 2024];17(1–4):287–96. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12897450/>
216. McIlwain DR, Berger T, Mak TW, Baehrecke EH, Green DR, Kornbluth S, u. a. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 1. April 2013 [zitiert 27. Februar 2023];5(4):a008656. Verfügbar unter: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/5/4/a008656.full>
217. Poręba M, Strózyk A, Salvesen GS, Drąg M. Caspase Substrates and Inhibitors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. August 2013 [zitiert 27. Februar 2023];5(8). Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC3721276/](https://pmc/articles/PMC3721276/)

218. Caspase-3 Antibody | Cell Signaling Technology [Internet]. [zitiert 28. September 2023]. Verfügbar unter: <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/caspase-3-antibody/9662>
219. Zielińska Z, Ołdak Ł, Gorodkiewicz E. Methods of PARP-1 Determination and its Importance in Living Organisms. *Protein Pept Lett* [Internet]. 6. April 2022 [zitiert 27. Februar 2023];29(6):496–504. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35382713/>
220. Wang Y, Luo W, Wang Y. PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 1. September 2019 [zitiert 27. Februar 2023];81. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31302005/>
221. Pascal JM. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 1. November 2018 [zitiert 27. Februar 2023];71:177–82. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30177435/>
222. Kadam A, Jubin T, Roychowdhury R, Begum R. Role of PARP-1 in mitochondrial homeostasis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* [Internet]. 1. Oktober 2020 [zitiert 27. Februar 2023];1864(10). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32553688/>
223. Agarwal A, Mahfouz RZ, Sharma RK, Sarkar O, Mangrola D, Mathur PP. Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2009;7(December).
224. Sims JL, Berger SJ, Berger NA. Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors Preserve Nicotinamide Adenine Dinucleotide and Adenosine 5'-Triphosphate Pools in DNA-Damaged Cells: Mechanism of Stimulation of Unscheduled DNA Synthesis. *Biochemistry*. 1983;22(22):5188–94.
225. Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2008 [zitiert 10. Februar 2024];1147:233–41. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19076445/>
226. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, u. a. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* [Internet]. 12. Juli 2002 [zitiert 10. Februar 2024];297(5579):259–63. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12114629/>
227. Huang P, Chen G, Jin W, Mao K, Wan H, He Y. Molecular Mechanisms of Parthanatos and Its Role in Diverse Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1. Juli 2022 [zitiert 11. Februar 2024];23(13). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35806303/>
228. Zheng D, Liu J, Piao H, Zhu Z, Wei R, Liu K. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: Focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis. *Front Immunol* [Internet]. 1. November 2022 [zitiert 11. Februar 2024];13. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36389728/>
229. Western Blot Ladekontrollen | Biomol Blog | Ressourcen | Biomol GmbH - Life Science Shop [Internet]. [zitiert 1. März 2023]. Verfügbar unter: <https://www.biomol.com/de/ressourcen/biomol-blog/western-blot-ladekontrollen>

230. GAPDH (14C10) Rabbit mAb | Cell Signaling Technology [Internet]. [zitiert 28. September 2023]. Verfügbar unter: https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/gapdh-14c10-rabbit-mab/2118?_requestid=4531928
231. Dutta S, Sengupta P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sci* [Internet]. 1. Mai 2016 [zitiert 1. März 2023];152:244–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26596563/>
232. Hori T, Ohashi N, Chen F, Baine AMT, Gardner LB, Hata T, u. a. Simple and reproducible hepatectomy in the mouse using the clip technique. *World J Gastroenterol*. 2012;18(22):2767–74.
