

Aus der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Universitätsklinikum Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. W.T. Knoefel

**Einfluß von Ginkgo Biloba Extrakt (EGB 761)
auf den Reperfusionsschaden nach warmer Ischämie
der gesunden und verfetteten Rattenleber**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anja Schutte

2005

Meinen Eltern

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. W.T. Knoefel

Korreferent: Prof. Dr. M. Wettstein

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1 Einführung in die Thematik.....	8
1.2 Fragestellungen.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Tierversuchsgenehmigung	15
2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....	15
2.3 Versuchsdurchführung	15
2.3.1 Narkose	15
2.3.2 Operation und intraoperatives Monitoring.....	16
2.3.3 Gabe von EGB 761.....	17
2.4 Versuchsgruppen	18
2.5 Intravitalmikroskopische Untersuchungen.....	20
2.5.1 Technischer Aufbau und Durchführung	20
2.5.2 Angewandte Fluoreszenzfarbstoffe zur IVM.....	21
2.5.3 Auswertung der IVM	22
2.6 Reflexspektrophotometrie.....	23
2.7 Laborchemische Analysen	24
2.8 Histologie.....	24
2.9 Molekularbiologische Untersuchungen zur Bestimmung der HSP-70 und EGR-1 mRNA-Expression.....	26
2.9.1 RNA-Isolation.....	26
2.9.2 Gelelektrophorese der isolierten RNA	27
2.9.3 Northern Blot.....	28
2.9.4 Primer	30
2.9.5 Herstellung der Hybridisierungssonden	30
2.9.6 Hybridisierung.....	32
2.9.7 Nachweis der markierten RNA.....	32
2.10 Statistische Auswertung	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Histomorphologie verfetteter Rattenlebern.....	35

3.2 Intravitalmikroskopische Untersuchungen nach I/R bei Versuchstieren mit gesunder Leber	37
3.2.1 EGB 761 verbessert die postischämische sinusoidale Perfusion gesunder Lebern.....	39
3.2.2 EGB 761 vermindert die postischämische Leukozytenadhäsion in gesunden Lebern.....	41
3.3 Intravitalmikroskopische Untersuchungen nach I/R bei Versuchstieren mit Fettleber	44
3.3.1 EGB 761 verbessert die postischämische sinusoidale Perfusion bei Versuchstieren mit Fettleber.....	44
3.3.2 EGB761 vermindert die postischämische Leukozytenadhäsion bei Versuchstieren mit einer Fettleber	46
3.4 Leberenzyme (GOT, GPT, GLDH)	47
3.4.1 EGB761 bewirkt keine Reduktion der Leberenzyme nach Ischämie und Reperfusion der gesunden oder verfetteten Rattenleber	47
3.4.2 Galleproduktion.....	49
3.5 HSP-70 und EGR-1 mRNA-Expression.....	51
4. Diskussion	555
5. Zusammenfassung	644
6. Literaturverzeichnis.....	655
7. Danksagung.....	844
8. Lebenslauf	855
9. Erklärung	866

Abkürzungsverzeichnis

A. carotis	Arteria carotis
A. hepatica	Arteria hepatica
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
EGB761	Gingko Biloba Extrakt
EGR -1	Early Growth Response – 1
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GOT (AST)	Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (Aspartat-Aminotransferase)
GPT (ALT)	Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Alanin-Aminotransferase)
GLDH	Glutamat Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HO [•]	Hydroxyl Radikal
HOO [•]	Peroxid Radikal
HSP	Heat Shock Protein
IGF	Insulin like growth factor
I/R	Ischämie / Reperfusion
IVM	Intravitalmikroskopie
LB	Loading Buffer = Ladepuffer
LLL	linker Leberlappen
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobin Konzentration
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MRNA	messenger RNA
O ₂ ^{•-}	Superperoxide-Anion

PAF	Plättchen Aktivierender Faktor
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RB	Running Buffer = Laufpuffer
RLL	rechter Leberlappen
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
Rpm	rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SB	Sample Buffer = Probenpuffer
SD	Standardabweichung
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
V. cava	Vena cava
V. jugularis	Vena jugularis
XD	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Die zeitlich begrenzte Organischämie bei Lebertransplantationen oder bei komplizierten Leberresektionen, die eine passagere Unterbrechung des Blutflusses erfordern, bewirkt organspezifische pathophysiologische Reaktionen, die wesentlich die postoperative Organfunktion beeinflussen. Mikrozirkulatorische und metabolische Veränderungen während Ischämie und Reperfusion (I/R) verursachen lokale Gewebeschäden, die mit einer Leberdysfunktion bis hin zum Leberversagen assoziiert sein können.

Normothermische (warme) Ischämie wird von der Leber schlecht toleriert und führt relativ rasch zu einem Absterben von Hepatozyten ⁽¹⁾. Während der sauerstoffreichen Reperfusionsphase wird die letale Zellschädigung durch Aktivierung von Kupffer-Zellen, Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale, lysosomaler Enzyme und einer Reihe verschiedener Zytokine weiter verstärkt ^(2,3). Potenziert werden diese I/R-bedingten Reaktionen durch Expression von Adhäsionsmolekülen und konsekutiver Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten ^(4,5).

Im Mittelpunkt des initialen pathophysiologischen Geschehens steht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale während der sauerstoffreichen Reperfusion ⁽⁶⁾.

Eine anhaltende Hypoxie führt während der warmen Ischämie in Parenchymzellen der Leber (Hepatozyten) zu einer gesteigerten Umwandlung von Xanthindehydrogenase (XD) zu Xanthinoxidase (XO) sowie zu einer Akkumulation von Hypoxanthin durch den Verbrauch von ATP ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$). Während der sauerstoffreichen Reperfusion katalysiert XO unter Bildung freier reaktiver Sauerstoffradikale (O_2^- , HO^- , HOO^-) den Abbau von Hypoxanthin zu Harnsäure (Abb. 1) ^(7,8,9).

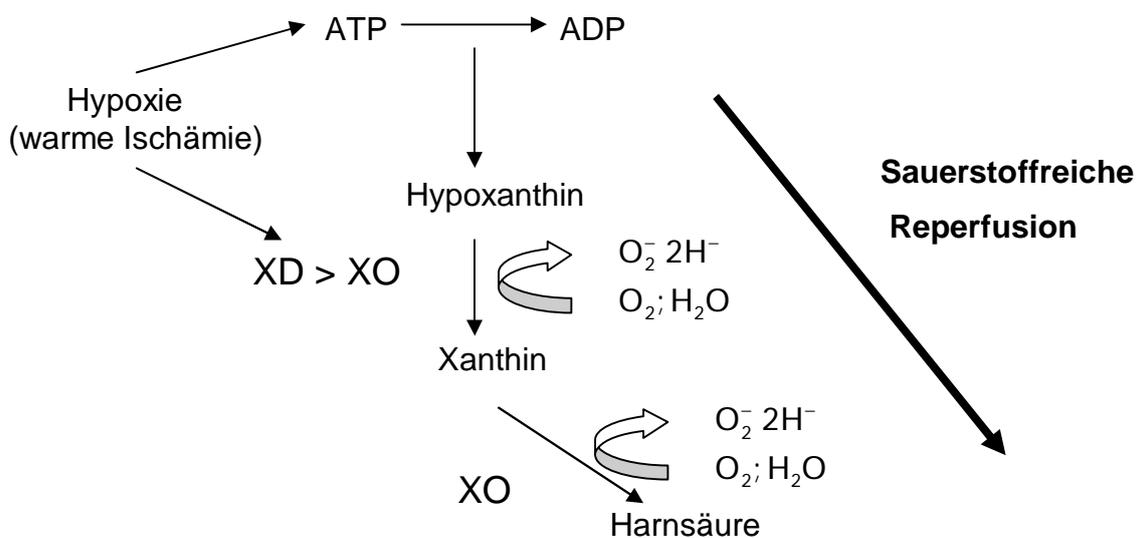


Abb. 1: Entstehung freier Sauerstoffradikale durch Reduktion von Hypoxanthin zu Harnsäure

Freie Sauerstoffradikale sind instabile, sehr reagible Moleküle, die durch die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleotiden zytotoxisch wirken ⁽¹⁰⁾. Thioloxydation und Lipidperoxydation können eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran bis hin zur kompletten Lyse der Zelle bewirken ⁽¹¹⁾. Hepatozyten besitzen jedoch ausreichende Abwehrmechanismen um einer erhöhten oxidativen Belastung intrazellulär entgegenzuwirken, so dass quantitativ nicht genügend freie Radikale intrazellulär gebildet werden, um die letale Hepatozytenschädigung während der Reperfusionsphase ausreichend zu erklären ^(12,13). Von größerer Bedeutung für die Induktion des Reperfusionsschadens erscheint daher das Ausmaß der extrazellulären oxidativen Belastung. Hauptquelle freier Radikale mit zytotoxischem Potential sind in der frühen Reperfusionsphase der Leber ortständige Kupfferzellen ⁽¹⁴⁾. Extrazelluläre Xanthinoxidase, freigesetzt durch Hepatozyten, ist nach längerer Ischämie möglicherweise eine zusätzliche Quelle ⁽¹⁵⁾.

Aktivierte Kupfferzellen sezernieren neben großen Mengen an freien Radikalen ⁽¹⁶⁾ auch verschiedene Zytokine ⁽¹⁷⁾, Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) ⁽¹⁸⁾ und Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) ⁽¹⁹⁾. In vitro fördert PAF die Ag-

gregation, Chemotaxis, Degranulation und Bildung reaktiver Sauerstoffradikale neutrophiler Leukozyten ⁽²⁰⁾. Des Weiteren dient PAF als Signal für die Endothel-Leukozytenadhäsion ⁽²¹⁾. Neben Kupffer-Zellen wird PAF auch von neutrophilen Leukozyten selbst, sowie von Thrombozyten und Endothelzellen gebildet ^(22,23).

Die initiale Reperfusionphase (1-2 Std.) ist charakterisiert durch oxidative Zellschädigungen, hervorgerufen durch aktivierte Kupffer-Zellen und die sinusoidale Akkumulation neutrophiler Leukozyten ⁽²⁴⁾. Adhäsion und Infiltration neutrophiler Leukozyten bestimmen die späte Reperfusionphase (6-24 Std.), die im Sinne einer postischämischen Entzündungsreaktion schwere parenchymatöse Zellschäden bewirken kann, die wesentlich die postischämische Organfunktion bestimmen ⁽²⁵⁾.

Die Steatosis hepatis (Leberverfettung), hervorgerufen durch Alkoholabhängigkeit, Fettleibigkeit, Medikamentenabusus, Diabetes mellitus und andere metabolische Krankheiten, ist in unserer Bevölkerung weit verbreitet ^(26,27,28,29). Hierbei führen extrazelluläre Fettablagerungen zu Veränderungen der sinusoidalen Architektur mit Blutstauung, disseminierten fokalen Hemorrhagien, hepatozellulären Nekrosen, Fibrinablagerungen und zu einer Infiltration neutrophiler Leukozyten ⁽³⁰⁾. Obwohl dieser pathologische Status der Leber häufig ohne klinisch sichtbare Symptomatik besteht, so birgt die Leberverfettung in Bezug auf Leberoperationen ein nicht zu unterschätzendes Risiko für das postoperative Auftreten hepatischer Dysfunktion ^(31,32).

In der Transplantationschirurgie weisen etwa 35% aller potentieller Spenderlebern pathologische Veränderungen im Sinne einer Steatosis hepatis auf und können daher häufig nicht zur Transplantation genutzt werden ⁽³³⁾, da diese Spenderlebern mit einer erhöhten Inzidenz eines postoperativen Transplantatversagens verbunden sind ⁽³⁴⁾.

Experimentelle Studien konnten zeigen, dass in Fettlebern während der Reperfusion vermehrt freie Radikale erzeugt werden ⁽³⁵⁾ und die Toleranz gegenüber oxidativem Stress vermindert ist ⁽³⁶⁾. Dies ist verbunden mit einer Verstärkung des Ischämie-/Reperfusionsschaden, sowie signifikant niedrigeren Überlebensraten nach Transplantation ^(37,38).

Auf molekularbiologischer Ebene führt die Ischämie und Reperfusion der Leber unter anderem zur Induktion von Heat Shock Proteinen (HSP) ⁽³⁹⁾. HSP zählen zur Gruppe der intrazellulären Stressproteine bzw. zur Gruppe der Chaperone (Begleitproteine) die eine korrekte Faltung und Stabilisierung denaturierter oder ungefalteter Proteine fördern und Zellen vor der Akkumulation missgefalteter und aggregierter Proteine (sog. „Proteotoxizität“) schützen ^(40,41). Das wohl bekannteste und am besten charakterisierte Heat Shock Protein ist HSP70. Die Induktion einer erhöhten intrazellulären HSP70-Expression schützt die Zellen bzw. das Organ sowohl zum Zeitpunkt des zellschädigenden Ereignisses, als auch im Rahmen eines bestimmten Zeitintervalls nach Expressionserhöhung durch Toleranzsteigerung gegenüber zellulärem Stress ^(42,43). Die erhöhte intrazelluläre HSP70 Expression wird unter anderem hervorgerufen durch Hypoxie, Hyperthermie und durch reaktive Sauerstoffradikale in der postischämischen Reperusionsphase und dient dem Funktionserhalt der Zelle ^(44,45,46). Das Ausmaß der gesteigerten HSP70 Expression nach Ischämie und Reperfusion reflektiert letztlich die Stärke der zellulären Schädigung ⁽⁴⁷⁾.

Ein anderes Molekül welches in den letzten Jahren mit der Pathogenese ischämisch bedingter Gewebsschäden in Zusammenhang gebracht wurde ist Early Growth Response-1 (Egr-1) ⁽⁴⁸⁾. EGR-1 gehört zur immediate-early Genfamilie und wird aufgrund seiner schnellen Induktionskinetik – innerhalb von Minuten nach einem Stimulus – und seines schnellen Verfalls innerhalb weniger Stunden auch „immediate-early response Protein“ genannt.

Es handelt sich hierbei um einen zinc-finger Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf "shear"-Streß, Hypoxie und Gefäßschäden hochreguliert wird ^(49,50). EGR-1 wurde nach seiner Entdeckung zunächst in Verbindung mit Regenerationsprozessen gebracht, da die EGR-1 Expression mit der Exposition von Zellen gegenüber Wachstums- und Differenzierungsmediatoren korreliert ⁽⁵¹⁾. Zudem ist EGR-1 in die Aktivierung der IGF-II-Transkription bei Hypoxie involviert, ein potentes Mitogen ⁽⁵²⁾ und Inhibitor der Apoptose ⁽⁵³⁾.

Ziel dieser experimentellen Studie ist die Untersuchung von *Ginkgo Biloba* Extrakt (EGB761) und dessen Einfluss auf den Ischämie- / Reperfusionsschaden nach normothermer Ischämie der gesunden und verfetteten Leber.

EGB761 (Extract of *Ginkgo Biloba*) ist ein standardisiertes Pflanzenextrakt aus den getrockneten Blättern des *Ginkgo*-Baumes, welches schon seit mehr als tausend Jahren erfolgreich in der traditionellen chinesischen Medizin eingesetzt wird. *Ginkgo Biloba* Extrakt ist eine Mischung aus aktiven Inhaltsstoffen, die als polyvalentes Therapeutikum in die Medizin eingeführt wurde ⁽⁵⁴⁾. Es setzt sich zusammen aus 24 % Flavonoiden (Quercetin, Kaempferol und Isorhamnetin) und 6 % Terpenoiden, die wiederum aus 2,8 – 3,4 % Ginkgoliden und 2,6 – 3,2 % Bilobaliden bestehen ⁽⁵⁵⁾. Ein geringer Gehalt an organischen Säuren ist von Bedeutung für die Wasserlöslichkeit des Extrakts ⁽⁵⁶⁾. *Ginkgo Biloba* Extrakt ist in verschiedenen Formen als Arzneimittel frei verkäuflich (z.B. Tebonin[®], *Ginkgo STADA*, *Ginkobil*[®] ratiopharm, etc.) und wird von den Herstellern bei Hirnleistungsstörungen infolge altersbedingter Verengung der Blutgefäße (Arteriosklerose) mit den Symptomen Gedächtnisschwäche ⁽⁵⁷⁾, Konzentrationsstörungen, Kopfschmerzen, Schwindel (Vertigo) ⁽⁵⁸⁾ und Ohrensausen (Tinnitus) ⁽⁵⁹⁾ und bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit ⁽⁶⁰⁾ empfohlen. Die Substanz wurde bereits erfolgreich zur Behandlung des Morbus Alzheimer, der senilen Demenz ⁽⁶¹⁾, kardiovaskulärer Erkrankungen ⁽⁶²⁾, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit ⁽⁶³⁾ sowie bei Netzthautschäden ⁽⁶⁴⁾ verwendet. Bis auf wenige Berichte über das Auftreten von gastrointestinalen Beschwerden, Kopfschmerzen, Tinnitus und leichten allergischen Reaktionen nach der Einnahme von *Ginkgo Biloba* Extrakt, sind keine besonderen Nebenwirkungen und keine Mutagenitäten bekannt ⁽⁵⁵⁾.

Die positive Wirkung von EGB761 auf Mikrozirkulationsstörungen erklärt sich vor allem durch die antioxidativen Eigenschaften der Flavonoide ⁽⁵⁶⁾ sowie durch den PAF-Antagonismus der enthaltenen Ginkgolide ⁽⁶⁵⁾. *In vivo* bewirkt die Kombination der EGB761-Inhaltsstoffe eine Reduktion freier Radikale sowie eine Verminderung der dadurch hervorgerufenen Lipidperoxidation ⁽⁶⁶⁾, eine Gefäßrelaxation durch erhöhte Synthese und Freisetzung von NO und eine verminderte Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion ⁽⁶⁷⁾.

Die positiven Effekte antioxidativer Substanzen sowie von PAF-Antagonisten auf den I/R-Schaden sind bereits hinreichend bekannt ^(68,69,70). Aufgrund potentieller Nebenwirkungen und hoher Kosten haben solche Substanzen zur Reduktion des Ischämie und Reperfusionsschadens der Leber jedoch noch keinen Einzug in den klinischen Alltag gefunden. Bislang gibt es keine Studie die den Effekt von EGB761 auf Ischämie und Reperfusion der Leber untersucht hat.

Die nachfolgend dargestellte experimentelle Studie basiert auf der Hypothese, dass durch die intravenöse Anwendung von Ginkgo Biloba Extrakt, aufgrund der oben dargestellten Eigenschaften, der Reperfusionsschaden nach normothermer Ischämie der Leber reduziert werden kann.

Zudem erscheint in diesem Zusammenhang eine Untersuchung von HSP70 und EGR-1 sinnvoll, da beide Proteine eng mit der Pathophysiologie des hepatischen I/R-Schadens assoziiert sind und eine bessere Beurteilung des Effektes von EGB761 zulassen.

1.2 Fragestellungen

Mit Hilfe eines Ischämie-modells bei der Ratte soll der Einfluß von Ginkgo Biloba Extrakt (EGB761) auf Ischämie und Reperfusion bei der gesunden und verfetteten Rattenleber unter Berücksichtigung folgender Fragestellungen untersucht werden:

1. Lässt sich durch intravenöse Gabe von EGB761 vor Reperfusion die postischämische Mikrozirkulation in der Leber verbessern?
2. Lässt sich die postischämische Leukozyten-Endotheladhäsion während der Reperfusion durch EGB761 reduzieren?
3. Ermöglicht die intravenöse Gabe von EGB761 vor Reperfusion eine Verminderung des hepatischen Ischämie- und Reperfusionsschadens?
4. Gibt es im Hinblick auf die oben genannten Fragestellungen 1.-3. Unterschiede zwischen gesunden und verfetteten Rattenlebern?
5. Wird die postischämische mRNA-Expression von EGR-1 und HSP70 während der Reperfusion durch die Gabe von EGB761 beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuchsgenehmigung

Die Versuche fanden unter Aufsicht der Versuchsleitung im Chirurgischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gemäß des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998 (BGBl.I S.1106, 1818) statt. Das Amt für Gesundheit erteilte am 26.06.2000 die Genehmigung zur Durchführung dieser Versuche (Aktenzeichen G8151/591-00.33).

2.2 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Als Versuchstiere dienten männliche Lewis-Inzuchtratten aus der Zucht der Charles River Wiga GmbH (Deutschland) mit einem mittleren Körpergewicht von 262 g. Tiere mit Fettleber hatten zum Zeitpunkt des Eingriffs im Mittel ein Gewicht von 350 g. Die Tiere befanden sich mit bis zu 5 anderen Tieren in Käfigen im Tierstall der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Sie waren dort einem Tag/Nachtrhythmus von 12 Stunden, einer Raumtemperatur von 20° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60% ausgesetzt. Zur Ernährung diente das Standardtrockenfutter ssniff R/M-H, extrudiert (ssniff Spezialdiäten GmbH, D-59494 Soest) und Wasser. Zur Induktion einer Fettleber erhielten 50 Lewis-Ratten eine Methionin und Cholin defiziente Spezialdiät (C1063) ⁽⁷¹⁾ der Fa. Altromin über einen Zeitraum von 40 - 60 Tagen.

2.3 Versuchsdurchführung

2.3.1 Narkose

Zur Narkoseeinleitung erhielten die Tiere eine Inhalationsnarkose in einem Glasäthertopf (Äther zur Narkose, Riedel-de Haen GmbH), um zu jedem Zeitpunkt ihre Vitalfunktionen in Form von Atmung und Verhalten beurteilen

zu können. Im Anschluss daran wurden die Fellhaare im Bauch- und Halsbereich mit einem Rasierer entfernt und diese Bereiche sorgfältig desinfiziert (Cutasept F, Bode Chemie, Hamburg). Danach erfolgte die intraperitoneale Injektion von 2 ml Chloralhydrat 4% zur Narkoseerhaltung. Im weiteren Verlauf wurde bei Bedarf während des operativen Eingriffes mit bis zu 2 ml Chloralhydrat 4% nachdosiert.

2.3.2 Operation und intraoperatives Monitoring

Der operative Eingriff erfolgte unter sauberen, aber nicht aseptischen Bedingungen. Hierfür wurden die Versuchstiere auf einer Heizplatte gelagert um eine konstante Körpertemperatur von 37°C zu erhalten. Die Kontrolle der Körpertemperatur erfolgte alle 10 Minuten über eine rektale Messsonde.

Zum Monitoring von arteriellem und zentralvenösem Druck sowie zur EGB761-Applikation und kontinuierlichen Infusion klarer Lösungen (Ringer- oder Isotone Natrium-Chlorid-Lösung) wurden Katheter (Venenkatheter, B. Braun Melsungen AG, 0,5 x 0,9 mm) in die A. carotis und V. jugularis gelegt. Hierzu erfolgte über einen Hautschnitt im lateralen Halsbereich die Darstellung der A. carotis und V. jugularis. Nach vollständiger Präparation beider Gefäße wurden nacheinander die Arterie und Vene getrennt umfahren und nach Vorlage von jeweils zwei Seidenligaturen (Seide 3-0) durch eine Vasotomie mittels Mikroschere eröffnet. Anschließend wurden die Katheter in das jeweilige Gefäß vorsichtig vorgeschoben und in korrekter Lage fixiert.

Die Eröffnung des Abdomens zur Darstellung der Leber erfolgte durch eine mediane Laparotomie und beidseitiger subcostaler Schnitterweiterung. Die Bauchdecke wurde anschließend mittels Haltefäden beidseits fixiert. Nach Verdrängung des Intestinums erfolgte die hilusnahe Darstellung der zu- und abführenden Lebergefäße. Der Gallengang wurde anschließend, zur Dokumentation der Galleproduktion mit einem Venenkatheter (Venenkatheter, B. Braun Melsungen AG, 0,5 x 0,9 mm) kanüliert. Um einer Austrocknung des ausgelagerten Intestinums vorzubeugen wurde der Darm in eine mit Kochsalzlösung (NaCl) getränkte Kompresse gewickelt.

Die Induktion einer 60 minütigen Ischämie des linken und mittleren Leberlappens erfolgte durch Abklemmen des entsprechenden A. hepatica- und Pfortaderastes durch eine Mikroklemme.

Entsprechend den Versuchsgruppen (siehe Kap. 2.4) erfolgte 20 Minuten vor Reperfusion die intravenöse Applikation von EGB761 über einen Zeitraum von 10 Minuten. Die Versuchstiere der Kontrollgruppe erhielten alternativ das gleiche Volumen NaCl.

Nach 60 Minuten warmer Ischämie erfolgte die Reperfusion durch Eröffnung der Mikroklemmen. Entsprechend den Versuchsgruppen wurden die Tiere anschließend entweder intravitalmikroskopischen Untersuchungen zugeführt oder das Abdomen wurde partiell wieder verschlossen. Bei allen Versuchstieren erfolgte im Anschluss an 120 Minuten Reperfusion die Durchführung einer Hepatektomie zur weiteren molekularbiologischen bzw. histomorphologischen Untersuchung.

Alle Versuchstiere verstarben abschließend in Vollnarkose im Rahmen der Organentnahme.

2.3.3 Gabe von EGB 761

Ginkgo Biloba Extrakt EGB761 (Charge DM 1986, Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co, Karlsruhe) wurde entsprechend den Versuchsgruppen 20 Minuten vor Reperfusion intravenös über den liegenden ZVK appliziert. Die gesunden Tiere erhielten 0,2 mg/kg Körpergewicht und die Tiere mit Fettlebern erhielten 0,8 mg/kg Körpergewicht. Hierzu wurde das Extrakt abgewogen und in NaCl-Lösung gelöst, die zuvor mit Natronlauge auf einen pH Wert zwischen 7,2 – 7,4 eingestellt wurde. Die intravenöse Applikation erfolgte langsam über 10 Minuten, um bekannte präparatbedingte Blutdruckabfälle möglichst zu vermeiden

2.4 Versuchsgruppen

Gruppe A (Tab.1):

Intravitalmikroskopischer, histologischer und laborchemischer Vergleich von Kontrolltieren mit und ohne Fettleber zur Verifizierung des Fettlebermodells nach 40-60 Tagen Fütterung der Tiere mit der Methionin- und Cholindefizienten Spezialdiät „C1063“. Die Hepatektomie erfolgte nach Blutentnahme, ohne Ischämie und Reperfusion.

Tab.1: Gruppe A

Gruppe	N	Leberstatus	Ischämie	Therapie
A1	5	Gesund	Nein	Nein / -EGB761
A2	5	Verfettet	Nein	Nein / -EGB761

Gruppe B und C (Tab. 2 und 3):

Intravitalmikroskopische Untersuchungen der Leber nach 60 Minuten warmer Ischämie und Reperfusion, mit (C1,C2) und ohne intravenöse Applikation (B1,B2) von EGB761, bei Versuchstieren mit und ohne Fettleber.

Tab.2: Gruppe B / Ischämie und Reperfusion ohne EGB761- Applikation

Gruppe	N	Leberstatus	Ischämie	Therapie
B1	10	Gesund	60 min	Nein / -EGB761
B2	10	Verfettet	60 min	Nein / -EGB761

Tab.3: Gruppe C / Ischämie und Reperfusion mit EGB761- Applikation

Gruppe	N	Leberstatus	Ischämie	Therapie
C1	10	Gesund	60 min	EGB761
C2	10	Verfettet	60 min	EGB761

Gruppe D (Tab. 4):

Kontrollgruppe zur molekularbiologischen Bestimmung der HSP70 und EGR-1 Basisexpression bei Versuchstieren mit und ohne Fettleber ohne Ischämie und Reperfusion. Keine Intravitalmikroskopie.

Tab.4: Gruppe D / Kontrollgruppe der molekularbiologischen Versuche

Gruppe	N	Leberstatus	Ischämie	Therapie
D1	5	Gesund	Nein	Nein / -EGB761
D2	5	Verfettet	Nein	Nein / -EGB761

Gruppe E und F (Tab. 5 und 6):

Zur Durchführung molekularbiologischer Untersuchungen erfolgte in diesen Gruppen die Hepatektomie nach 60 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion bei Versuchstieren mit und ohne Fettleber. Intravitalmikroskopische Untersuchungen wurden in diesen Gruppen nicht durchgeführt.

Tab.5: Gruppe E / Ischämie und Reperfusion ohne EGB761-Applikation

Gruppe	N	Leberstatus	Ischämie	Therapie
E1	5	Gesund	60 min	Nein / -EGB761
E2	5	Verfettet	60 min	Nein / -EGB761

Tab.6: Gruppe F / Ischämie und Reperfusion mit EGB761-Applikation

Gruppe	n	Leberstatus	Ischämie	Therapie
F1	5	Gesund	60 min	EGB761
F2	5	Verfettet	60 min	EGB761

2.5 Intravitalmikroskopische Untersuchungen

2.5.1 Technischer Aufbau und Durchführung

Nach Ischämie und Reperfusion wurde das Versuchstier rücklings auf einer Wärmeplatte platziert und fixiert. Der durch seine Mobilität und plane Unterflache am besten geeignete linke Leberlappen wurde auf einem mit Coloplast (Coloplast Modelierstreifen A/S, DK-3050 Humleboek, Dänemark) beschichteten Metalllöffel ausgelagert, ohne die Leberperfusion mechanisch einzuschränken. Mit Hilfe der Modelierstreifen ließ sich jeder Leberlappen individuell positionieren (Abb.2).

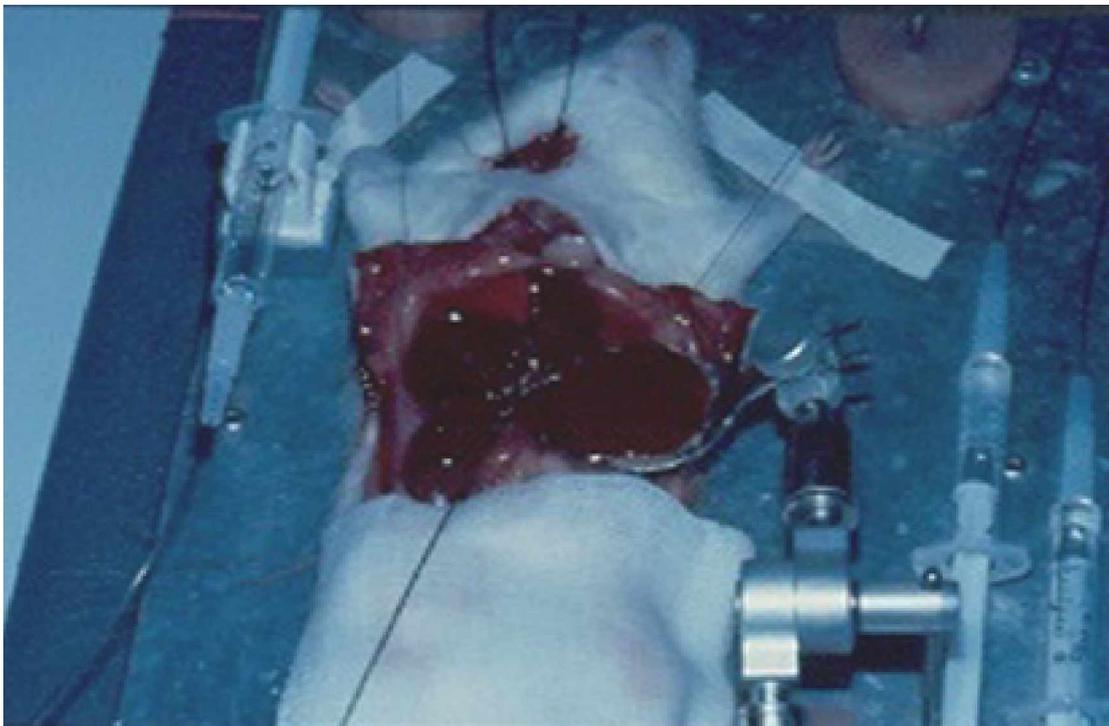


Abb.2: Nahansicht des Versuchstieres auf der Wärmeplatte mit eröffnetem Abdomen und ausgelagertem linken Leberlappen

Die Wärmeplatte ließ sich auf dem Mikroskopiertisch fixieren und in 2 Ebenen verstellen, so dass die zu mikroskopierende Leberoberfläche, im Zusammenspiel mit dem in alle Richtungen beweglichen Löffel, horizontal gelagert werden konnte.

Zur Kontrastverstärkung wurde den Versuchstieren Bisbenzamide (Hoechst 33342), Rhodamin und Fluoresceinthiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) kurz vor Beginn der Intravitalmikroskopie intravenös appliziert. Zur IVM wurde ein Fluoreszenz-Mikroskop der Fa. Olympus (BHMJ Olympus/BH2-RFCA) und eine 100 W Quecksilber (HBO) Lampe verwendet. Zur Mikroskopie wurde die Leber mit einem Deckglas (Deckgläser 18x18mm, Marienfeld) bedeckt. 15 Minuten nach Ischämie und Reperfusion wurde die ausgelagerte Leberoberfläche des linken Leberlappens mäanderförmig abgefahren. Zur Beurteilung der postischämischen sinusoidalen Perfusion sowie der Leukozytenadhäsion erfolgten Videoaufzeichnungen (Panasonic Videorekorder, Modell AG-7350) von 8 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern für 20 Sekunden in 10 und 20facher Vergrößerung. Zur Beurteilung der Perfusionsverhältnisse wurde ein grünes Filtersystem (450-490/>520nm), zur Beurteilung der Leukozytenadhäsion ein rotes Filtersystem (530–560/>580 nm) und für die Bisbenzamide-Färbung ein blauer Farbfilter (330-390/>430) angewendet. Zusätzlich wurden die alle Momentaufnahmen in 50, 100 und 200facher Vergrößerung mit allen 3 Farbfiltern mit Hilfe der Bildanalyse-Software Optimas 6.5 erstellt (Fa. Weiss-Imaging, München).

2.5.2 Angewandte Fluoreszenzfarbstoffe zur IVM

Zur Kontrastierung der Leber nach Ischämie und Reperfusion wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe appliziert:

Zur Vitalitätsbeurteilung reperfundierter Areale durch Markierung der Nuklei wurde Bisbenzamide H33342 ⁽⁷²⁾ (1,5 ml/kg Körpergewicht) angewendet.

Rhodamin 6G ⁽⁷³⁾ (0,2 ml/kg Körpergewicht) diente zur Markierung von Leukozyten.

Die Applikation von Fluoresceinthiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) ⁽⁷²⁾ (0,08 ml/kg Körpergewicht) erfolgte zur Darstellung der sinusoidalen Perfusion.

2.5.3 Auswertung der IVM

Alle intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden auf Video aufgezeichnet und retrospektiv qualitativ und quantitativ ausgewertet. Die Quantifizierung der hepatischen Mikrozirkulation erfolgte durch Auszählung perfundierter Sinusoide innerhalb eines definierten Azinus. Die sinusoidale Perfusionsrate wurde definiert als prozentualer Anteil perfundierter Sinusoide von der Gesamtzahl aller Sinusoide innerhalb des Azinus (Abb.3) ⁽⁷⁴⁾. Die Quantifizierung der sinusoidalen Perfusion erfolgte getrennt innerhalb der perizentralen, midzonalen und periportalen Zone eines Azinus.

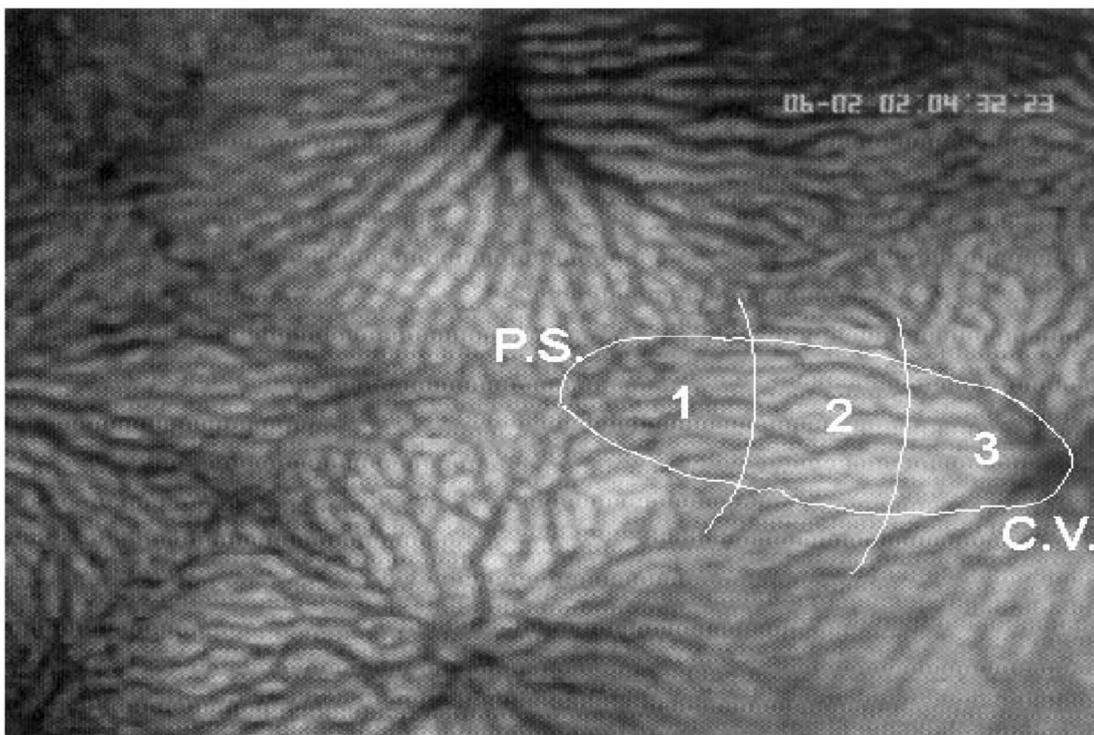


Abb.3: Darstellung eines Leberazinus mit seinen drei Zonen anhand eines intravitalmikroskopischen Bildes; P.S.: Portalfeld, C.V.: Zentralvene, 1: periportale Zone, 2: midzonale Zone, 3: perizentrale Zone.

Die Quantifizierung adhärenter Leukozyten erfolgte durch Auszählung stationärer, rhodaminmarkierter Zellen pro Gesichtsfeld über einen Zeitraum von 20 Sekunden. Rollende oder fließende Leukozyten wurden bei der Quantifizierung adhärenter Leukozyten nicht berücksichtigt.

2.6 Reflexspektrophotometrie

Die Darstellung der hepatischen Sauerstoffsättigung während Ischämie und Reperfusion erfolgte durch Anwendung der diffusen Reflexspektrophotometrie. Hierzu wurde die Sonde eines von Knoefel et al. modifizierten Reflexspektrophotometers ⁽⁷⁵⁾ direkt auf den linken Leberlappen gehalten und 3 mal die Absorbtion (zwischen 400 und 820 nm) gemessen. Die Bestimmung der Organoxygenierung erlaubt indirekt Rückschlüsse auf die Organperfusion. Die Oxygenierung des linken Leberlappens errechnete sich aus dem Mittelwert der drei Messungen. Die hepatische Sauerstoffsättigung wurde jeweils vor Ischämie (Ausgangswert), direkt nach Ischämiebeginn ('0), kurz vor Reperfusion nach 60 Min. Ischämie ('60), direkt nach Beginn der Reperfusion ('0) und nach 120 Minuten Reperfusion ('120). Bei allen Tieren nahm die Sauerstoffsättigung gleichermaßen nach Ischämiebeginn ab und kehrte nach 2 Stunden Reperfusion wieder auf Ausgangswerte zurück.

Zwischen den einzelnen Versuchstieren fand sich reflexspektrophotometrisch kein signifikanter Unterschied, so dass an dieser Stelle exemplarisch die hepatische Sauerstoffsättigungskurve während Ischämie und Reperfusion anhand der Versuchsgruppen B1 und C1 dargestellt ist (Abb.4).

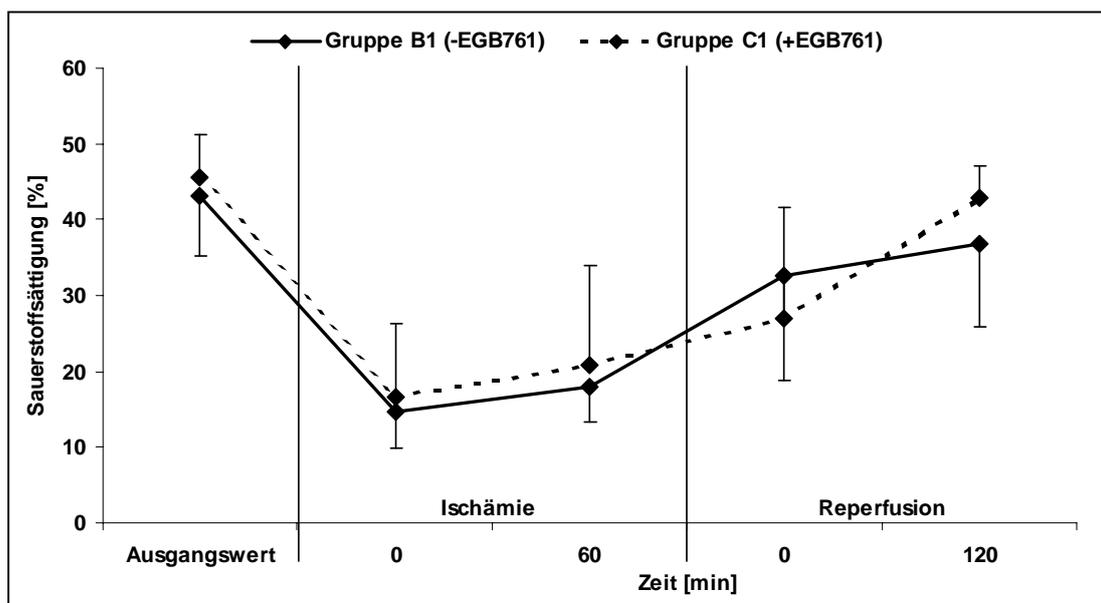


Abb.4: Hepatische Sauerstoffsättigung des linken Leberlappens während Ischämie und Reperfusion

2.7 Laborchemische Analysen

Zur Bestimmung der AST, ALT und GLDH wurden am Ende des Versuches nach 120Min. Reperfusion Blutproben aus dem liegenden ZVK oder direkt aus der V. cava abgenommen. Die Blutbestimmungen wurden im Labor der Klinischen Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Um manipulationsbedingte Enzymerhöhungen auszuschließen, erfolgten die laborchemischen Analysen nur bei Versuchstieren der Gruppen D-F.