233. CURSIO R, GUGENHEIM J, RICCI JE, CRENESSE D, ROSTAGNO P, MAULON L, u. a. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* [Internet]. Februar 1999 [zitiert 2. Juni 2024];13(2):253–61. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9973313/>
234. Leung HWC, Yang WH, Lai MY, Lin CJ, Lee HZ. Inhibition of 12-lipoxygenase during baicalein-induced human lung nonsmall carcinoma H460 cell apoptosis. [zitiert 25. Februar 2023]; Verfügbar unter: www.elsevier.com/locate/foodchemtox
235. Hsieh CJ, Hall K, Ha T, Li C, Krishnaswamy G, Chi DS. Baicalein inhibits IL-1 β - and TNF- α -induced inflammatory cytokine production from human mast cells via regulation of the NF- κ B pathway. *Clin Mol Allergy* [Internet]. 26. November 2007 [zitiert 22. Februar 2023];5:5. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC2206049/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17206049/)
236. Liu A, Huang L, Guo E, Li R, Yang J, Li A, u. a. Baicalein pretreatment reduces liver ischemia/reperfusion injury via induction of autophagy in rats. *Sci Rep* [Internet]. 6. Mai 2016 [zitiert 22. Februar 2023];6. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27150843/>
237. Üstüner MC, Tanrikut C, Üstüner D, Kolaç UK, Köroğlu ZÖ, Burukoğlu D, u. a. The effect of baicalein on endoplasmic reticulum stress and autophagy on liver damage. *Hum Exp Toxicol* [Internet]. 1. Oktober 2021 [zitiert 22. Februar 2023];40(10):1624–33. Verfügbar unter: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/09603271211003634?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed
238. Dinda B, Dinda S, Dassharma S, Banik R, Chakraborty A, Dinda M. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders. 2017 [zitiert 22. Februar 2023]; Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.0040223-5234/>
239. Xiao T, Cui Y, Ji H, Yan L, Pei D, Qu S. Baicalein attenuates acute liver injury by blocking NLRP3 inflammasome. 2020 [zitiert 22. Februar 2023]; Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.109>
240. GORCZYCA W, BRUNO S, DARZYNKIEWICZ R, GONG J, DARZYNKIEWICZ Z. DNA STRAND BREAKS OCCURRING DURING APOPTOSIS - THEIR EARLY INSITU DETECTION BY THE TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE

AND NICK TRANSLATION ASSAYS AND PREVENTION BY SERINE PROTEASE INHIBITORS. *Int J Oncol.* 1. November 1992;1(6).

241. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology.* 1992;119(3):493–501.
242. Loo DT. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: An overview of techniques. *Methods in Molecular Biology.* 2011;682:3–13.
243. Jewell J, Mastro AM. USING TERMINAL DEOXYNUCLEOTIDYL TRANSFERASE (TDT) ENZYME TO DETECT TUNEL-POSITIVE, GFP-EXPRESSING APOPTOTIC CELLS.
244. Mirzayans R, Murray D. Do TUNEL and other apoptosis assays detect cell death in preclinical studies? *Bd. 21, International Journal of Molecular Sciences.* MDPI AG; 2020. S. 1–12.
245. In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein sufficient for ≤50 tests, suitable for detection | Sigma-Aldrich [Internet]. [zitiert 26. Mai 2022]. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/roche/11684795910>
246. Ag-Scientific. Frequently asked questions about Proteinase K.
247. Proteinase K - Wikipedia [Internet]. [zitiert 26. Mai 2022]. Verfügbar unter: https://en.wikipedia.org/wiki/Proteinase_K
248. Cell Lysis Buffer (10X) | Cell Signaling Technology [Internet]. [zitiert 1. Februar 2023]. Verfügbar unter: https://www.cellsignal.com/products/buffers-dyes/cell-lysis-buffer-10x/9803?_=1675275744945&Ntt=cell%20lysis&tahead=true
249. Pierce™ BCA Protein Assay Kit [Internet]. [zitiert 2. Februar 2023]. Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/de/en/23225>
250. Olson BJSC. Assays for Determination of Protein Concentration. *Curr Protoc Pharmacol* [Internet]. 1. Juni 2016 [zitiert 2. Februar 2023];73(1):A.3A.1-A.3A.32. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpph.3>
251. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680–5.
252. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Proteins.* 14. November 2003;41–56.
253. Kim B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2017 [zitiert 3. Februar 2023];1606:133–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28501998/>
254. Goldman A, Ursitti JA, Mozdzanowski J, Speicher DW. Electroblothing from Polyacrylamide Gels. *Curr Protoc Protein Sci* [Internet]. 1. November 2015 [zitiert 3. Februar 2023];82:10.7.1-10.7.16. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26521711/>

255. Reynolds JA, Tanford C. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1970 [zitiert 3. Februar 2023];66(3):1002–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5269225/>
256. Pitt-Rivers R, Impiombato FS. The binding of sodium dodecyl sulphate to various proteins. *Biochem J* [Internet]. 1968 [zitiert 3. Februar 2023];109(5):825–30. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4177067/>
257. Kurien BT, Hal Scofield R. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol* [Internet]. 4. Juni 2015 [zitiert 3. Februar 2023];1312:17–30. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26043986/>
258. Jensen EC. The Basics of Western Blotting. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* [Internet]. 1. März 2012 [zitiert 3. Februar 2023];295(3):369–71. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ar.22424>
259. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustín O, u. a. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* [Internet]. 2010 [zitiert 3. Februar 2023];401(2):318–20. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20206115/>
260. Collins TJ. ImageJ for microscopy. *Biotechniques* [Internet]. 16. Juli 2007 [zitiert 5. März 2023];43(1S):S25–30. Verfügbar unter: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000112517>
261. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods* [Internet]. Juli 2012 [zitiert 5. März 2023];9(7):671. Verfügbar unter: <https://pmc/articles/PMC5554542/>
262. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, u. a. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* [Internet]. Juli 2012 [zitiert 5. März 2023];9(7):676–82. Verfügbar unter: <https://imagej.github.io/software/fiji/index>
263. Xie P, Quan L, Xie S, Chen B, Wei K, Ren J, u. a. Quantitative study of liver hemodynamic changes in rats with small-for-size syndrome by the 4D-CT perfusion technique. *Br J Radiol* [Internet]. 2019 [zitiert 10. Februar 2024];92(1098). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31017448/>
264. Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T, u. a. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transpl Int* [Internet]. September 2005 [zitiert 8. Juni 2024];18(9):1079–89. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16101730/>
265. Mirzayans R, Murray D. Do TUNEL and Other Apoptosis Assays Detect Cell Death in Preclinical Studies? *Int J Mol Sci* [Internet]. 1. Dezember 2020 [zitiert 8. Juni 2024];21(23):1–12. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33260475/>

266. Kraupp BG, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* [Internet]. Mai 1995 [zitiert 14. Februar 2024];21(5):1465–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7737654/>
267. Yagi S, Hirata M, Miyachi Y, Uemoto S. Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1. November 2020 [zitiert 14. Februar 2024];21(21):1–23. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33182515/>
268. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* [Internet]. 2012 [zitiert 14. Februar 2024];22(13):1166–75. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22658593/>
269. Konishi T, Lentsch AB. Hepatic Ischemia/Reperfusion: Mechanisms of Tissue Injury, Repair, and Regeneration. *Gene Expr* [Internet]. 2017 [zitiert 14. Februar 2024];17(4):277–87. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28893351/>
270. Negligible Oval Cell Proliferation Following Ischemia-Reperfusion Injury With and Without Partial Hepatectomy - PubMed [Internet]. [zitiert 14. Februar 2024]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28331445/>
271. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* [Internet]. 2010 [zitiert 14. Februar 2024];176(1):2–13. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20019184/>
272. Sato Y, Tsukada K, Hatakeyama K. Role of shear stress and immune responses in liver regeneration after a partial hepatectomy. *Surg Today* [Internet]. 1999 [zitiert 14. Februar 2024];29(1):1–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9934824/>
273. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol* [Internet]. 2012 [zitiert 14. Februar 2024];57(3):692–4. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22613006/>
274. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* [Internet]. Februar 2006 [zitiert 14. Februar 2024];43(2 Suppl 1). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16447274/>
275. Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, u. a. Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Cleavage in Apoptosis CASPASE 3-RESISTANT PARP MUTANT INCREASES RATES OF APOPTOSIS IN TRANSFECTED CELLS*. 1999 [zitiert 15. Februar 2024]; Verfügbar unter: <http://www.jbc.org>
276. Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2010 [zitiert 15. Februar 2024];8:31. Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC3022541/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20019184/)
277. Mashimo M, Onishi M, Uno A, Tanimichi A, Nobeyama A, Mori M, u. a. The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic PAR carrier to induce AIF-

- mediated apoptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 1. Januar 2021 [zitiert 15. Februar 2024];296. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33168626/>
278. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in Molecular Biology*. 2012;887:41–7.