2.8 Histologie

Anhand der Histologie sollte der Nekrose- und Verfettungsgrad der Leber beurteilt werden. Zur Erstellung der histologischen Präparate wurden nach Versuchende Teile der Leber in 3,5%iger Formalinlösung asserviert. Die Weiterverarbeitung der Proben erfolgte in einem Autotechnikon (The Technikon Company, NY, USA) und in einer Ausgussstation (PSI, Basel, Schweiz) zur Paraffinendeinbettung. An einem Schlittenmikrotom (Jung AG, Heidelberg) wurden die Proben 3µm-dick geschnitten. Es folgte eine HE-Färbung für Paraffin-Schnitte nach folgendem Protokoll:

Zuerst wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten mit Rotihistol (Rotihistol, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) entparaffiniert. Dem folgte eine absteigende Alkoholreihe bestehend aus 2 mal 2 Minuten 100%igem Ethanol, 2 mal 2 Minuten 96%igem Ethanol und 2 mal 2 Minuten 80%igem Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte kurz in Aqua dest. getränkt. Dem folgte die Zellkernfärbung in Hämalaun (Mayer`s Hematoxylin Solution, SIGMA) für 2 Minuten. Zum Bläuen der Kerne wurden die Paraffinschnitte für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert. Dann fand die Plasmafärbung in 0,1%igem Eosin (Eosin G gelblich, Merck KGaA, Darmstadt) für 3 Minuten statt. Nach einer absteigenden Alkoholreihe mit 2 Minuten 80%igem Ethanol, 2 mal 2 Minuten 96%igem Ethanol und 2 mal 2 Minuten 80%igem Ethanol, folgte eine 2 mal 2minütige Behandlung mit Rotihistol. Abschließend wurden die Präparate mit Entellan (Entellan, Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckelt.

Fettfärbung nach Sudan III

Bei der Fettfärbung nach Sudan III handelt es sich um eine flotierende Färbung zur Darstellung des Fettgehalts der Leber. Mit Hilfe des Kryotoms (Microm HM 505E) wurden 8-10µm dicke Gefrierschnitte der jeweiligen Gewebeproben hergestellt, die man in -21°C kaltem Aqua dest. schwimmen ließ. Dann wurden die Schnitte für 3 Minuten in 50%iges Ethanol gegeben und anschließend in Sudanlösung (0,2-0,5g Sudan III (SIGMA) mit 100 ml 70%igem Ethanol übergossen und für 4-6 Stunden bei 60°C für 15-30 Minuten auf einem Schüttler (Heidolph Rotamax 120) inkubiert. Dem folgte eine Kernfärbung mit Hämalaun für 3-5 Minuten, kurzes Waschen in Aqua dest. und 10 Minuten wässern in H₂O. Abschließend wurden die Präparate mit Histogel (Aquatex, Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckelt.

2.9 Molekularbiologische Untersuchungen zur Bestimmung der HSP-70 und EGR-1 mRNA-Expression

2.9.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde der Rneasy Midi Kit (Quiagen GmbH, Hilden) verwendet. Für jede Isolation wurden 20–250mg gefrorenes Lebergewebe eingesetzt, welches zuvor bei -80°C gelagert wurde. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 4000 Umdrehungen/Minute und Raumtemperatur statt. Pro Leberprobe und Isolation wurden 4ml RLT-Puffer benötigt, dem vor Isolationsbeginn $40\mu\text{l}$ β -Mercaptoethanol zugefügt wurde.

0,5 ml des Puffers wurden zusammen mit dem Gewebestück homogenisiert und dann mit dem restlichen Puffer in ein 15ml Röhrchen (Disposable Conical Tubes, NUNC Brand Products) gegeben und 10 Minuten zentrifugiert (Rotanta / RP Zentrifuge, Firma Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde mit einer Pipette vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt, 4ml 70%iges Ethanol hinzugefügt und kräftig geschüttelt bzw. kurz gevortext (Minishaker, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe). Dann wurde ca. die Hälfte der Probe in ein im Kit beinhaltetes Filterröhrchen (Rneasy Midi Spin Column) pipettiert und 5 min zentrifugiert. Die filtrierte Flüssigkeit konnte verworfen werden und anschließend die zweite Hälfte der Probe auf den Filter pipettiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert werden. Wieder wurde das Filtrat verworfen, 4ml RW1-Puffer auf den Filter gegeben und 5 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde entsorgt und das Filterröhrchen mit 2,5ml RPE-Puffer gewaschen, um das Röhrchen dann für 2 Minuten zu zentrifugieren. Nach Entfernung der filtrierten Flüssigkeit, wurden nochmals mit 2,5ml RPE-Puffer gewaschen und diesmal 5 Minuten zentrifugiert, um die Membran des Filterröhrchens zu trocknen. Im Anschluß wurde der Filter aus dem Röhrchen entfernt und in ein neues Röhrchen (collection tube) überführt. Jetzt wurden $200\mu\text{l}$ RNase freies Wasser direkt auf die Filtermembran pipettiert, das Röhrchen wurde verschlossen und für 3 Minuten stehen gelassen. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten. Ohne Verwerfen des Zentrifugats, wurde nochmals $200\mu\text{l}$ RNase freies Wasser auf die Filtermembran pipet-

tiert, 3 Minuten abgewartet und dann zentrifugiert. Das Zentrifugat mit der eluierten RNA wurde in auf Eis stehende Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln) übertragen und anschließend der RNA-Gehalt photometrisch gemessen. Hierzu wurde zuerst ein 0-Wert mit sterilem Aqua ad iniectabilia (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) bestimmt und anschließend die Extinktion der Proben in 60facher Verdünnung gemessen. Aus den Extinktionswerten ließ sich dann die Konzentration der RNA berechnen.

2.9.2 Gelelektrophorese der isolierten RNA

Für die Gelelektrophorese wurden im Vorfeld 3 Puffer angesetzt. Zur Herstellung des Elektrophoresepuffers (running buffer=RB) 10 x konzentriert, wurden 40g MOPS (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 4,05g Natrium Acetat (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 20ml 0,5m EDTA (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) in 1 Liter RNase freiem Wasser gelöst und mit 2m NaOH (Merck Eurolab GmbH, Hamburg) auf den pH-Wert 7,0 eingestellt. Die Flasche wurde lichtgeschützt bei +4°C gelagert. Für den RB 1 x konzentriert wurden 100ml 10 x RB mit 900ml RNase freiem Wasser verdünnt. Der Probenpuffer (Samplebuffer=SB) wurde wie folgt angesetzt: 500µl deionisiertes Formamid (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen), 169µl Formaldehyd (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 100µl 10 x RB wurden zusammenpipettiert und bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrt. Für den Ladepuffer (Loading Buffer=LB) wurden 5ml 10 x RB, 3ml RNase freies Wasser, 1,5g Ficoll 400 (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 10mg Bromphenolblau (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) 1 Stunde zusammen bei 37°C gelöst und anschließend lichtgeschützt bei -20°C gelagert. Die Gelelektrophoresekammer, das Tray und die Kämme (Sub-Cell GT, BIO RAD Laboratories GmbH, München) wurden zur RNAsen-Inaktivierung für 20 Minuten mit 0,1%igem DEPC (Amersham Pharmacia, Freiburg) behandelt. Die Herstellung eines 1%igen Agarose-Gels fand folgendermaßen statt: zuerst wurden 2g Agarose (NuSieve 3:1 Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Hess.Oldendorf) in einem sterilen 500ml Erlenmeyer-

kolben abgewogen. In 176ml RNAse freiem Wasser gelöst wurde die Flüssigkeit mehrmals in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich alles gut gelöst hatte. Während man die Flüssigkeit auf ca. 70°C abkühlen ließ, wurden 20ml Formaldehyd, 24ml 10 x RB und 5µl 1%iges Ethidiumbromid (Merck, Eurolab GmbH, Hamburg) unter dem Abzug zu der abgekühlten Flüssigkeit gegeben. Die gesamte Flüssigkeit wurde durch mehrmaliges Schwenken durchmischt und luftblasenfrei in das Tray gegossen, um dann unter dem Abzug für ½ bis 1 Stunde zu polymerisieren. Pro Probe wurde 10µg RNA zusammen mit 7,5µl SB in ein Reaktionsgefäß pipettiert, durchmischt und für 10 Minuten bei 65°C im Thermoblock (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln) erhitzt. Anschließend wurden die Proben für 2-3 Minuten auf Eis gekühlt und bei 10000 rpm und +4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln). Jede Probe wurde dann mit 3µl LB gemischt, bei gleichen Zentrifugeneinstellungen kurz anzentrifugiert und auf Eis gelagert. Nun wurde das erkaltete Gel in der mit 1 x RB gefüllten Gelkammer platziert und die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Kammer wurde an das Power Pack P25 (Biometra, biometrische Analytik GmbH, Göttingen) angeschlossen und eine Spannung von 80V für 1½ -1¾ Stunden angelegt. Im Anschluß daran wurde das Gel unter UV-Licht im Gel-Printer (MWG-Biotech GmbH, Ebersberg) betrachtet und zur Dokumentation abfotografiert. Das Gel wurde auf die entsprechende Größe zurechtgeschnitten, für 15 Minuten in Aqua ad iniectabilia und für 2 mal 15 Minuten in 20 x SSC-Puffer (GIBCO BRL, Eggenstein) gewaschen.

2.9.3 Northern Blot

Als Vorbereitung für den Northern Blot wurde eine Glasplatte quer über eine flache Plastikwanne gelegt. 2 Streifen Whatmanpapier (Whatman Chromatography Paper, Merck Eurolab GmbH, Hamburg) wurden so zurechtgeschnitten, das sie eine doppelte Filterpapierbrücke über der Glasplatte bildeten und an beiden Enden den Wannensboden berührten. Dann wurde die Plastikwanne mit 20 x SSC Puffer aufgefüllt und sichergestellt, dass das

Whatmanpapier an beiden Seiten in den Puffer eintauchte. Luftblasen wurden beseitigt. Das Gel wurde mit den Taschenöffnungen nach unten mittig auf die Glasplatte gelegt und mit Parafilm (American National Can TM, Chicago) abgeklebt. Das Filterpapier (Filter Hybond-N+, amersham pharmacia, Freiburg) wurde auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und luftblasenfrei auf dem Gel platziert. 2 Whatmanpapiere derselben Größe wurden in 2fach SSC Puffer getränkt, auf den Filter gelegt und mit einem Stapel Zellstoff und einer weiteren Glasplatte bedeckt. Zum Schluß wurde ein 750 g schweres Gewicht auf die obere Glasplatte gestellt (Abb.5).

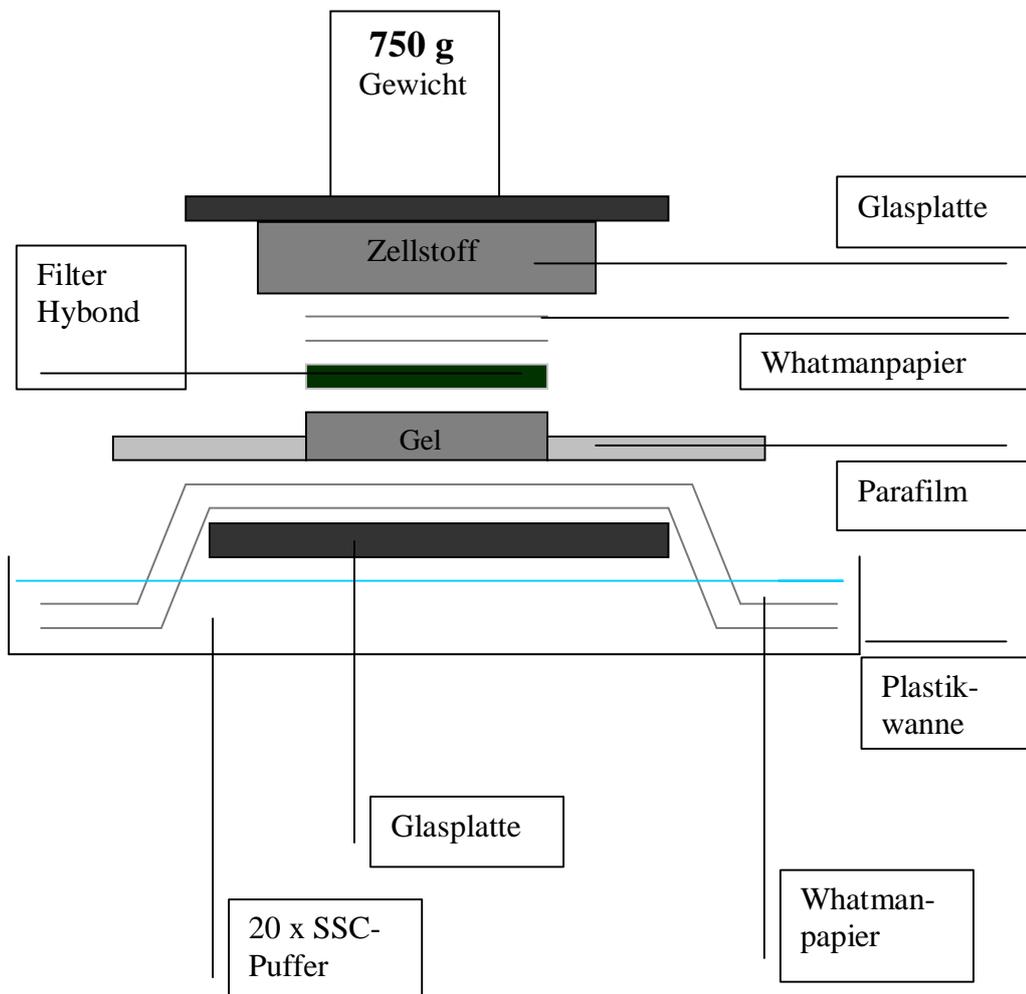


Abbildung 5: Versuchsaufbau des Northern Blots

Nach 24 Stunden wurde der Filter entnommen und die RNA im UV-Crosslinker (Hofer) fixiert. Im Anschluß wurden die 18S und 28S Untereinheiten der RNA unter UV-Licht im Gelprinter auf dem Filter markiert und abfotografiert. Bis zum weiteren Gebrauch wurde der Filter in 20 x SSC Puffer getränkt in Saranfolie (Dow) eingewickelt und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.9.4 Primer

Die Sequenz der für die Hybridisierung benötigten Primer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) für Early Growth Response Gene-1 (EGR-1) lautete 5`-AAC ACT TTG TGG CCT GAA CC- 3` für den Vorwärts-Primer und 5`-AGG TCT CCC TGT TGT TGT GG- 3` für den Rückwärts-Primer. Für Heat Shock Protein-70 (HSP70) verwendeten wir Primer (MWG-Biotech AG, Ebersberg) mit der Sequenz 5`-CAC AAG AAG GAC ATC AGC CA- 3` (Vorwärts) und einen Rückwärts-Primer mit der Sequenz 5`-TGA TGC TCT TGT TCA GGT CG- 3`.

2.9.5 Herstellung der Hybridisierungssonden

Die Herstellung der Sonden erfolgte in 4 Schritten. Als Erstes wurde eine RT-PCR zur Synthese von cDNA durchgeführt. Verwendet wurde der 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Folgende Komponenten wurden in einem sterilem 0,5ml Safe-Lock Reaktionsgefäß (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln) gemischt: 2,0µl 10 x Reaction Buffer, 4,0µl 25mM MgCl₂, 2,0µl Deoxynucleotide Mix, 2,0µl Oligo-p(dT)₁₅ Primer, 1,0µl RNase Inhibitor, 0,8µl AMV Reverse Transcriptase und 8,2µl RNA. Nach kurzer Durchmischung mit dem Minishaker wurde das Reaktionsgefäß im T3 Thermocycler (Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) platziert. Das Programm sah folgendermaßen aus: 10 Minuten bei 25°C, 1 Stunde bei 42°C und 5 Minuten bei 99°C. Dem folgte eine PCR mit dem entsprechenden Primer (s.o.) zu Herstellung einer Hybridisierungssonde. Hierzu wurde 40,75µl Aqua dest., 5µl 10 x Puffer, 1µl NTP (PCR Nucleotide Mix, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 1µl cDNA, 1µl Rück-

wärts-Primer, 1µl Vorwärts-Primer und 0,25µl Taq DNA Polymerase zusammen in ein steriles 0,5ml Reaktionsgefäß pipettiert und kurz gevortext. Anschließend erfolgte im Thermocycler ein initialer Schritt von 3 Minuten bei 95°C, dann vierzig Zyklen bestehend aus jeweils 1 Minute bei 95°C, 1 Minute 20 Sekunden bei 60°C und 2 Minuten bei 72°C, und abschließend 10 Minuten bei 72°C. Zur Kontrolle wurde zuerst ein DNA-Gel hergestellt: 2,97g Agarose (NuSieve 3:1 Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Hess.Oldendorf) und 150ml TBE-Puffer wurden zusammen erhitzt. Nach dem Zusatz von 8µl Ethidiumbromid ließ man die Flüssigkeit auf 50-60°C abkühlen, um dann das Gel zu gießen. Zur Kontrolle wurden 10µl des PCR-Produkts, 10µl der Kontrolle und 3µl DNA Marker (DNA Molecular Weight Marker VIII, 19-1114 bp, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in die Geltaschen pipettiert und für 30 Minuten 200V Spannung angelegt. Die dritte PCR fand statt, um die Sonde mit dem Farbstoff Digoxigenin zu markieren. Verwendet wurde der PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). 32,25µl Aqua dest., 5µl PCR Puffer mit MgCl₂ 10 x konzentriert, 5µl PCR DIG Probe Synthesis Mix 10 x konzentriert, 2µl Primer antisense, 5µl spez. cDNA (Sonde) und 0,75µl Enzym-Mix, Expand High Fidelity wurden zusammenpipettiert und kurz durchmischt, um dann folgendes PCR-Programm zu durchlaufen: 3 Minuten bei 95°C, 40 Zyklen mit je 1 Minute bei 95°C, 1 Minute 20 Sekunden bei 59°C und 2 Minuten bei 72°C, und schließlich 10 Minuten bei 72°C. Zur Kontrolle wurde ein Gel mit 5µl des DIG-PCR-Produkts, 5µl der Kontrolle und 2µl des DNA-Markers hergestellt. Als letzter Schritt erfolgte die Aufreinigung des DIG-PCR-Produkts unter Anwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen GmbH, Hilden). 45µl des DIG-PCR-Produkts wurde in einem Safe-Lock Tube 1,5ml mit 225µl Puffer PB vermischt. Ein „spin column“ (Filterröhrechen) wurde in einem 2ml collection tube platziert und die Probe hinzugegeben. Anschließend wurde es 30-60 Sekunden bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und 0,75ml Puffer PE in das Filterröhrechen pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen, wurde die filtrierte Flüssigkeit entsorgt und 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Dann wurde das Filterröhrechen in eine neues 1,5ml „microfuge tube“ platziert, 50µl Wasser hinzugegeben und 1 Minute bei 14000 r/m zentrifugiert. Im

Kontollgel wurde aufgereinigte und nicht aufgereinigte DNA miteinander verglichen. Die aufgereinigte Sonde wurde schließlich in 10ml DIG Easy Hyb verdünnt und bei -20°C eingefroren.

2.9.6 Hybridisierung

Der Filter wurde mit der RNA-Seite nach innen in einem Hybridisierungsröhrchen mit 10ml Hybridisierungspuffer (DIG Easy Hyb, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) für 1 Stunde bei 50°C im Hybridisierungsofen (Hybridization Ofen / Shaker, amersham pharmacia, Freiburg) praehybridisiert. In der Zwischenzeit wurde die bei -20°C gelagerte Hybridisierungssonde bei 68°C für 10 Minuten im Wasserbad erhitzt. Nach 1 Stunde Praehybridisierung wurde der Praehybridisierungspuffer verworfen, die aufgetaute Sonde zu dem Filter gegeben und der Filter bei 50°C über Nacht hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Sonde erneut bei -20°C eingefroren.

2.9.7 Nachweis der markierten RNA

Für die Posthybridisierung wurde das DIG Wash and Block Buffer Set (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet. Vor Beginn wurden die benötigten Lösungen folgendermaßen angesetzt: Wash Solution 2 x konzentriert wurde hergestellt, indem 0,25g SDS (Lauryl Sulfate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) und 25ml 20 x SSC Puffer mit Wasser auf 250ml aufgefüllt wurde. Bei der Wash Solution 0,5 x konzentriert wurden 0,25g SDS und 6,25ml 20 x SSC Puffer mit Wasser auf 400ml aufgefüllt. 40ml Washing Buffer des DIG Wash and Block Buffer Sets und 360ml Wasser ergaben den benötigten Washing Buffer, während die Blocking Solution sich aus 15ml Blocking Solution des Sets, 13,5ml Maleic Acid Buffer des Sets und 121,5ml Wasser zusammensetzte. Zur Herstellung des Detection Buffers wurden 5ml Detection Buffer des Sets mit 45ml Wasser vermischt. Zur Posthybridisierung wurde der Filter in ein kleines Plastischälchen gelegt. Während des gesamten Wasch- und Detektionsvorgangs befand sich das Schälchen auf einem

Wippschüttler (neoLab Migge Laborbedarfbetriebs GmbH). Zu Beginn wurde der Filter 2 mal 15 Minuten in Wash Solution 2 x konzentriert gewaschen, dann 2 mal 15 Minuten in Wash Solution 0,5 x konzentriert, die zuvor auf 68°C erwärmt worden war. Dann folgte 1 Minute Washing Buffer, in dessen Anschluss das Schälchen gewechselt und der Filter 60 Minuten mit 100ml der Blocking Solution behandelt wurde. In dieser Zeit wurde 2,5µl des Antikörpers (Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit 50ml Blocking Solution vermischt. Anschließend wurde der Filter 30 Minuten in der Blocking Solution mit Antikörper, dann 2 x 15 Minuten in Washing Buffer und 2 Minuten in Detection Buffer gewaschen. Der Filter wurde auf eine Glasplatte gelegt und mit CDP-Star (CDP-Star, ready-to-use, Roche) beträufelt. Nach 5 Minuten wurde er mit Saranfolie abgedeckt und im Imager belichtet. Zu Versuchsende konnte der Filter entweder in 20 x SSC getränkt im Kühlschrank aufbewahrt werden oder er wurde 2 mal 15 Minuten mit TE-Puffer 1 x konzentriert (10ml Tris-EDTA-Puffer, Sigma + 990ml Wasser) ausgekocht und für eine neue Hybridisierung verwendet.

2.10 Statistische Auswertung

Die Darstellung der erhobenen Werte erfolgte als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD).

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Student's t-Test für unabhängige Stichproben. Bei $p < 0,05$ wurden die Unterschiede als statistisch signifikant erachtet.

Die graphische Darstellung der quantitativen Northern Blot Analyse für HSP-70 und EGR-1 erfolgte als relativer Anstieg (fold increase) gegenüber der Kontrollgruppe die als 1 definiert wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Histomorphologie verfetteter Rattenlebern

Zur histologischen Verifizierung des Fettlebermodells wurden HE- und Sudan III-gefärbte Gewebsschnitte angefertigt.

Abb. 6 und 7 zeigen exemplarisch die makrovesikuläre Verfettung der Leber nach Verfütterung der Methionin- und Cholinfreien Spezialdiät (C1063). Der Verfettungsgrad der untersuchten Rattenlebern betrug mindestens 30%.

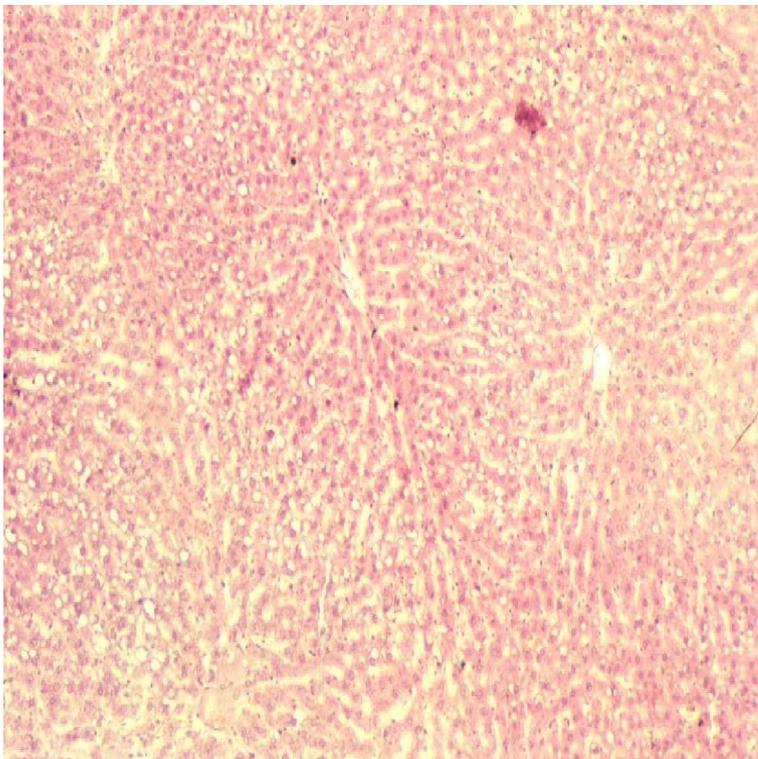


Abb.6: HE-Färbung einer makrovesikulär verfetteten Leber. 10 fache Vergrößerung

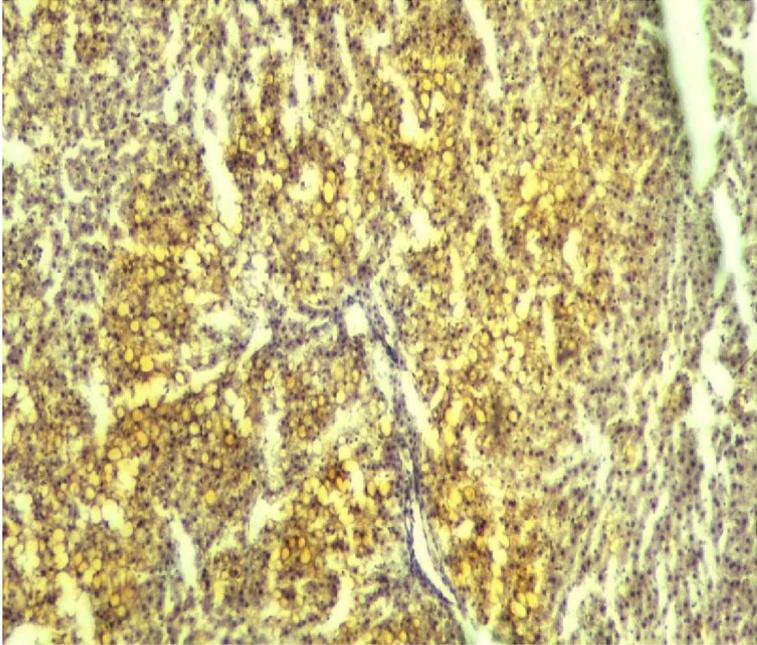


Abb.7: Sudan-III Färbung einer Fettleber. Die bräunlich gefärbten Areale entsprechen den Fettdepots. 10fache Vergrößerung

3.2 Intravitalmikroskopische Untersuchungen nach I/R bei Versuchstieren mit gesunder Leber

Die qualitative und quantitative Beurteilung der postischämischen Mikrozirkulation erfolgte durch Auswertung des mit FITC-Dextran- und Bisbenzamide-Kontrastverstärkten Bildmaterials.

Abb. 8 zeigt exemplarisch die qualitative Darstellung eines azinären Perfusionsdefektes, im Sinne eines „no-reflow“-Phänomens in der frühen Reperfusionphase (15-45 Min.).

In Abb. 8a erkennt man den Perfusionsdefekt anhand der verminderten bzw. Nichtkontrastierung der hepatischen Sinusoide durch FITC-Dextran. Weiterhin lässt sich an anderer Stelle durch den Austritt von FITC-Dextran in das Interstitium eine I/R-bedingte Schädigung des sinusoidalen Endothels vermuten.

In der Bisbenzamide-gefärbten Darstellung des korrespondierenden Azinus zeigt sich der Perfusionsausfall durch eine Nichtanfärbung der Hepatozyten-Nuclei (Abb 8b).

Die Quantifizierung der Mikrozirkulation sowie der Leukozytenadhärenz erfolgte durch „Offline“-Analyse der Videoaufzeichnungen. Beurteilt wurden je 10 Gesichtsfelder mit 1-3 Leberazini pro Beobachtungszeitpunkt.

In der frühen Reperfusionphase nach 60 Minuten Ischämie zeigte sich bei allen Versuchsgruppen (Ischämie und Reperfusion mit und ohne EGB761-Applikation) zunächst eine deutliche Verminderung der sinusoidalen Perfusionsrate gegenüber den Versuchstieren der Kontrollgruppen A1 (Tiere ohne Fettleber), die ohne Ischämie und Reperfusion und ohne die Applikation von EGB761 eine nahezu 100%ige Perfusionsrate der betrachteten Azini aufwiesen. Hinsichtlich der azinären Zonen zeigten sich in den Kontrollgruppen keine Perfusionsunterschiede.

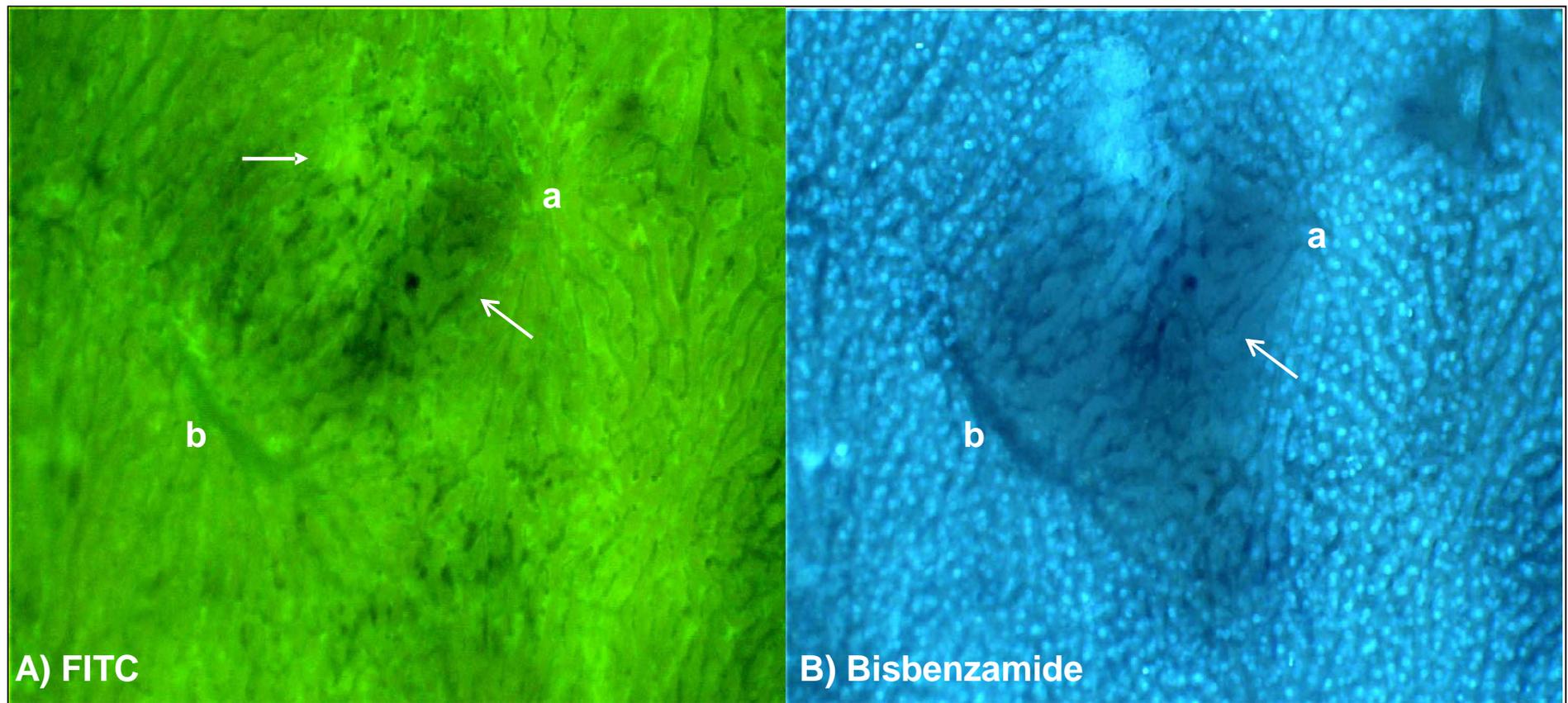


Abb. 8: Perfusionsdefekt in der frühen Reperfusionphase nach 60 Min. warmer Ischämie. (A) Hepatischer Azinus nach Kontrastverstärkung durch FITC-Dextran. (B) Korrespondierender Azinus mit durch Bisbenzamide-angefärbten Hepatozyten. Sinusoidales Perfusionsversagen wird charakterisiert durch Austritt des fluoreszierenden Farbstoffes (ε) oder durch weniger kontrastierte Sinusoide (Ū) und Nichtanfärben der Hepatozyten mit Bisbenzamide (Ū) entlang der nicht perfundierten Sinusoide. (a) terminaler Pfortaderast, (b) postsinusoidale Vene.

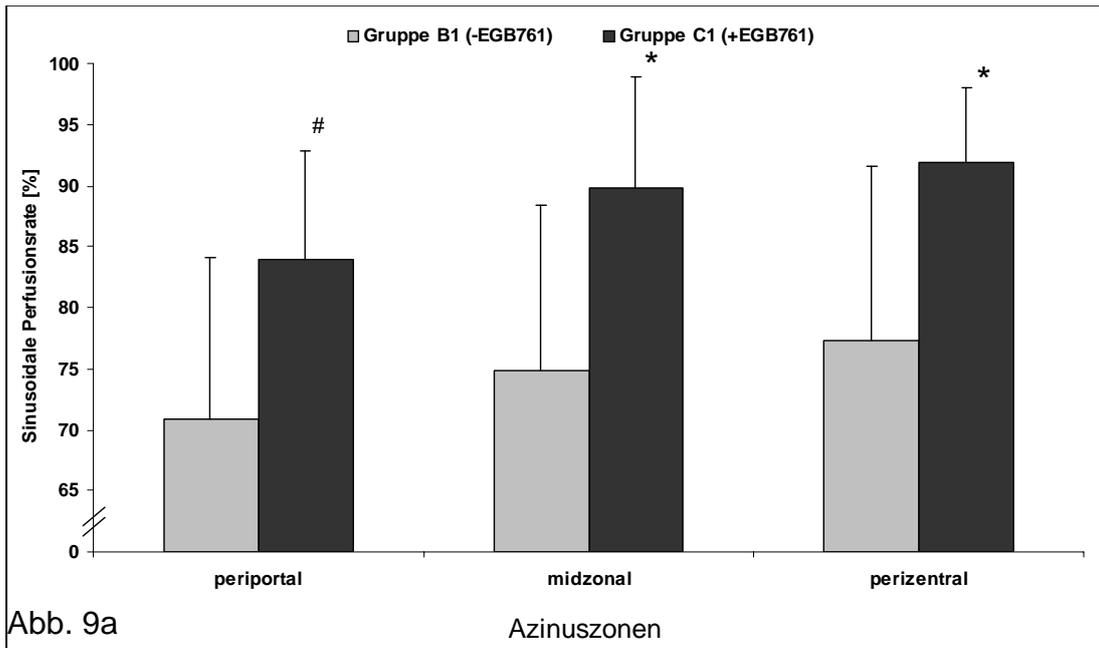
3.2.1 EGB 761 verbessert die postischämische sinusoidale Perfusion gesunder Lebern

Die quantitative Analyse der postischämischen sinusoidalen Perfusion nach 60 Minuten Ischämie des linken Leberlappens ergab eine signifikante Verbesserung der sinusoidalen Perfusionsrate nach EGB761-Applikation vor Reperfusion.

In der frühen Reperfusionsphase (15 min nach Reperfusion) zeigt sich eine signifikant bessere sinusoidale Perfusionsrate (periportal/ midzonal/ perizentral) von 84%/ 89,8%/ 91,9% in Gruppe C1 (Ischämie und Reperfusion mit EGB 761-Applikation bei gesundem Leberstatus) gegenüber Gruppe B1 (Ischämie und Reperfusion ohne EGB 761-Applikation bei gesundem Leberstatus) mit 70,9%/ 74,9%/ 77,3% (Abb. 9a).

Im weiteren Verlauf nach 90 min Reperfusion findet sich in beiden Gruppen eine gleichmäßige Perfusionssteigerung in allen drei azinären Zonen, mit einer sinusoidalen Perfusionsrate (periportal/ midzonal/ perizentral) von 88%/ 92,2%/ 94,6% in Gruppe C1 gegenüber Gruppe B1 mit 82,1%/ 87,6%/ 89,3% (Abb. 9b). Auch nach 90 Minuten Reperfusion zeigt sich gegenüber Gruppe B1 eine signifikant bessere sinusoidale Perfusionsrate in der perizentralen Zone nach EGB761-Gabe.

Frühe Reperfusionphase



Späte Reperfusionphase

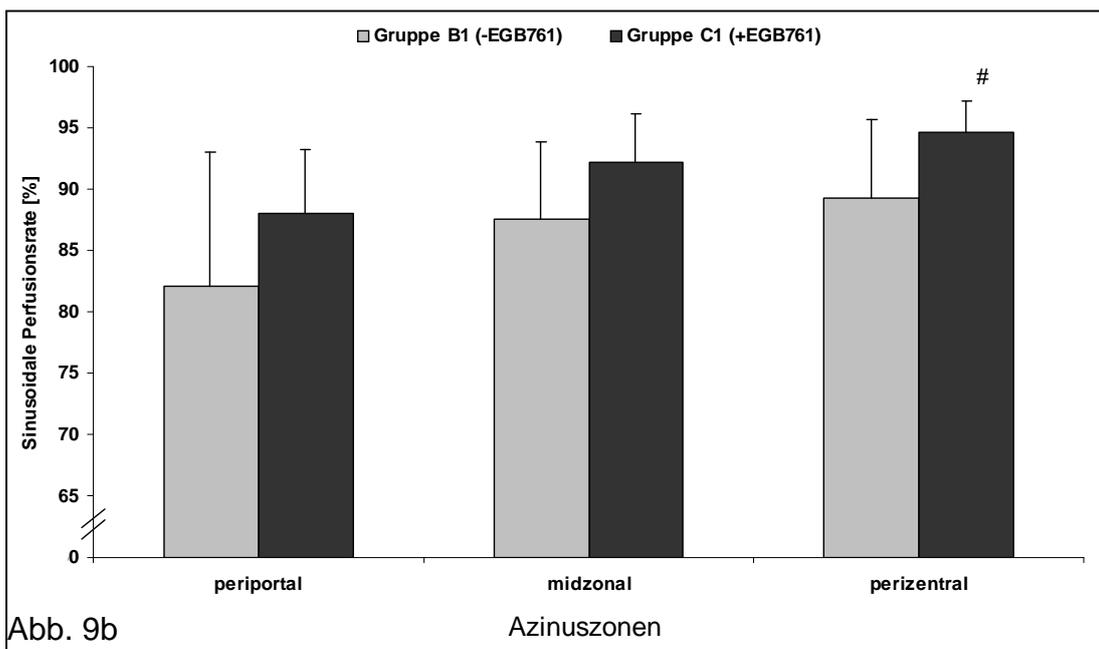


Abb.9: mittlere sinusoidale Perfusionsrate nach 60 min. Ischämie und 15 Minuten (Abb. 9a) bzw. 90 Minuten (Abb. 9b) Reperfusion. Durch intravenöse EGB761-Applikation vor Reperfusion lässt sich die sinusoidale Perfusionsrate nach Ischämie und Reperfusion signifikant verbessern. [#] $p < 0.05$, ^{*} $p < 0.01$, Gruppe B1 vs C1; t-Test

3.2.2 EGB 761 vermindert die postischämische Leukozytenadhäsion in gesunden Lebern

Die Quantifizierung Rhodaminmarkierter, adhärenter Leukozyten erfolgte über einen Zeitraum von 20 Sekunden pro Gesichtsfeld.

Abb. 10 zeigt exemplarisch die intravitalmikroskopische Darstellung der postischämischen Leukozytenadhäsion nach 90 Minuten Reperfusion. Deutlich sichtbar ist die verminderte Anzahl adhärenter Leukozyten nach EGB761-Applikation (Abb 10).