279. Golriz M, Majlesara A, El Sakka S, Ashrafi M, Arwin J, Fard N, u. a. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species. *Liver Transplantation* [Internet]. 1. Juni 2012 [zitiert 13. Juli 2018];26(2):103–14. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tre.2011.10.006>
280. Yamashita S, Tanaka M, Ida C, Kouyama K, Nakae S, Matsuki T, u. a. Physiological levels of poly(ADP-ribose) during the cell cycle regulate HeLa cell proliferation. *Exp Cell Res*. 1. August 2022;417(1):113163.
281. Smith HL, Willmore E, Mukhopadhyay A, Drew Y, Curtin NJ. Differences in Durability of PARP Inhibition by Clinically Approved PARP Inhibitors: Implications for Combinations and Scheduling. *Cancers (Basel)* [Internet]. 1. November 2022 [zitiert 15. Februar 2024];14(22). Verfügbar unter: [/pmc/articles/PMC9688250/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39688250/)
282. Sun L, Fan H, Yang L, Shi L, Liu Y. Tyrosol prevents ischemia/reperfusion-induced cardiac injury in H9c2 cells: involvement of ROS, Hsp70, JNK and ERK, and apoptosis. *Molecules* [Internet]. 1. März 2015 [zitiert 11. Februar 2024];20(3):3758–75. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25723850/>
283. Gong M, Liang W, Lu Q, Zhang J. PHLDA1 knockdown inhibits inflammation and oxidative stress by regulating JNK/ERK pathway, and plays a protective role in sepsis-induced acute kidney injury. *Allergol Immunopathol (Madr)* [Internet]. 2022 [zitiert 11. Februar 2024];50(6):1–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36335439/>
284. Zhu L, Zhou YY, Zhang Z, Yin SQ, Lv DD, Wu YL, u. a. Remifentanil preconditioning promotes liver regeneration via upregulation of β -arrestin 2/ERK/cyclin D1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 11. Juni 2021 [zitiert 12. Februar 2024];557:69–76. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33862462/>
285. Casillas-Ramírez A, Mosbah I Ben, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci*. 12. Oktober 2006;79(20):1881–94.