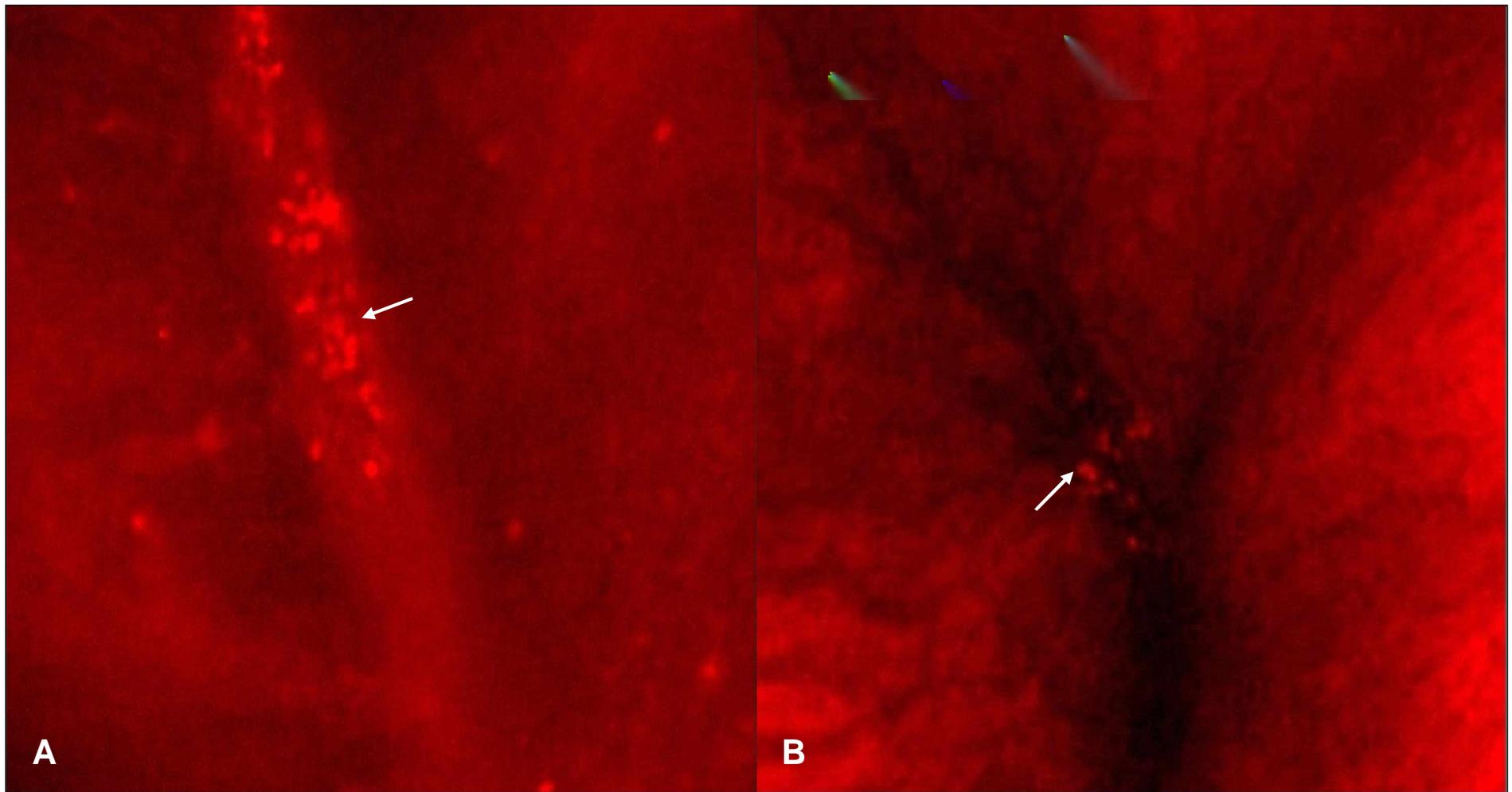


Abb.10: Sinusoidale Leukozytenadhäsion nach 60 Min. Ischämie und 90 Min. Reperfusion. A) ohne EGB761-Applikation, B) mit EGB761-Applikation vor Reperfusion, bei 20facher Vergrößerung. EGB761 führt zu einer signifikanten Reduktion adhärenter Leukozyten nach Ischämie und Reperfusion.

Die Quantifizierung permanent adhärenter Leukozyten nach I/R ergab eine signifikante Reduktion ($p < 0,01$) der postischämischen Leukozytenadhärenz nach EGB761-Applikation (Abb. 11).

So fanden sich in Gruppe B1 (Ischämie und Reperfusion ohne EGB761-Applikation bei gesundem Leberstatus) nach 15 min Reperfusion durchschnittlich $13,79 \pm 4,84$ adhärenter Leukozyten pro Gesichtsfeld, gegenüber $6,48 \pm 4,13$ Leukozyten in Gruppe C1 (Ischämie und Reperfusion mit EGB761-Applikation bei gesundem Leberstatus).

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine Zunahme adhärenter Leukozyten, wobei die Zunahme der Leukozytenadhäsion in Gruppe C1 ($9,5 \pm 5,25$) gegenüber der Versuchsgruppe B1 ($20,68 \pm 3,56$) nach 90 Minuten deutlich geringer ist

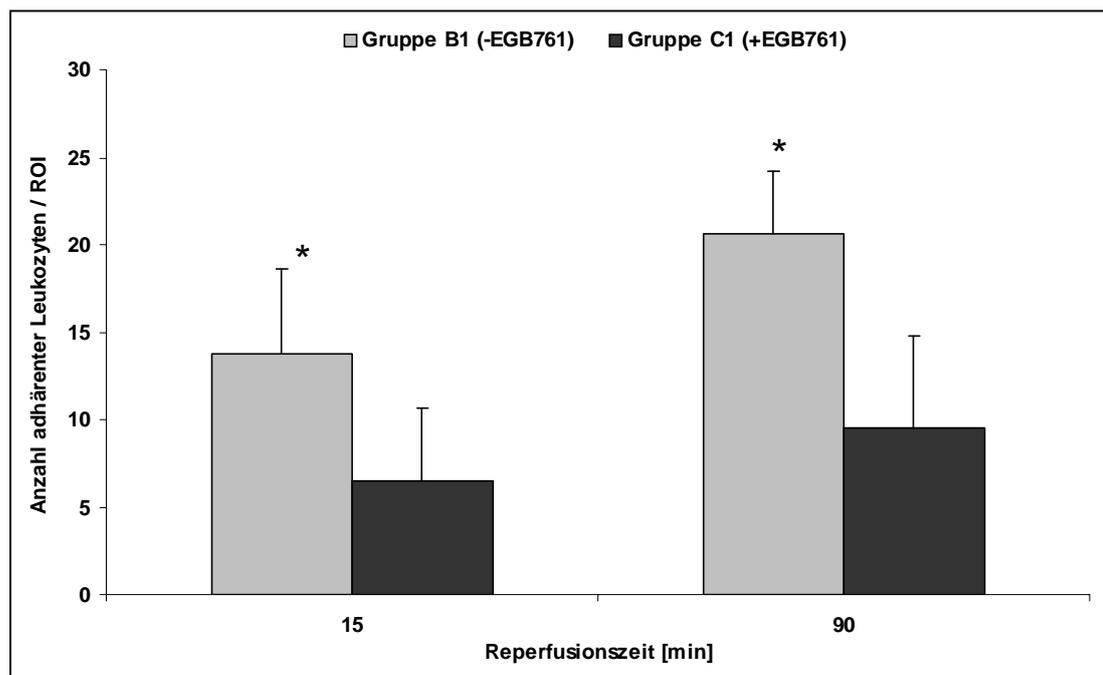


Abb.11: mittlere Anzahl permanent adhärenter Leukozyten/Gesichtsfeld nach 15 und 90 Minuten Reperfusion bei Versuchstieren ohne Fettleber. Zu beiden Beobachtungszeitpunkten zeigt sich nach EGB761-Gabe eine signifikant niedrigere Leukozytenadhäsion. * $p < 0,01$, Gruppe B1 vs C1; t-Test

3.3 Intravitalmikroskopische Untersuchungen nach I/R bei Versuchstieren mit Fettleber

Die quantitative Beurteilung der sinusoidalen Perfusion bei Fettlebern ohne Ischämie und Reperfusion (Gruppe A2) zeigte gegenüber den Versuchstieren ohne Fettleber (Gruppe A1) per se schlechtere Perfusionsverhältnisse, mit einer sinusoidalen Perfusionsrate (periportal/ midzonal/ perizentral) von 91,4%/ 90,7%/ 92,4%. In Bezug auf die azinären Zonen zeigten sich keine Perfusionsunterschiede.

3.3.1 EGB 761 verbessert die postischämische sinusoidale Perfusion bei Versuchstieren mit Fettleber

Postischämisch zeigte sich bei den Versuchstieren mit einer Fettleber in der frühen Reperusionsphase (15 min nach Reperfusion) zunächst eine deutlich eingeschränkte sinusoidale Perfusion.

Der Vergleich der beiden Versuchsgruppen mit (C2) und ohne (B2) EGB761-Applikation ergab eine verbesserte sinusoidale Perfusionsrate (periportal/ midzonal/ perizentral) von 86,2%/ 86,8%/ 84,51% in Gruppe C2 gegenüber Gruppe B2 mit 79,5%/ 84,6%/ 85,3% (Abb. 12a). Ein signifikanter Unterschied ließ sich allerdings nur für die periportale Zone darstellen.

Anders als bei gesunden Lebern zeigte sich nach 90 min Reperfusion eine Steigerung der sinusoidalen Perfusionsrate nur in Gruppe C2 nach EGB761-Gabe, während in Versuchsgruppe B2 nach 90 min Reperfusion die Perfusionsrate im Verlauf sich tendenziell weiter verschlechterte.

So fand sich zu diesem Zeitpunkt in Gruppe B2 eine sinusoidale Perfusionsrate (periportal/ midzonal/ perizentral) von 75,8%/ 80,6%/ 82,5% und in Gruppe C2 91,3%/ 80,6%/ 82,5% (Abb. 12b) mit signifikantem Unterschied sowohl periportal als auch midzonal.

Frühe Reperfusionphase

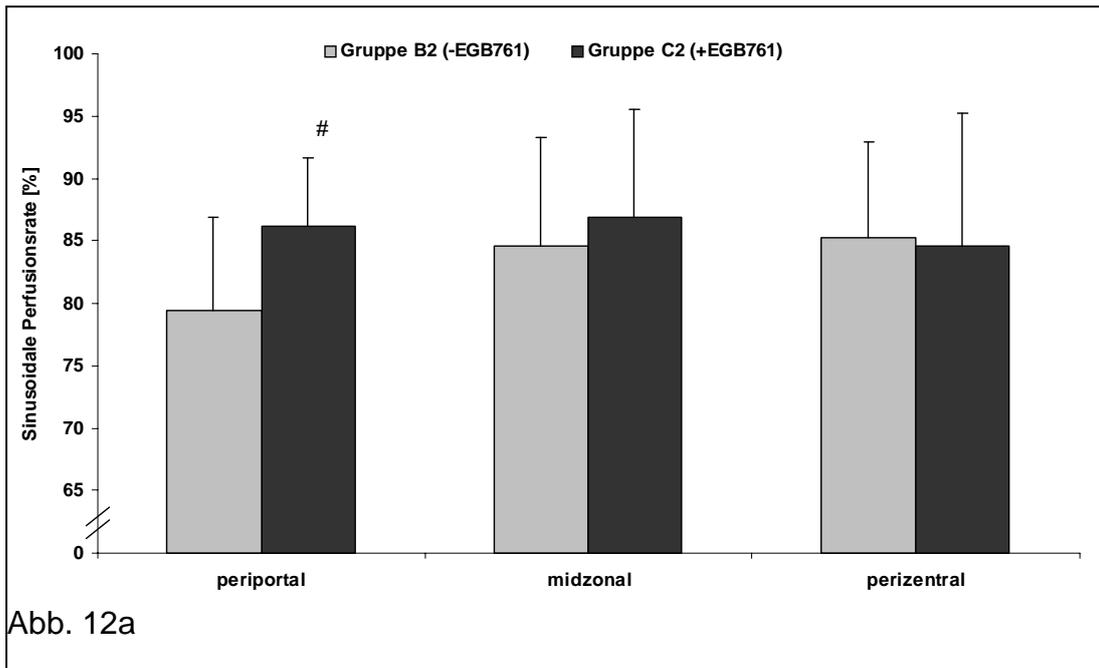


Abb. 12a

Späte Reperfusionphase

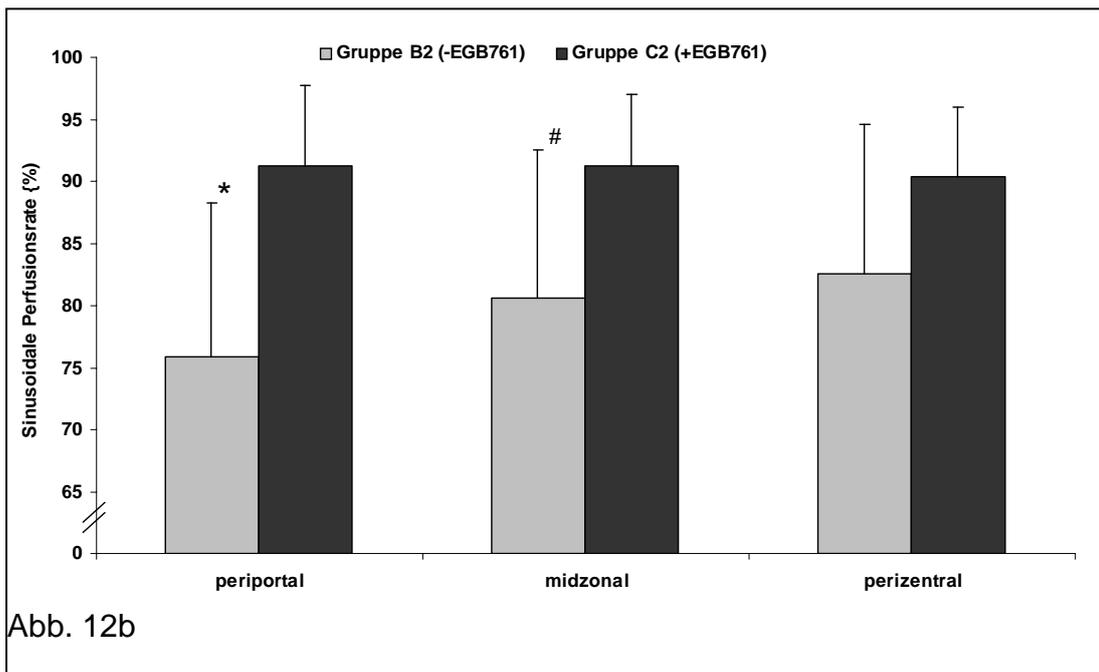


Abb. 12b

Abb.12: mittlere sinusoidale Perfusionsrate nach 60 min. Ischämie und 15 Minuten (Abb. 12a) bzw. 90 Minuten (Abb. 12b) Reperfusion. Durch intravenöse EGB761-Applikation vor Reperfusion lässt sich die sinusoidale Perfusionsrate nach Ischämie und Reperfusion in einzelnen Zonen signifikant verbessern. [#]p<0.05, ^{*}p<0.01, Gruppe B2 vs C2; t-Test

3.3.2 EGB761 vermindert die postischämische Leukozytenadhäsion bei Versuchstieren mit einer Fettleber

Die Quantifizierung permanent adhärenter Leukozyten nach I/R bei Fettlebern zeigte ebenfalls eine Reduktion der postischämischen Leukozytenadhäsion nach EGB761-Applikation (Abb. 13). Allerdings ließ sich ein signifikanter Unterschied erst nach 90 Minuten Reperfusion darstellen ($p < 0,01$).

So fanden sich in Gruppe B2 (Ischämie und Reperfusion ohne EGB761-Applikation bei verfettetem Leberstatus) nach 15 min Reperfusion durchschnittlich $10,9 \pm 5,63$ adhärenente Leukozyten pro Gesichtsfeld, gegenüber $7,5 \pm 4,6$ Leukozyten in Gruppe C2 (Ischämie und Reperfusion mit EGB761-Applikation bei verfettetem Leberstatus).

Innerhalb des Beobachtungszeitraumes zeigte sich in beiden Versuchsgruppen eine Zunahme adhärenter Leukozyten, wobei die Zunahme der Leukozytenadhäsion in Gruppe C2 ($12,5 \pm 5,12$) gegenüber der Versuchsgruppe B2 ($22,2 \pm 5,62$) nach 90 Minuten ebenfalls wie bei gesunden Lebern deutlich geringer war.

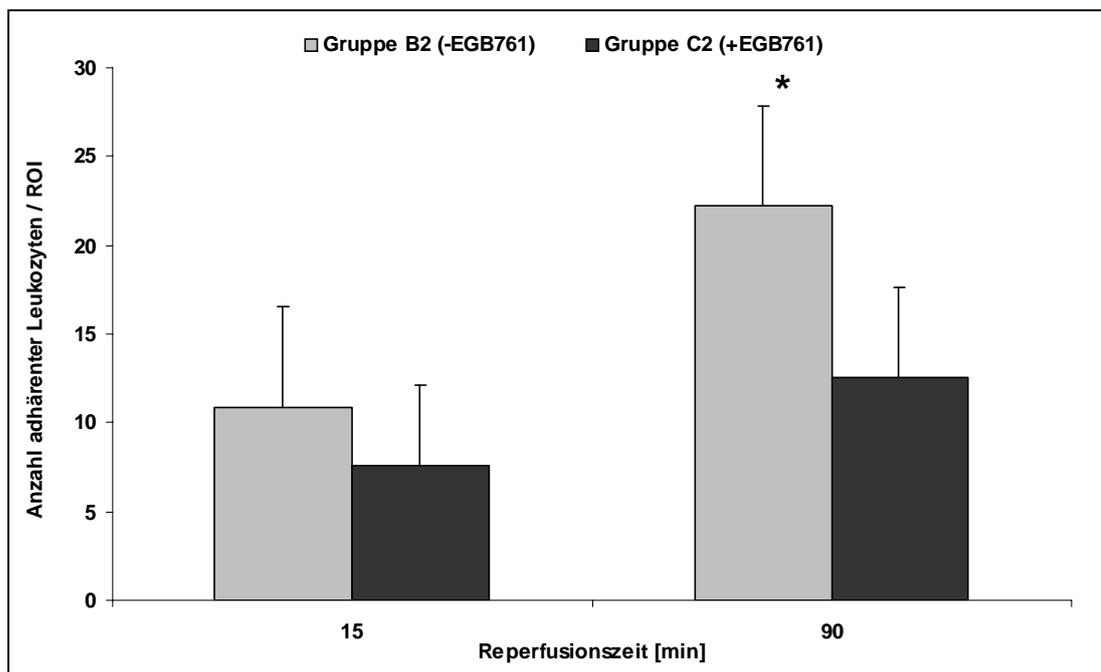


Abb.13: mittlere Anzahl permanent adhärenter Leukozyten/Gesichtsfeld (ROI = region of interest) nach 15 und 90 Minuten Reperfusion bei Versuchstieren mit Fettleber. Nach EGB761-Gabe zeigt sich 90 Minuten nach Reperfusion eine signifikant niedrigere Leukozytenadhäsion. $^*p < 0,01$, Gruppe B2 vs C2; t-Test

3.4 Leberenzyme (GOT, GPT, GLDH)

3.4.1 EGB761 bewirkt keine Reduktion der Leberenzyme nach Ischämie und Reperfusion der gesunden oder verfetteten Rattenleber

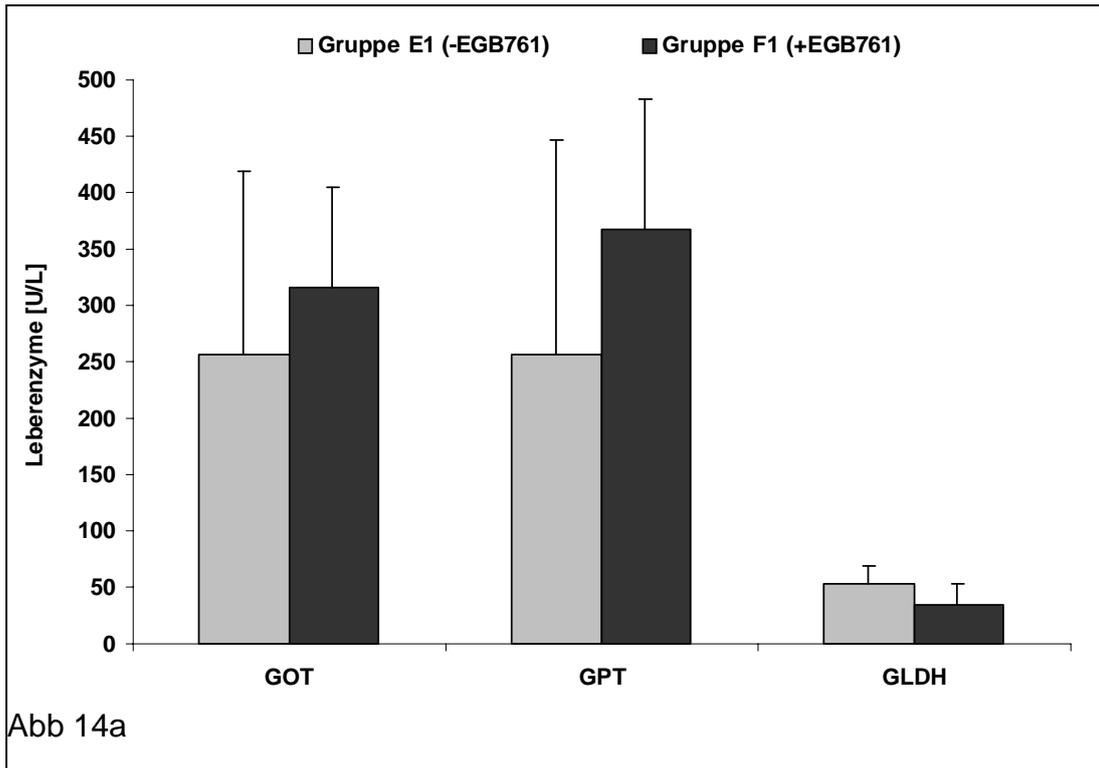
Wie in Abb. 14 zu erkennen führen Ischämie und Reperfusion der Leber erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der Leberenzyme im Serum. Bei gesunden Tieren ohne Fettleber zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen mit (C1) und ohne (B1) EGB761-Applikation vor Reperfusion (Abb. 14a). Allerdings lässt sich eine deutliche Tendenz zu höheren Leberenzymwerten nach EGB 761-Gabe erkennen.