286. Shinoda M, Shimazu M, Matsuda S, Wakabayashi G, Tanabe M, Hoshino K, u. a. c-Jun N-terminal kinase activation during warm hepatic ischemia/reperfusion injuries in a rat model. *Wound Repair Regen* [Internet]. 2002 [zitiert 8. Juni 2024];10(5):314–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12406168/>
287. Uehara T, Peng XX, Bennett B, Satoh Y, Friedman G, Currin R, u. a. c-Jun N-terminal kinase mediates hepatic injury after rat liver transplantation. *Transplantation* [Internet]. 15. August 2004 [zitiert 8. Juni 2024];78(3):324–32. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15316358/>
288. Cursio R, Filippa N, Miele C, Van Obberghen E, Gugenheim J. Involvement of protein kinase B and mitogen-activated protein kinases in experimental normothermic liver

- ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* [Internet]. Juni 2006 [zitiert 8. Juni 2024];93(6):752–61. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16671069/>
289. Bendinelli P, Piccoletti R, Maroni P, Bernelli-Zazzera A. The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver reperfusion. *FEBS Lett* [Internet]. 2. Dezember 1996 [zitiert 8. Juni 2024];398(2–3):193–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8977105/>
290. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. April 2006 [zitiert 8. Juni 2024];290(4). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16537970/>
291. Massip-Salcedo M, Casillas-Ramirez A, Franco-Gou R, Bartrons R, Mosbah I Ben, Serafin A, u. a. Heat Shock Proteins and Mitogen-activated Protein Kinases in Steatotic Livers Undergoing Ischemia-Reperfusion: Some Answers. *Am J Pathol*. 1. Mai 2006;168(5):1474–85.
292. Crenesse D, Schmid-Alliana A, Hornoy J, Rossi B, Gugenheim J. Hypoxia-reoxygenation differentially stimulates stress-activated protein kinases in primary-cultured rat hepatocytes. *Transplant International*. 28. April 2000;13(0):S597–9.
293. Crenesse D, Schmid-Alliana A, Laurens M, Cursio R, Gugenheim J. JNK1/SAPK1 involvement in hypoxia-reoxygenation-induced apoptosis in rat hepatocytes. *Transplant Proc*. 2001;33(1–2):260–1.
294. Crenesse D, Hugues M, Ferre C, Poiree JC, Benoliel J, Dolisi C, u. a. Inhibition of calcium influx during Hypoxia/reoxygenation in primary cultured rat hepatocytes. *Pharmacology*. März 1999;58(3):160–70.
295. Crenesse D, Tornieri K, Laurens M, Heurteaux C, Cursio R, Gugenheim J, u. a. Diltiazem reduces apoptosis in rat hepatocytes subjected to warm hypoxia-reoxygenation. *Pharmacology*. 2002;65(2):87–95.
296. Crenesse D, Gugenheim J, Hornoy J, Tornieri K, Laurens M, Cambien B, u. a. Protein kinase activation by warm and cold hypoxia-reoxygenation in primary-cultured rat hepatocytes-JNK1/SAPK1 involvement in apoptosis. *Hepatology*. 2000;32(5):1029–36.
297. Wu H, Bai H, Duan S, Yuan F. Downregulating Serine Hydroxymethyltransferase 2 Deteriorates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury through ROS/JNK/P53 Signaling in Mice. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 [zitiert 8. Juni 2024];2019. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31828098/>
298. Deng J, Feng J, Liu T, Lu X, Wang W, Liu N, u. a. Beraprost sodium preconditioning prevents inflammation, apoptosis, and autophagy during hepatic ischemia-reperfusion injury in mice via the P38 and JNK pathways. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2018 [zitiert 8. Juni 2024];12:4067–82. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30568428/>

299. Vafadari R, Kraaijeveld R, Weimar W, Baan CC. Tacrolimus inhibits NF- κ B activation in peripheral human T cells. *PLoS One* [Internet]. 1. April 2013 [zitiert 17. Februar 2024];8(4). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23573283/>
300. Liu C, Dou K, Dou C, Liu J, Zhao Q. Anti-inflammatory effects of tacrolimus in a rat model of acute pancreatitis. *Med Chem* [Internet]. 1. Mai 2010 [zitiert 17. Februar 2024];6(1):37–43. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20402659/>
301. Kim MJ, Sung JJ, Kim SH, Kim JM, Jeon GS, Mun SK, u. a. The Anti-Inflammatory Effects of Oral-Formulated Tacrolimus in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Korean Med Sci* [Internet]. 1. September 2017 [zitiert 17. Februar 2024];32(9):1502–7. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28776347/>
302. Yu Y, Zhong J, Peng L, Wang B, Li S, Huang H, u. a. Tacrolimus downregulates inflammation by regulating pro-/anti-inflammatory responses in LPS-induced keratitis. *Mol Med Rep* [Internet]. 1. November 2017 [zitiert 17. Februar 2024];16(5):5855–62. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28849181/>
303. Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A, u. a. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* [Internet]. 27. August 1997 [zitiert 13. Juni 2024];64(4):594–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9293871/>
304. Kristo I, Wilflingseder J, Kainz A, Marschalek J, Wekerle T, Mühlbacher F, u. a. Effect of intraportal infusion of tacrolimus on ischaemic reperfusion injury in orthotopic liver transplantation: A randomized controlled trial. *Transplant International*. 2011;24(9):912–9.
305. Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Axmann S, Hutter J, Messmer K, u. a. Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation* [Internet]. 15. September 2002 [zitiert 14. Juni 2024];74(5):681–8. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12352886/>
306. Haines DD, Bak I, Ferdinandy P, Mahmoud FF, Al-Harbi SA, Blasig IE, u. a. Cardioprotective effects of the calcineurin inhibitor FK506 and the PAF receptor antagonist and free radical scavenger, EGb 761, in isolated ischemic/reperfused rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* [Internet]. 2000 [zitiert 14. Juni 2024];35(1):37–44. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10630731/>
307. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, u. a. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* [Internet]. 1994 [zitiert 14. Juni 2024];74(2):336–43. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7507416/>
308. St. Peter SD, Post DJ, Rodriguez-Davalos MI, Douglas DD, Moss AA, Mulligan DC. Tacrolimus as a liver flush solution to ameliorate the effects of ischemia/reperfusion injury following liver transplantation. *Liver Transplantation* [Internet]. 1. Februar 2003 [zitiert 13. Juni 2024];9(2):144–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12548508/>

309. Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *The Journal of Immunology*. 15. Juli 1995;155(2):525–8.
310. Spertini O, Luscinskas FW, Kansas GS, Munro JM, Griffin JD, Gimbrone MA, u. a. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *The Journal of Immunology*. 15. Oktober 1991;147(8):2565–73.
311. Lehr HA, Olofsson AM, Carew TE, Vajkoczy P, Von Andrian UH, Hubner C, u. a. P-selectin mediates the interaction of circulating leukocytes with platelets and microvascular endothelium in response to oxidized lipoprotein in vivo. *Laboratory Investigation*. 1994;71(3):380–6.
312. Cummings RD, Smith DF. The selectin family of carbohydrate-binding proteins: Structure and importance of carbohydrate ligands for cell adhesion. *BioEssays*. 1992;14(12):849–56.
313. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* [Internet]. 1990 [zitiert 14. Juni 2024];346(6283):425–34. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1974032/>
314. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Deodato B, Arlotta M, u. a. Tacrolimus limits polymorphonuclear leucocyte accumulation and protects against myocardial ischaemia- reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2000 [zitiert 14. Juni 2024];32(3):429–40. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10731442/>
315. The interleukin-8 AP-1 and kappa B-like sites are genetic end targets of FK506-sensitive pathway accompanied by calcium mobilization - PubMed [Internet]. [zitiert 14. Juni 2024]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7510691/>
316. Krishnadasan B, Naidu B, Rosengart M, Farr AL, Barnes A, Verrier ED, u. a. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of cyclosporine and tacrolimus. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* [Internet]. 2002 [zitiert 14. Juni 2024];123(4):756–67. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11986604/>
317. Cytokines and extrahepatic sequelae of ischemia-reperfusion injury to the liver - PubMed [Internet]. [zitiert 14. Juni 2024]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8030871/>
318. Ohmori M, Kobayashi E, Harada K, Kitoh Y, Mizuta K, Uchida H, u. a. Do immunosuppressants directly affect neutrophils, resulting in protection of the liver against ischemia-reperfusion injury? *Transplantation* [Internet]. 15. Oktober 1998 [zitiert 14. Juni 2024];66(7):940–1. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9798712/>
319. Bai H, Fang CW, Shi Y, Zhai S, Jiang A, Li YN, u. a. Mitochondria-derived H₂O₂ triggers liver regeneration via FoxO3a signaling pathway after partial hepatectomy in mice. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05744-w>

320. Lee Janet EY, Li Y, Zhu H, Yang S, Lin Zhi H, Trush M, u. a. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. *Hepatology* [Internet]. 1999 [zitiert 14. Juni 2024];29(3):677–87. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10051468/>
321. Aguilar-Delfín I, López-Barrera F, Hernández-Muñoz R. Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: Partial hepatectomy and acute CCl₄ administration. *Hepatology* [Internet]. September 1996 [zitiert 14. Juni 2024];24(3):657–62. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8781339/>
322. Yang S, Tan TMC, Wee A, Leow CK. Mitochondrial respiratory function and antioxidant capacity in normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. Januar 2004 [zitiert 14. Juni 2024];61(2):220–9. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14745500/>
323. Guerrieri F, Pellicchia G, Lopriore B, Papa S, Liquori GE, Ferri D, u. a. Changes in ultrastructure and the occurrence of permeability transition in mitochondria during rat liver regeneration. *Eur J Biochem* [Internet]. 2002 [zitiert 14. Juni 2024];269(13):3304–12. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12084072/>
324. Mitochondrial oxidative phosphorylation and intracellular glutathione compartmentation during rat liver regeneration - PubMed [Internet]. [zitiert 14. Juni 2024]. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7737652/>
325. Vendemiale G, Grattagliano I, Caraceni P, Caraccio G, Domenicali M, Dall'Agata M, u. a. Mitochondrial oxidative injury energy metabolism alteration in rat fatty liver: Effect of the nutritional status. *Hepatology*. 1. Januar 2001;33(4):808–15.
326. Kawano K, Bowers JL, Kim YI, Tatsuma T, Kitano S, Kobayashi M, u. a. FK506 reduces oxidative hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation. *Transplant Proc* [Internet]. Juni 1996 [zitiert 12. Juli 2018];28(3):1902–3. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8658938>
327. Loscalzo J. Membrane Redox State and Apoptosis: Death by Peroxide. *Cell Metab*. 3. September 2008;8(3):182–3.
328. Taniai N, Akimaru K, Ishikawa Y, Kanada T, Kakinuma D, Mizuguchi Y, u. a. Hepatotoxicity caused by both tacrolimus and cyclosporine after living donor liver transplantation. *J Nippon Med Sch* [Internet]. Juni 2008 [zitiert 16. Februar 2024];75(3):187–91. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18648179/>
329. Ko MS, Choi YH, Jung SH, Lee JS, Kim HS, Lee CH, u. a. Tacrolimus therapy causes hepatotoxicity in patients with a history of liver disease. *Int J Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 1. Mai 2015 [zitiert 16. Februar 2024];53(5):363–71. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25740263/>
330. Schutte-Nutgen K, Tholking G, Suwelack B, Reuter S. Tacrolimus - Pharmacokinetic Considerations for Clinicians. *Curr Drug Metab* [Internet]. 4. Januar 2018 [zitiert 16. Februar 2024];19(4). Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29298646/>

331. Chiappa A, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Bellomi M, Biffi R, u. a. Effects of the free radical scavenger dimethyl sulphoxide on experimental normothermic ischaemia of the liver. *Dig Surg.* 2003;20(3):238–45.
332. Rehman H, Connor HD, Ramshesh VK, Theruvath TP, Mason RP, Wright GL, u. a. Ischemic preconditioning prevents free radical production and mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts. *Transplantation.* 2008;85(9):1322–31.