Bei Versuchstieren mit Fettleber hingegen zeigten sich in der Versuchsgruppe C2 mit EGB761-Gabe signifikant höhere GOT- und GPT-Werte (Abb 14b).

Die erhöhten GLDH-Werte ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen bei gesunden und verfetteten Lebern.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass die intravenöse Gabe von EGB761, innerhalb von 2Std. nach Applikation, per se nicht zu einem Anstieg der Leberenzyme führt (nicht dargestellt).

Gesunde Lebern



Fettlebern

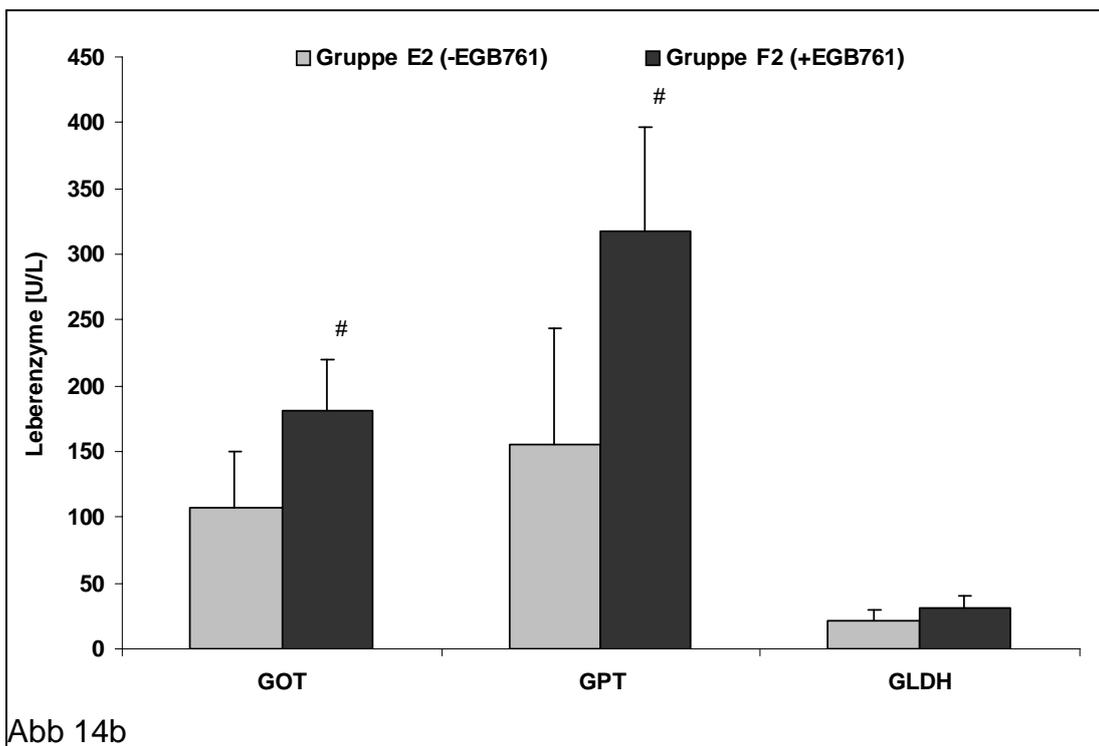


Abb.14: Leberenzyme (GOT, GPT, GLDH) nach Ischämie und Reperfusion bei gesunden (Abb.14a) und verfetteten Lebern (Abb14b). # $p < 0,05$, Gruppe E2 vs F2; t-Test

3.4.2 Galleproduktion

Die Galleproduktion wurde nur bei intravitalmikroskopischen Versuchen gemessen.

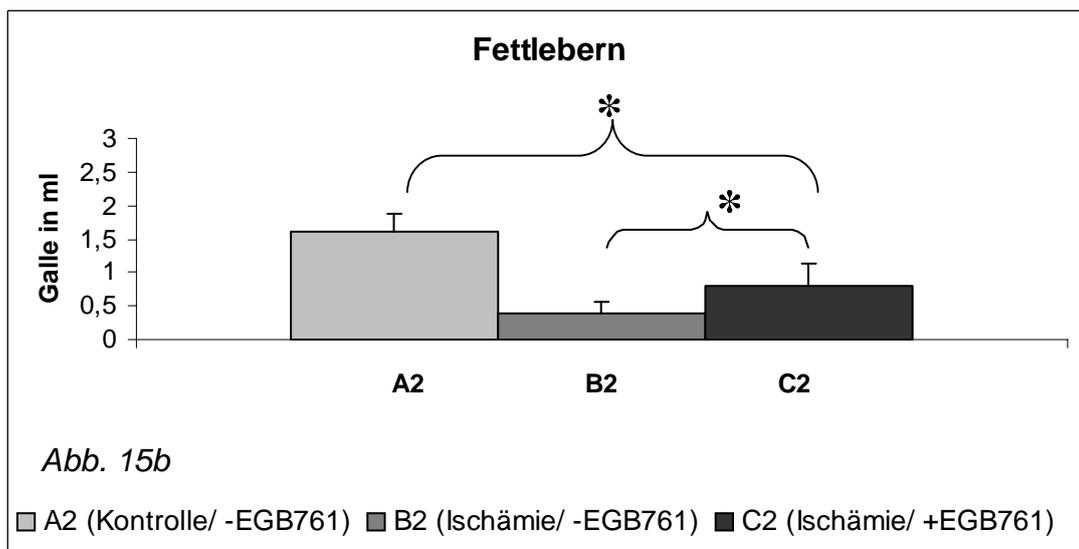
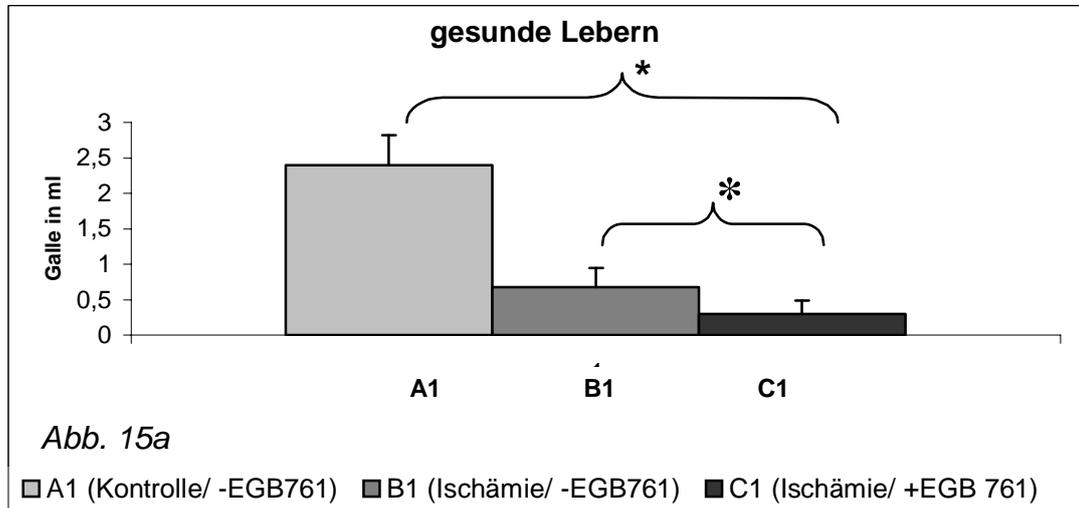


Abb.15: Galleproduktion bei gesunden (a) und verfetteten (b) Lebern innerhalb von 2 Std;

* $p < 0,01$, Gruppe A1 vs B1 und C1 sowie Gruppe B1 vs C1; t-Test

* $p < 0,01$, Gruppe A2 vs B2 und C2 sowie Gruppe B2 vs C2; t-Test

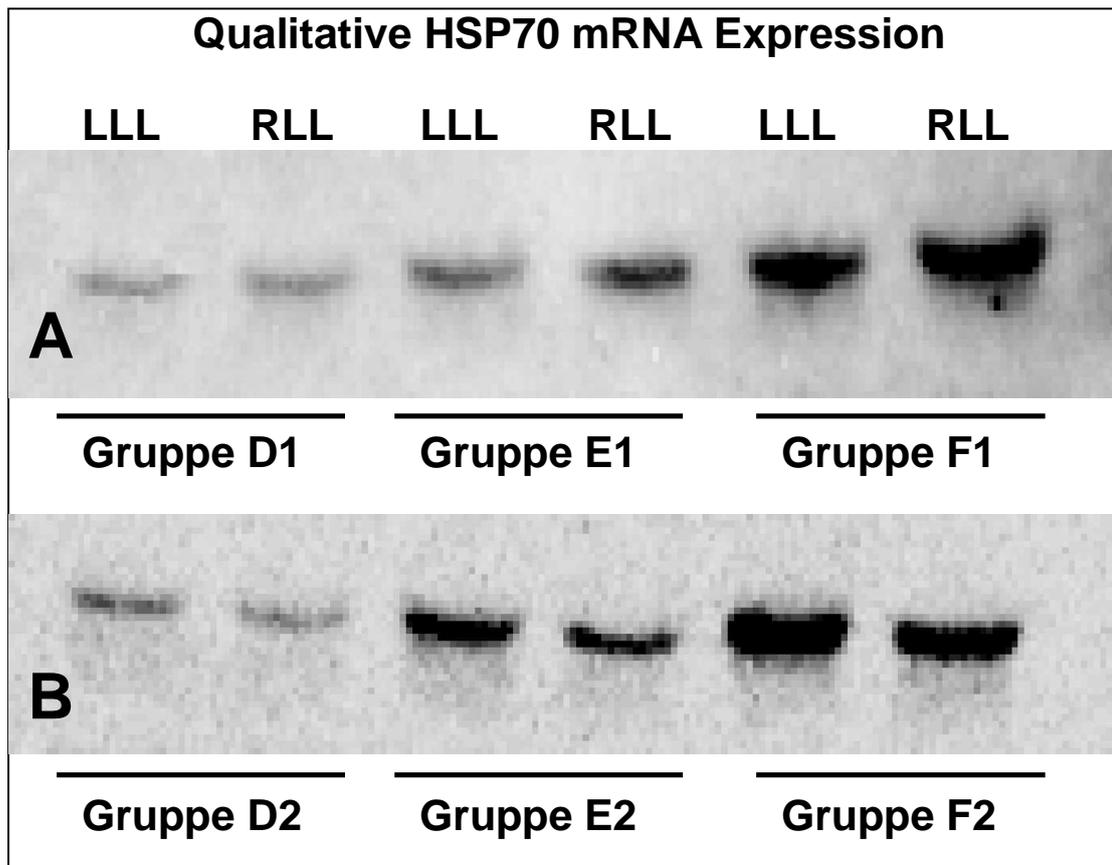
Nach Ischämie und Reperfusion zeigte sich in den Versuchsgruppen B1, C1, B2 und C2 gegenüber den Kontrollgruppen A1 und A2 eine signifikante Reduktion der Galleproduktion nach 2 Std. Reperfusion (Abb. 15).

Bei gesunden Lebern fand sich zudem nach EGB761-Gabe (Gruppe C1) eine signifikant niedrigere Galleproduktion von $0,3 \pm 0,18$ ml gegenüber $0,68 \pm 0,27$ ml ohne EGB761 (Gruppe B1).

Im Vergleich zu Versuchstieren mit gesunder Leber (Gruppe A1) zeigte sich nach 2 Std., ohne Ischämie und Reperfusion eine signifikant ($p < 0,01$) niedrigere Galleproduktion bei Versuchstieren mit verfetteter Leber (Gruppe A2).

Der Vergleich der beiden Versuchsgruppen B2 (Ischämie und Reperfusion ohne EGB761-Applikation bei verfettetem Leberstatus) und C2 (Ischämie und Reperfusion mit EGB761-Applikation bei verfettetem Leberstatus) ergab nach EGB761-Gabe mit $0,81 \pm 0,3$ ml hingegen eine signifikant höhere Galleproduktion gegenüber $0,39 \pm 0,16$ ml ohne EGB761-Gabe (Gruppe B2).

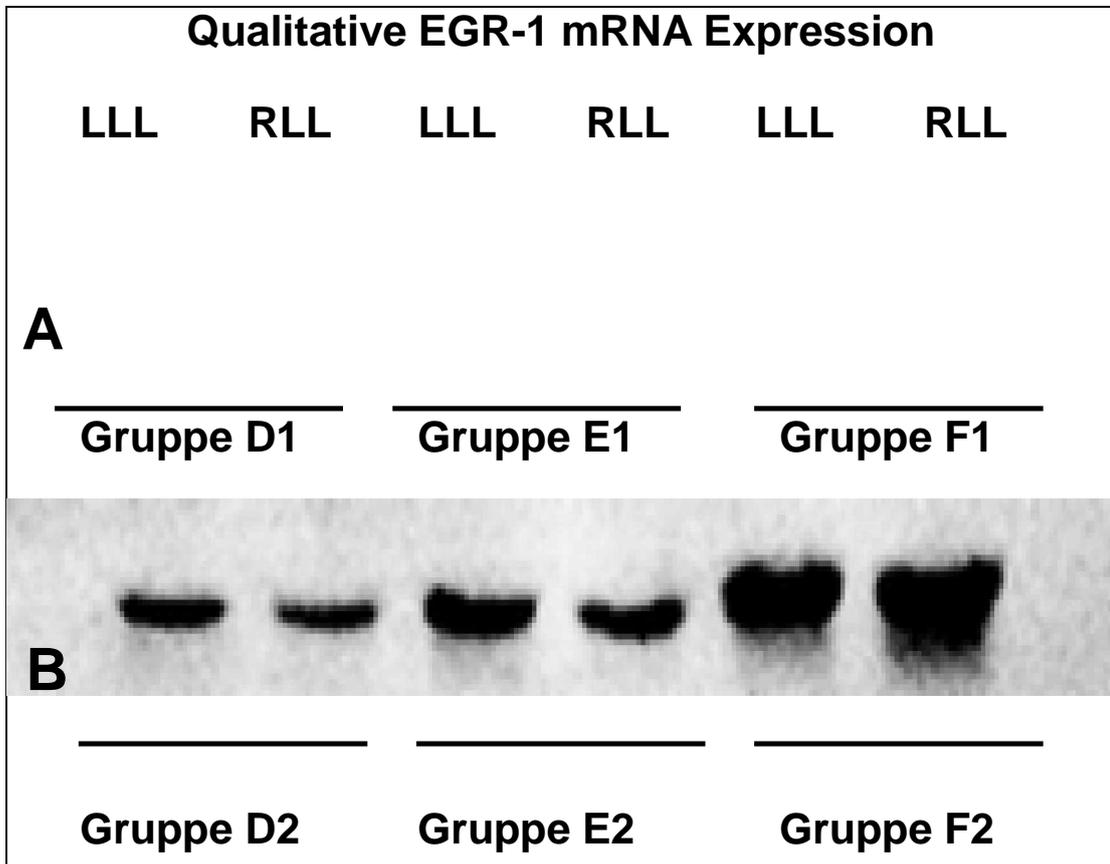
3.5 HSP-70 und EGR-1 mRNA-Expression



HSP70 mRNA Expression (fold increase)						
Leberstatus	Gruppe D		Gruppe E		Gruppe F	
	LLL	RLL	LLL	RLL	LLL	RLL
gesund	1,92 +/- 0,61	2,76 +/- 1,79	8,09 +/- 2,89	6,82 +/- 3,79	17,16 +/- 4,27	18,26 +/- 4,63
verfettet	2,99 +/- 1,03	2,58 +/- 1,22	10,18 +/- 5,62	4,53 +/- 2,09	20,88 +/- 2,54	10,52 +/- 5,39

Abb. 16: Qualitative und quantitative Ergebnisse der HSP 70 mRNA Expression der Tiere mit gesunden Lebern (A) und mit Fettlebern (B). Gruppe D: Kontrolle, Gruppe E: Ischämie des LLL= linker Leberlappen, Gruppe F: Ischämie des LLL + EGB761; RLL= rechter Leberlappen. Auch die quantitativen Messungen zeigen die vermehrte Expression von HSP 70 mRNA nach I/R in der Leber und die durch EGB 761-Gabe noch verstärkte HSP 70 mRNA Expression sowohl des linken als auch des rechten Leberlappens.

Bei der qualitativen und quantitativen Analyse der HSP70 mRNA-Expression wurde eine vermehrte HSP70 Expression in der Ischämie-Gruppe (Gruppe E) deutlich. Die Expression bei den Tieren, die EGB761 erhielten (Gruppe F) ist gegenüber den Tieren ohne Therapie ebenfalls deutlich erhöht (Abb.16). Zusätzlich zeigt sich bei allen Tieren nach Ischämie und Reperfusion mit und ohne EGB761 eine stark erhöhte HSP 70 mRNA Expression im nichtischämischen, rechten Leberlappen (Abb.16).



EGR-1 mRNA Expression (fold increase)						
Leberstatus	Gruppe D		Gruppe E		Gruppe F	
	LLL	RLL	LLL	RLL	LLL	RLL
gesund	3,49 +/-2,21	3,05 +/-0,84	9,26 +/-3,13	7,07 +/-2,38	18,74 +/-3,36	15,88 +/-2,44
verfettet	2,71 +/-0,74	1,79 +/-0,56	9,24 +/-5,35	5,91 +/-3,47	19,60 +/-3,45	14,84 +/-6,43

Abb.17: Qualitative und quantitative Ergebnisse der EGR-1 mRNA Expression der Tiere mit gesunden Lebern (A) und mit Fettlebern (B). Gruppe D: Kontrolle, Gruppe E: Ischämie des LLL= linker Leberlappen, Gruppe F: Ischämie des LLL + EGB761; RLL= rechter Leberlappen. Man erkennt die deutlich gesteigerte Expression der EGR-1 mRNA nach I/R der Leber sowohl im rechten als auch im linken Leberlappen. Besonders hervorzuheben ist die starke EGR-1 mRNA Expression der Tiere, die EGB761 erhielten.

Auch bei den Hybridisierungen mit der EGR-1 Sonde, wurde eine vermehrte EGR-1 Expression in der Ischämie-Gruppe (Gruppe E) deutlich. Die Expression bei den Tieren, die EGB 761 erhielten (Gruppe F) ist gegenüber den Tieren ohne Therapie deutlich erhöht (Abb.17). Auch bei dieser Analyse fällt eine ebenfalls stark erhöhte EGR-1 mRNA Expression im nichtischämischen, rechten Leberlappen auf (Abb.17).

4. Diskussion

Ischämie und Reperfusion (I/R) der Leber ist von zentraler Bedeutung in vielen klinischen Situationen, in denen temporär der hepatische Blutfluß reduziert oder der Sauerstofftransport unzureichend ist. Regelmäßig betroffen sind Patienten im Rahmen von Lebertransplantationen und ausgedehnten Leberresektionen mit zeitlich begrenzter Unterbrechung der hepatischen Blutzirkulation, sowie in verschiedenen Situationen des Kreislaufschockes ^(76,77,78). Das Risiko einer postoperativen oder posttraumatischen Leberdysfunktion oder eines Ausfalles der Leberfunktion wird häufig potenziert durch präexistente Organschädigungen im Sinne einer Steatosis hepatis ^(31,79,80). Die Pathophysiologie von Ischämie und Reperfusion der Leber und daraus resultierender Organschäden besitzt daher große klinische Bedeutung.

Das Ausmaß des hepatischen Reperfusionsschadens nach warmer Ischämie korreliert in vielen experimentellen Studien mit einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, einer vermehrten Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion, der Aktivierung von Kupfferzellen sowie einer verstärkten Lipidperoxidation (LPO) ^(81,82,83,84,85).

Daraus ergaben sich pharmakologische Therapieansätze, die durch Beeinflussung spezifischer pathophysiologischer Ereignisse während der Reperusionsphase die postischämische Leberschädigung vermindern. Zahlreiche Studien konnten bereits zeigen, dass z.B. durch Anwendung so genannter Radikalfänger oder durch pharmakologische Beeinflussung der postischämischen Leukozytenadhäsion sich der hepatische Ischämie/Reperfusionsschaden vermindern lässt ^(86,87,88). Viele der experimentell angewendeten Substanzen lassen sich jedoch aufgrund fehlender klinischer Erfahrung, hoher Kosten oder ausgeprägter Nebenwirkungen im klinischen Alltag nicht einsetzen.

Ginkgo Biloba Extrakt (EGB761) ist ein standardisiertes pflanzliches Präparat dessen Wirkungsweise auf der Kombination seiner wesentlichen Bestandteile von Flavonoiden und Terpenlaktone (Ginkgolide, Bilobalide) beruht ⁽⁸⁹⁾. Dieses Präparat wird erfolgreich und nahezu ohne Nebenwirkungen zur Behandlung zerebraler und peripherer Durchblutungsstörungen eingesetzt, bei

denen pathophysiologisch freie Sauerstoffradikale sowie eine vermehrte Thrombozytenaggregation eine Rolle spielen ^(90,91).

Diese experimentelle Studie untersuchte den Einfluss von Ginkgo Biloba Extrakt (EGB761) auf den hepatischen Reperfusionsschaden nach warmer Ischämie bei der gesunden und verfetteten Rattenleber.

Intravitalmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Gabe von EGB761 vor Reperfusion, signifikant sowohl die postischämische Mikrozirkulation verbessert, als auch die sinusoidale Leukozytenadhäsion während der zweistündigen Reperusionsphase vermindert.

Das Versagen der sinusoidalen Mikrozirkulation während der Organreperfusion ist wesentlicher Bestandteil des hepatischen Reperfusionsschadens. Die Verschlechterung der intrahepatischen Mikrozirkulation ist verbunden mit einer verminderten Organoxygenierung, dem Absterben von Hepatozyten und der Freisetzung leberspezifischer Enzyme ^(92,93,94). Das Ausmaß der postischämischen Mikrozirkulationsstörung bestimmt letztlich den Grad des parenchymatösen Reperfusionsschadens und der daraus resultierenden Organdysfunktion ⁽⁹⁴⁾.

Die sinusoidale Perfusion der Leber wird geregelt durch Freisetzung vaso-konstriktiver und vasodilatativer Substanzen sinusoidaler Endothelzellen ⁽⁹⁵⁾. Die postischämische Reperfusion der Leber führt zu einem intrahepatischen Konzentrationsanstieg von Endothelin-1 (ET-1), einem langzeit-aktiven, sehr potenten Vasokonstriktor ⁽⁹⁶⁾. In der Leber agiert ET-1 als vasokonstriktiver Mediator, der unter pathologischen Bedingungen wie Ischämie und Reperfusion signifikant zur Verschlechterung der hepatischen Mikrozirkulation beiträgt und für das Auftreten des so genannten „No Reflow“-Phänomens verantwortlich gemacht wird ⁽⁹⁷⁾.

Die ET-1 induzierte Vasokonstriktion wird inhibiert durch die vasodilatativen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid (NO) ⁽⁹⁸⁾. Nach neuesten Erkenntnissen erscheint die Regulation der hepatischen Mikrozirkulation durch eine dynamische Balance dieser beiden Mediatoren wahrscheinlich ⁽⁹⁵⁾. Der Überschuss an vasokonstriktorisches Mediatoren wie ET-1 während der sauerstoffreichen hepatischen Reperusionsphase wird neben einer gesteigerten Sekretion zusätzlich durch die Neutralisierung von NO, durch Produktion und

Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale wie z.B. Superperoxid-Anionen (O_2^-) gesteigert ^(99,100). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass die Induktion einer gesteigerten endogenen NO-Produktion durch cNOS, die postischämische Mikrozirkulation während der Reperfusionphase verbessert und den hepatischen Reperfusionsschaden reduziert ⁽¹⁰¹⁾.

Die antioxidativen Eigenschaften von EGB761 führen bei Ischämie und Reperfusion zu einer Reduktion reaktiver Sauerstoffradikale wie Superperoxide-Anionen (O_2^-), freien Hydroxyl (HO^-)- und Peroxid (HOO^-)-Radikalen ^(102,103,104). O_2^- ist einer der aktivsten Inhibitoren von NO ⁽¹⁰⁵⁾. Es wird angenommen, dass durch die antioxidativen Eigenschaften von EGB761 die Halbwertszeit von NO verlängert wird. Zudem ist eine gesteigerte NO-Produktion durch eine EGB761-induzierte cNOS-Aktivierung in kultivierten Endothelzellen demonstriert worden ⁽¹⁰⁶⁾. Die vielfach beschriebene Verbesserung des Blutflusses durch lokale Vasodilatation nach EGB761-Gabe erklärt sich somit durch eine Konzentrationserhöhung von NO ^(107,108).

Die ebenfalls beschriebene Bindung von NO durch EGB761 steht dazu nicht im Widerspruch, da davon ausgegangen wird, dass durch die Neutralisierung von O_2^- durch EGB761 weniger Peroxynitrit ($ONOO^-$) aus NO gebildet wird und somit genügend NO zur Vasodilatation zur Verfügung steht. Zudem sind nur nanomolare Konzentrationen an NO zur Signalwirkung notwendig.

Dieser Wirkungsmechanismus steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie. Über den Einfluss von EGB761 auf die hepatische Mikrozirkulation nach warmer Ischämie und Reperfusion lagen bislang keine Untersuchungen vor. So führte in dieser Studie die intravenöse Administration von EGB761 vor Reperfusion bei gesunden Versuchstieren zu einer signifikanten Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation nach Ischämie und Reperfusion.

Die Verbesserung der postischämischen Mikrozirkulation durch EGB761 zeigte sich noch deutlicher bei Versuchstieren mit einer Steatosis hepatis. Während sich die intrahepatischen Perfusionsverhältnisse während 120 Minuten Reperfusion nach EGB761-Gabe stetig verbesserten, zeigte sich bei Versuchstieren ohne EGB761-Gabe während der Reperfusionphase eine Zunahme nicht-perfundierter Areale und somit eine Verschlechterung der hepatischen Mikrozirkulation im postischämischem Verlauf.

Die Verfettung der Leber führt im Rattenmodell unter pathologischen Bedingungen wie Ischämie und Reperfusion gegenüber gesunden Versuchstieren zu einer deutlich gesteigerten Produktion an reaktiven Sauerstoffradikalen und einer konsekutiv gesteigerten Lipidperoxidation in der postischämischen Reperfusionsphase ^(109,37). Des Weiteren wurde bereits gezeigt, dass die in dieser Studie verwendete Cholin und Methionin defiziente Diät zur Induktion einer Fettleber die Reduktion intrahepatischer Antioxidantien bewirkt ⁽⁷¹⁾. Zudem konnte in anderen Studien eine gestörte Mikrozirkulation in verfetteten Lebern nachgewiesen werden ⁽¹¹⁰⁾. Letztlich führen jedoch die Auswirkungen einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffradikale unter pathologischen Bedingungen zu einer verringerten Toleranz der verfetteten Leber gegenüber schädigenden Einflüssen. In dieser Studie zeigt sich dieser Umstand durch eine Verschlechterung der postischämischen Mikrozirkulation bei verfetteten Lebern. Der Erhalt bzw. die Verbesserung der postischämischen Mikrozirkulation in der Versuchsgruppe (+EGB761) verfetteter Lebern unterstreicht die Effektivität von EGB761 in Bezug auf den oben beschriebenen Wirkungsmechanismus.

Die postischämische Leukozytenadhäsion zeigte sich nach EGB761-Administration in beiden Versuchsgruppen mit und ohne Fettleber nach 90 Minuten Reperfusion gleichermaßen gegenüber den Kontrollgruppen signifikant reduziert.

Ischämie und Reperfusion der Leber führen zu einer Aktivierung von Kupferzellen, ortständige Makrophagen, die während der initialen Reperfusionsphase hauptverantwortlich für die Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale sind ⁽¹¹¹⁾. Die daraus resultierende, intravaskuläre oxidative Belastung führt zu einer membranschädigenden Lipidperoxidation (LPO) ⁽¹¹²⁾. Durch die membranschädigende LPO entstehen chemotaktische Faktoren, die zusammen mit freien Radikalen während der frühen Reperfusionsphase (1-2h) zu einer Aktivierung und Akkumulation neutrophiler Leukozyten führt ⁽¹¹³⁾.

Neben großen Mengen an freien Radikalen sezernieren aktivierte Kupferzellen auch verschiedene Cytokine, Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α) und Plättchen aktivierenden Faktor (PAF) ^(114,115,116). In vitro fördert PAF die Aggregation, Chemotaxis, Degranulation und Bildung reaktiver Sauerstoffradikale.

kale neutrophiler Leukozyten ^(117,118,119). Des Weiteren dient PAF als Signal für die Endothel-Leukozytenadhäsion ^(120,121). Neben Kupffer-Zellen wird PAF auch von neutrophilen Leukozyten selbst, sowie von Thrombozyten und Endothelzellen gebildet ^(23,22). Die sinusoidale Akkumulation und endotheliale Transmigration adhäreneter Leukozyten führt letztlich nach 6-24 Std. Reperfusion zur Initiierung einer sekundären Entzündungsreaktion die wesentlich für den Parenchymschaden nach Ischämie und Reperfusion verantwortlich gemacht wird ⁽¹²²⁾.

Diesbezüglich konnten experimentelle Studien bereits zeigen, dass die Administration von Antioxidantien die Formation chemotaktischer Produkte der Lipidperoxidation, hervorgerufen durch reaktive Sauerstoffradikale verhindern und die Akkumulation von Leukozyten in der postischämischen Leber vermindern ^(123,124).

Die Reduktion der Leukozytenadhäsion durch EGB761 nach Ischämie und Reperfusion korreliert in dieser Studie mit den oben dargestellten pathophysiologischen Mechanismen. EGB761 enthält neben den antioxidativen Flavonoiden als wesentlichen Bestandteil Ginkgolide, die eine Antagonisierung von PAF-Rezeptoren bewirken ⁽¹²⁵⁾. Der EGB761 vermittelte PAF-Antagonismus sowie die Reduktion der LPO durch Verminderung der oxidativen Belastung nach Ischämie und Reperfusion führen in Kombination zu einer Reduktion der postischämischen Leukozytenadhäsion. In diesem Zusammenhang zeigten Gozin et al. bereits, dass bei HUVEC-Zellen *in vitro* nach oxidativer Belastung die Leukozytenaktivierung, -adhäsion und konsekutive Infiltration durch EGB761 reduziert werden kann.

Anders als erwartet korrelierten in dieser Studie die Verbesserung der Mikrozirkulation sowie die verminderte Leukozytenadhäsion durch EGB761 nicht mit einer Reduktion der Leberenzyme AST, ALT und GLDH im Serum. So zeigte sich bei gesunden Tieren nach 120 Minuten Reperfusion eine deutliche Erhöhung der Transaminasen nach EGB761-Applikation, die bei Versuchstieren mit Fettlebern gegenüber der Kontrollgruppe sogar statistische Signifikanz erreichte.

Hepatische Mikrozirkulationsstörungen nach Ischämie und Reperfusion sind sekundär mit einer verminderten Organoxygenierung verbunden und korrelieren mit einer gesteigerten Parenchymschädigung und Freisetzung leberspe-

zifischer Enzyme ⁽⁹⁴⁾. Wie oben bereits erwähnt wird die postischämische Mikrozirkulation der Leber wesentlich durch eine dynamische Balance von ET-1 und NO bestimmt, wobei nach Reperfusion zunächst die vasokonstriktorische Komponente durch ET-1 überwiegt, da nach Reoxygenierung unter anderem die Produktion von NO durch eNOS verzögert einsetzt ⁽¹²⁶⁾. In diesem Zusammenhang konnten mehrere Studien bereits zeigen, dass durch Induktion von eNOS und Steigerung der endogenen NO-Produktion eine Verbesserung der postischämischen Perfusion und Verringerung des Parenchymschadens, verbunden mit einer verringerten Freisetzung von AST und ALT möglich ist ^(127,128).

Die Antagonisierung von ET-1 in der initialen Reperfusionphase führt in der Leber ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung der postischämischen Mikrozirkulation und verhindert praktisch das Auftreten des „No Reflow“-Phänomen durch Reduktion einer relevanten Vasokonstriktion ⁽¹²⁹⁾. Allerdings zeigten diese Versuche, dass die Verhinderung der initialen Vasokonstriktion nach Ischämie und Reperfusion der Leber nicht zu einer Erniedrigung der Serum-Transaminasen führt ⁽¹³⁰⁾. Es wurde zunächst spekuliert, dass die Rekrutierung nicht-perfundierter Areale durch Antagonisierung von ET-1, eine Art „Auswascheffekt“ bewirkt und somit zu einer Erhöhung der Serum-Transaminasen führt ⁽¹³⁰⁾. Weitere Untersuchungen zeigten allerdings, dass die Erhöhung leberspezifischer Enzyme im Serum nach ET-1-Antagonisierung mit einer gesteigerten Parenchymschädigung einhergeht ⁽¹³¹⁾. Einige Autoren gehen daher davon aus, dass die gesteigerte Organoxygenierung durch den perfusionssteigernden Effekt der ET-1-Antagonisierung während der initialen Reperusionsphase, simultan mit einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffradikale verbunden ist, so dass zumindest partiell der positive Effekt einer verbesserten Organperfusion und -oxygenierung nach Ischämie und Reperfusion negativ beeinflusst wird ⁽¹³⁰⁾. Des Weiteren wurde spekuliert, dass die initiale Vasokonstriktion durch ET-1 nach Ischämie und Reperfusion der Leber physiologisch eine Art Schutzmechanismus darstellt, der durch initiale Limitierung der sauerstoffreichen Organreperfusion einer massiven Bildung reaktiver Sauerstoffradikale vorbeugt. Dieser kurzfristige Effekt ermöglicht dann sekundär durch Stimulation der eNOS über den Endothelin_B-Rezeptor eine langsame Wiederherstellung der Mikrozirkulation. Induktion der endogenen NO-Produktion sowie die Limitie-

rung der O_2^- -Produktion durch initiale Verminderung der Organperfusion sind vermutlich wesentliche Schutzmechanismen nach Ischämie und Reperfusion der Leber um einer Parenchymschädigung vorzubeugen.

Basierend auf den oben genannten Aussagen muss man davon ausgehen, dass in dieser Studie die initiale Antagonisierung der Wirkung von ET-1 durch Verlängerung der Halbwertszeit und Konzentrationserhöhung von NO durch EGB761 mit einem erhöhten Parenchymschaden einhergeht und somit zu einer Erhöhung der Serum-Transaminasen führt. Bei Fettlebern wirkt sich der perfusionssteigernde Effekt von EGB761 auf den Parenchymschaden noch gravierender aus und führt zu einer signifikanten Transaminasenerhöhung gegenüber der Kontrollgruppe.

Eine Erhöhung der Transaminasen AST und ALT nach EGB761-Applikation ohne Ischämie und Reperfusion fand sich nicht, so dass ausgeschlossen werden kann, dass EGB761 per se hepatotoxisch ist.

Zur Verifizierung unserer intravitalmikroskopischen und laborchemischen Ergebnisse wurden weiterhin molekularbiologische Untersuchungen zur HSP70-mRNA und EGR-1-mRNA Bestimmung durchgeführt.

HSP70 gehört zu einer Gruppe intrazellulärer Stressproteine die als Antwort auf eine Vielzahl zellulärer Noxen (z.B. Ischämie, Hypoxie, Hyperthermie, Infektion) gebildet werden ^(45,132,133,134). Die Induktion einer erhöhten intrazellulären HSP70-Expression schützt Zellen bzw. das Organ sowohl zum Zeitpunkt des zellschädigenden Ereignisses, als auch im Rahmen eines bestimmten Zeitintervalls nach Expressionserhöhung durch Toleranzsteigerung gegenüber zellulärem Stress ^(135,136).

Die gesteigerte intrazelluläre HSP70-Expression nach hepatischer Ischämie und Reperfusion ist bereits vielfach beschrieben und reflektiert den postischämischen Reperfusionsschaden ⁽⁴⁷⁾. Die intrahepatische Expressionssteigerung von HSP70 erfolgt auf Transkriptionsebene und erfordert eine molekulare Zellschädigung die vermutlich bereits während Ischämie/Hypoxie verursacht, zu einer HSP70-Genaktivierung führt ⁽¹³⁷⁾.

Während der sauerstoffreichen Reperfusion wird die HSP70-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der oxidativen Belastung durch reaktive Sauerstoffradikale amplifiziert ^(138,139).

In dieser Studie zeigt sich nach EGB761-Applikation gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant stärkere HSP70-mRNA-Expression nach 120 Minuten Reperfusion. Die intravenöse EGB761-Applikation in dieser Versuchreihe erfolgte vor Organreperfusion während der Ischämiephase. Davon ausgehend, dass in beiden Versuchsgruppen mit und ohne EGB761, die ischämische Leberschädigung gleichermaßen ausgeprägt ist, muss man schlussfolgern, dass die HSP70-mRNA-Expressionssteigerung in direktem Zusammenhang mit der gesteigerten Organreperfusion durch EGB761 steht. Es ist davon auszugehen, dass sowohl ein erhöhter Perfusionsdruck durch Verbesserung der Mikrozirkulation, als auch eine gesteigerte oxidative Belastung durch reaktive Sauerstoffradikale ursächlich die HSP70-mRNA-Synthese erhöhen. Ergebnisse über eine EGB761-vermittelte HSP70 Induktion liegen bislang nicht vor. Kim et al. konnten jedoch in vitro bei Hepatozyten eine NO vermittelte HSP70-Induktion nachweisen ⁽¹⁴⁰⁾. Wie bereits dargestellt führt EGB761 zu einer Erhöhung der NO-Konzentration, so dass die in dieser Studie nachgewiesene Erhöhung der HSP70-mRNA-Expression durch EGB761 auch direkt durch NO vermittelt sein könnte.

Im Zusammenhang mit der gesteigerten Transaminasenerhöhung nach EGB761-Applikation, muss man davon ausgehen, dass auch in dieser Studie die HSP70-mRNA-Expression eine verstärkte Parenchymschädigung nach EGB761-Gabe reflektiert.

Dies wird unterstrichen durch eine gesteigerte EGR-1-mRNA-Expression. Egr-1 gehört zur "immediate-early"-Genfamilie und codiert einen "zinc-finger" enthaltenden Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf zelluläre Schäden induziert wird und die transkriptionelle Aktivität verschiedener Zielgene in der Kaskade der Gewebs- und Organregeneration aktiviert oder supprimiert ^(141,142,143). Vorausgegangene Studien zeigten eine gesteigerte EGR-1-Expression im Zusammenhang mit hämodynamischen Veränderungen, bei denen vermehrt Scherkräfte auftraten sowie bei Ischämie/Hypoxie und ließen eine besondere Bedeutung bei der Ausbildung des Ischämie- und Reperfusionsschaden in der Lunge vermuten ^(144,145). Müller et al. zeigte in diesem Zusammenhang eine gesteigerte intrahepatische EGR-1-Expression infolge einer portalvenösen Flußsteigerung ⁽¹⁴⁶⁾. Zudem zeigten Wung et al. einen direkten Zusammenhang zwischen reaktiven Sauerstoffradikalen und der

EGR-1-Expression ⁽¹⁴⁷⁾. Untersuchungen bezüglich EGB761 und der EGR-1-Expression liegen bislang nicht vor.

Entsprechend der aktuellen Literatur ist die gesteigerte Expression von EGR-1 in dieser Studie nach Ischämie und Reperfusion in der Versuchsgruppe (+EGB761) am ehesten durch den gesteigerten Blutfluss nach EGB761-Applikation und vermutlich durch eine größere oxidative Belastung zu erklären. Ob die EGB761-induzierte Steigerung der EGR-1-Expression ursächlich den Reperfusionsschaden mit verursacht, wie von Yan et al. bei Studien an der Lunge postuliert, bleibt Spekulation ⁽¹⁴⁸⁾.

Zusammenfassend demonstriert diese Studie eindrucksvoll, dass sich durch Ginkgo Biloba Extrakt 761 effektiv die hepatische Mikrozirkulation verbessern und die endotheliale Leukozytenadhäsion nach Ischämie und Reperfusion der Leber reduzieren lässt. Überraschenderweise ließ sich dadurch keine Reduktion des hepatischen Ischämie und Reperfusionsschadens erreichen. Letztlich müssen Folgeversuche mittels eines Langzeitmodells klären, ob es sich bei der EGB761-induzierten Transaminasenerhöhung um einen temporären Effekt handelt und ob sich letztlich durch die reduzierte Leukozytenadhäsion doch eine Reduktion des Reperfusionsschadens im postischämischen Verlauf (>6 Stunden) erzielen lässt.

Des Weiteren sollte geklärt werden ob die gesteigerte HSP70-Expression nach Ischämie und Reperfusion in der Versuchsgruppe lediglich Ausdruck eines verstärkten Reperfusionsschadens ist oder spezifisch durch EGB761 induziert wurde. Möglicherweise lässt sich die Leber durch eine EGB761-induzierte HSP70-Expression vor Ischämie und Reperfusion präkonditionieren und dadurch der hepatische Reperfusionsschaden vermindern.

5. Zusammenfassung

Diese experimentelle Studie untersuchte den Einfluss von Ginkgo Biloba Extrakt (EGB761) auf den hepatischen Reperfusionsschaden nach warmer Ischämie bei der gesunden und verfetteten Rattenleber. Ginkgo Biloba Extrakt (EGB761) ist ein standardisiertes pflanzliches Präparat dessen Wirkungsweise auf der Kombination seiner wesentlichen Bestandteile von Flavonoiden und Terpenlaktonen beruht und neben der Neutralisierung von reaktiven Sauerstoffradikalen die Wirkung des PAF antagonisiert.

Unter Verwendung eines etablierten Ischämie- und Reperusionsmodells mit 60Minuten warmer Ischämie und Reperfusion des linken Leberlappens konnte intravitalmikroskopisch gezeigt werden, dass die intravenöse Gabe von EGB761 vor Reperfusion, bei gesunden und verfetteten Rattenlebern, signifikant sowohl die postischämische Mikrozirkulation verbessert, als auch die sinusoidale Leukozytenadhäsion während der zweistündigen Reperusionsphase vermindert.

Diese Ergebnisse waren laborchemisch verbunden mit einer deutlichen Erhöhung der Serum-Transaminasen nach intravenöser EGB761-Applikation, die bei Tieren mit einer Fettleber sogar statistische Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe erreichte.

Die molekularbiologischen Untersuchungen zur Darstellung der HSP70 und EGR-1-Expression zeigten gegenüber der Kontrollgruppe eine deutlich gesteigerte Expression beider Proteine nach EGB761-Gabe und wiesen in diesem Zusammenhang letztlich auf eine Zunahme des Ischämie- und Reperfusionsschadens nach EGB761-Applikation hin.

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse dieser Studie eindrucksvoll, dass sich durch Ginkgo Biloba Extrakt 761 effektiv die hepatische Mikrozirkulation verbessern und die endotheliale Leukozytenadhäsion nach Ischämie und Reperfusion der Leber reduzieren lässt. Überraschenderweise ließ sich dadurch keine Reduktion des hepatischen Ischämie und Reperfusionsschadens erreichen.

Folgeversuche müssen zeigen ob die Transaminasenerhöhung durch EGB761 nur passager Folge einer verbesserten Mikrozirkulation und Rekrutierung nicht-perfundierter Areale ist und ob die gesteigerte HSP70-Expression spezifisch durch EGB761 induziert wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Ikeda, T., Yanaga, K., Kishikawa, K., Kakizoe, S., Shimada, M., and Sugimachi, K.: Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992; 16: 454-461
2. Kurokawa, T., Nonami, T., Harada, A., Nakao, A., and Takagi, H.: Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury of the liver. *Semin.Surg.Oncol.* 1996; 12: 179-182
3. Kudo, Y., Egashira, T., Takayama, F., Yamanaka, Y., and Shimada, T.: Investigation of the renal injury caused by liver ischemia-reperfusion in rats. *Arch.Toxicol.* 1993; 67: 502-509
4. El Wahsh, M., Seifalian, A. M., Fuller, B. J., Rolles, K., and Davidson, B. R.: Induction of adhesion molecule expression in liver ischaemia-reperfusion injury is associated with impaired hepatic parenchymal microcirculation. *Br.J.Surg.* 2004; 91: 1034-1039
5. Thiel, M., Imendorffer, S., Chouker, A., Groh, J., Briegel, J., Anthuber, M., Kramling, H. J., Arfors, K. E., Peter, K., and Messmer, K.: Expression of adhesion molecules on circulating polymorphonuclear leukocytes during orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1998; 28: 1538-1550
6. Bulkley, G. B.: Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br.J.Cancer Suppl* 1987; 8: 66-73
7. Engerson, T. D., McKelvey, T. G., Rhyne, D. B., Boggio, E. B., Snyder, S. J., and Jones, H. P.: Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues. *J.Clin.Invest* 1987; 79: 1564-1570
8. McCord, J. M., Roy, R. S., and Schaffer, S. W.: Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. *Adv.Myocardiol.* 1985; 5: 183-189

9. Yokoyama, Y., Beckman, J. S., Beckman, T. K., Wheat, J. K., Cash, T. G., Freeman, B. A., and Parks, D. A.: Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am.J.Physiol* 1990; 258: G564-G570
10. Vendemiale, G., Grattagliano, I., and Altomare, E.: An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int.J.Clin.Lab Res.* 1999; 29: 49-55
11. Grattagliano, I., Vendemiale, G., Sabba, C., Buonamico, P., and Altomare, E.: Oxidation of circulating proteins in alcoholics: role of acetaldehyde and xanthine oxidase. *J.Hepatol.* 1996; 25: 28-36
12. Jaeschke, H. and Farhood, A.: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia- reperfusion injury in rat liver. *Am.J.Physiol* 1991; 260: G355-G362
13. Fujii, S., Dale, G. L., and Beutler, E.: Glutathione-dependent protection against oxidative damage of the human red cell membrane. *Blood* 1984; 63: 1096-1101
14. Jaeschke, H. and Farhood, A.: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia- reperfusion injury in rat liver. *Am.J.Physiol* 1991; 260: G355-G362
15. Yokoyama, Y., Beckman, J. S., Beckman, T. K., Wheat, J. K., Cash, T. G., Freeman, B. A., and Parks, D. A.: Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am.J.Physiol* 1990; 258: G564-G570
16. Jaeschke, H., Bautista, A. P., Spolarics, Z., and Spitzer, J. J.: Super-oxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic.Res.Commun.* 1991; 15: 277-284

17. Wanner, G. A., Ertel, W., Muller, P., Hofer, Y., Leiderer, R., Menger, M. D., and Messmer, K.: Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 1996; 5: 34-40
18. Wang, L. Q., Ding, J. W., Persson, B. G., and Bengmark, S.: Enhanced Kupffer cell activity after repeated hepatic arterial ischaemia in an experimental model. *Br.J.Surg.* 1994; 81: 1775-1778
19. Mizuno, S., Izumi, T., and Isaji, S.: Role of PAF in acute liver injury after extended hepatectomy: overexpression of PAF receptor mRNA in Kupffer cells. *Dig.Dis.Sci.* 2001; 46: 1299-1304
20. Bautista, A. P. and Spitzer, J. J.: Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free Radic.Res.Comm.* 1992; 17: 195-209
21. Walcher, F., Marzi, I., Fischer, R., Bauer, M., and Larsen, R.: Platelet-activating factor is involved in the regulation of pathological leukocyte adhesion after liver transplantation. *J.Surg.Res.* 1996; 61: 244-249
22. Benveniste, J.: Platelet-activating factor (PAF-acether): present status. *Agents Actions* 1981; 11: 542-544
23. Camussi, G., Aglietta, M., Malavasi, F., Tetta, C., Piacibello, W., Sanavio, F., and Bussolino, F.: The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J.Immunol.* 1983; 131: 2397-2403
24. Hamamoto, I., Maeba, T., and Tanaka, S.: Role of leukocytes during the early phase of reperfusion injury after cold preservation of rat liver. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1994; 723: 476-479
25. Jaeschke, H., Farhood, A., and Smith, C. W.: Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J.* 1990; 4: 3355-3359

26. Festi, D., Colecchia, A., Sacco, T., Bondi, M., Roda, E., and Marchesini, G.: Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes.Rev.* 2004; 5: 27-42
27. Lieber, C. S.: Liver disease and alcohol: fatty liver, alcoholic hepatitis, cirrhosis, and their interrelationships. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1975; 252: 63-84
28. Malnick, S. D., Beergabel, M., and Knobler, H.: Non-alcoholic fatty liver: a common manifestation of a metabolic disorder. *QJM.* 2003; 96: 699-709
29. Stravitz, R. T. and Sanyal, A. J.: Drug-induced steatohepatitis. *Clin.Liver Dis.* 2003; 7: 435-451
30. Markin, R. S., Wisecarver, J. L., Radio, S. J., Stratta, R. J., Langnas, A. N., Hirst, K., and Shaw, B. W., Jr.: Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 1403-1409
31. Selzner, M. and Clavien, P. A.: Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin.Liver Dis.* 2001; 21: 105-113
32. Adam, R., Reynes, M., Johann, M., Morino, M., Astarcioglu, I., Kafetzis, I., Castaing, D., and Bismuth, H.: The outcome of steatotic grafts in liver transplantation. *Transplant.Proc.* 1991; 23: 1538-1540
33. Schemmer, P., Schoonhoven, R., Swenberg, J. A., Bunzendahl, H., Raleigh, J. A., Lemasters, J. J., and Thurman, R. G.: Gentle organ manipulation during harvest as a key determinant of survival of fatty livers after transplantation in the rat. *Transpl.Int.* 1999; 12: 351-359
34. Strasberg, S. M., Howard, T. K., Molmenti, E. P., and Hertl, M.: Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1994; 20: 829-838

35. Stachlewitz, R. F., Gao, W., Zhong, Z., Connor, H. D., Mason, R. P., and Thurman, R. G.: Generation of lipid free radicals by adherent leukocytes from transplanted rat liver. *Transpl.Int.* 1998; 11: 353-360
36. Grattagliano, I., Vendemiale, G., Caraceni, P., Domenicali, M., Nardo, B., Cavallari, A., Trevisani, F., Bernardi, M., and Altomare, E.: Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. *J.Nutr.* 2000; 130: 2131-2136
37. Zhong, Z., Connor, H., Stachlewitz, R. F., Frankenberg, M., Mason, R. P., Lemasters, J. J., and Thurman, R. G.: Role of free radicals in primary nonfunction of marginal fatty grafts from rats treated acutely with ethanol. *Mol.Pharmacol.* 1997; 52: 912-919
38. Thurman, R. G., Gao, W., Connor, H. D., Adachi, Y., Stachlewitz, R. F., Zhong, Z., Knecht, K. T., Bradford, B. U., Mason, R. P., and Lemasters, J. J.: Role of free radicals in failure of fatty livers following liver transplantation and alcoholic liver injury. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1996; 387: 231-241
39. Bernelli-Zazzera, A., Cairo, G., Schiaffonati, L., and Tacchini, L.: Stress proteins and reperfusion stress in the liver. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1992; 663: 120-124
40. Beckmann, R. P., Mizzen, L. E., and Welch, W. J.: Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 1990; 248: 850-854
41. Frydman, J., Nimmegern, E., Ohtsuka, K., and Hartl, F. U.: Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 1994; 370: 111-117
42. Saad, S., Kanai, M., Awane, M., Yamamoto, Y., Morimoto, T., Isselhard, W., Minor, T., Troidl, H., Ozawa, K., and Yamaoka, Y.: Protective effect of heat shock pretreatment with heat shock protein induction

before hepatic warm ischemic injury caused by Pringle's maneuver. *Surgery* 1995; 118: 510-516

43. Hutter, M. M., Sievers, R. E., Barbosa, V., and Wolfe, C. L.: Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Circulation* 1994; 89: 355-360
44. Terajima, H., Enders, G., Thiaener, A., Hammer, C., Kondo, T., Thiery, J., Yamamoto, Y., Yamaoka, Y., and Messmer, K.: Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology* 2000; 31: 407-415
45. Fujio, N., Hatayama, T., Kinoshita, H., and Yukioka, M.: Induction of mRNAs for heat shock proteins in livers of rats after ischemia and partial hepatectomy. *Mol.Cell Biochem.* 1987; 77: 173-177
46. Omar, R. and Pappolla, M.: Oxygen free radicals as inducers of heat shock protein synthesis in cultured human neuroblastoma cells: relevance to neurodegenerative disease. *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.* 1993; 242: 262-267
47. Aoe, T., Inaba, H., Kon, S., Imai, M., Aono, M., Mizuguchi, T., Saito, T., and Nishino, T.: Heat shock protein 70 messenger RNA reflects the severity of ischemia/hypoxia-reperfusion injury in the perfused rat liver. *Crit Care Med.* 1997; 25: 324-329
48. Yan, S. F., Fujita, T., Lu, J., Okada, K., Shan, Zou Y., Mackman, N., Pinsky, D. J., and Stern, D. M.: Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat.Med.* 2000; 6: 1355-1361
49. Chiu, J. J., Wung, B. S., Hsieh, H. J., Lo, L. W., and Wang, D. L.: Nitric oxide regulates shear stress-induced early growth response-1. Ex-

pression via the extracellular signal-regulated kinase pathway in endothelial cells. *Circ.Res.* 1999; 85: 238-246

50. Yan, S. F., Fujita, T., Lu, J., Okada, K., Shan, Zou Y., Mackman, N., Pinsky, D. J., and Stern, D. M.: Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat.Med.* 2000; 6: 1355-1361
51. Cao, X. M., Koski, R. A., Gashler, A., McKiernan, M., Morris, C. F., Gaffney, R., Hay, R. V., and Sukhatme, V. P.: Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol.Cell Biol.* 1990; 10: 1931-1939
52. Cohick, W. S. and Clemmons, D. R.: The insulin-like growth factors. *Annu.Rev.Physiol* 1993; 55: 131-153
53. Nair, P., Muthukkumar, S., Sells, S. F., Han, S. S., Sukhatme, V. P., and Rangnekar, V. M.: Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 20131-20138
54. Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R., and Mortier, F.: Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. *Planta Med.* 1995; 61: 126-129
55. Ginkgo biloba. *Altern.Med.Rev.* 1998; 3: 54-57
56. Marcocci, L., Packer, L., Droy-Lefaix, M. T., Sekaki, A., and Gardes-Albert, M.: Antioxidant action of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Methods Enzymol.* 1994; 234: 462-475
57. Hoerr, R.: Behavioural and psychological symptoms of dementia (BPSD): effects of EGb 761. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36 Suppl 1: S56-S61

58. Schneider, D., Schneider, L., Shulman, A., Claussen, C. F., Just, E., Koltchev, C., Kersebaum, M., Dehler, R., Goldstein, B., and Claussen, E.: Ginkgo biloba (Rokan) therapy in tinnitus patients and measurable interactions between tinnitus and vestibular disturbances. *Int.Tinnitus.J.* 2000; 6: 56-62
59. Morgenstern, C. and Biermann, E.: The efficacy of Ginkgo special extract EGb 761 in patients with tinnitus. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* 2002; 40: 188-197
60. Peters, H., Kieser, M., and Holscher, U.: Demonstration of the efficacy of ginkgo biloba special extract EGb 761 on intermittent claudication--a placebo-controlled, double-blind multicenter trial. *Vasa* 1998; 27: 106-110
61. Le Bars, P. L., Katz, M. M., Berman, N., Itil, T. M., Freedman, A. M., and Schatzberg, A. F.: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group. *JAMA* 1997; 278: 1327-1332
62. Pietri, S., Maurelli, E., Drieu, K., and Culcasi, M.: Cardioprotective and anti-oxidant effects of the terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *J.Mol.Cell Cardiol.* 1997; 29: 733-742
63. Schneider, B.: [Ginkgo biloba extract in peripheral arterial diseases. Meta-analysis of controlled clinical studies]. *Arzneimittelforschung.* 1992; 42: 428-436
64. Droy-Lefaix, M. T., Menerath, J. M., Szabo-Tosaki, E., Guillaumin, D., and Doly, M.: Protective effect of EGb 761 on ischemia-reperfusion damage in the rat retina. *Transplant.Proc.* 1995; 27: 2861-2862
65. Z'Brun, A.: [Ginkgo--myth and reality]. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* 1995; 84: 1-6

66. Liebgott, T., Miollan, M., Berchadsky, Y., Drieu, K., Culcasi, M., and Pietri, S.: Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of Ginkgo biloba extract (EGB 761) during ischemia and reperfusion. *Basic Res.Cardiol.* 2000; 95: 368-377
67. Szabo, M. E., Droy-Lefaix, M. T., Doly, M., and Braquet, P.: Free radical-mediated effects in reperfusion injury: a histologic study with superoxide dismutase and EGB 761 in rat retina. *Ophthalmic Res.* 1991; 23: 225-234
68. Abe, T., Unno, M., Takeuchi, H., Kakita, T., Katayose, Y., Rikiyama, T., Morikawa, T., Suzuki, M., and Matsuno, S.: A new free radical scavenger, edaravone, ameliorates oxidative liver damage due to ischemia-reperfusion in vitro and in vivo. *J.Gastrointest.Surg.* 2004; 8: 604-615
69. Nagel, E., Meyer, zu, V, Bartels, M., and Pichlmayr, R.: Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 1997; 67: 298-306
70. Nishiyama, R., Nakamura, S., Suzuki, S., and Baba, S.: Platelet-activating factor in hepatic ischemia/reperfusion injury. The effects of a PAF antagonist combined with a prostaglandin I₂ analogue. *Transplantation* 1993; 55: 1261-1265
71. Teramoto, K., Bowers, J. L., Khettry, U., Palombo, J. D., and Clouse, M. E.: A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 1993; 55: 737-741
72. Vollmar, B., Rucker, M., and Menger, M. D.: A new method for the intravital microscopic quantification of hepatic sinusoidal perfusion failure using the dye bisbenzamide H33342. *Microvasc.Res.* 1996; 51: 250-259

73. Finkenauer, V., Bissinger, T., Funk, R. H., Karbowski, A., and Seiffge, D.: Confocal laser scanning microscopy of leukocyte adhesion in the microcirculation of the inflamed rat knee joint capsule. *Microcirculation*. 1999; 6: 141-152
74. Vollmar, B., Lang, G., Menger, M. D., and Messmer, K.: Hypertonic hydroxyethyl starch restores hepatic microvascular perfusion in hemorrhagic shock. *Am.J.Physiol* 1994; 266: H1927-H1934
75. Knoefel, W. T., Kollias, N., Rattner, D. W., Nishioka, N. S., and Warshaw, A. L.: Reflectance spectroscopy of pancreatic microcirculation. *J.Appl.Physiol* 1996; 80: 116-123
76. Abdalla, E. K., Noun, R., and Belghiti, J.: Hepatic vascular occlusion: which technique? *Surg.Clin.North Am.* 2004; 84: 563-585
77. Lenz, K., Kleinberger, G., Druml, W., and Laggner, A.: [Shock liver]. *Leber Magen Darm* 1982; 12: 198-202
78. Kurokawa, T. and Takagi, H.: Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transplant.Proc.* 1999; 31: 1775-1776
79. Zamboni, F., Franchello, A., David, E., Rocca, G., Ricchiuti, A., Lavezzo, B., Rizzetto, M., and Salizzoni, M.: Effect of macrovesicular steatosis and other donor and recipient characteristics on the outcome of liver transplantation. *Clin.Transplant.* 2001; 15: 53-57
80. Selzner, M., Rudiger, H. A., Sindram, D., Madden, J., and Clavien, P. A.: Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology* 2000; 32: 1280-1288
81. Jaeschke, H. and Farhood, A.: Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am.J.Physiol* 1991; 260: G355-G362

82. Jaeschke, H.: Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem.Biol.Interact.* 1991; 79: 115-136
83. Khandoga, A., Biberthaler, P., Messmer, K., and Krombach, F.: Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc.Res.* 2003; 65: 71-77
84. Lemasters, J. J. and Thurman, R. G.: Reperfusion injury: a role for neutrophils. *Hepatology* 1991; 14: 954-955
85. Walsh, T. R., Rao, P. N., Makowka, L., and Starzl, T. E.: Lipid peroxidation is a nonparenchymal cell event with reperfusion after prolonged liver ischemia. *J.Surg.Res.* 1990; 49: 18-22
86. Amersi, F., Dulkanchainun, T., Nelson, S. K., Farmer, D. G., Kato, H., Zaky, J., Melinek, J., Shaw, G. D., Kupiec-Weglinski, J. W., Horwitz, L. D., Horwitz, M. A., and Busuttil, R. W.: A novel iron chelator in combination with a P-selectin antagonist prevents ischemia/reperfusion injury in a rat liver model. *Transplantation* 2001; 71: 112-118
87. Marzi, I., Knee, J., Buhren, V., Menger, M., and Trentz, O.: Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation. *Surgery* 1992; 111: 90-97
88. Sepodes, B., Maio, R., Pinto, R., Marques, C., Mendes-do-Vale, J., McDonald, M. C., Thiemermann, C., and Mota-Filipe, H.: Tempol, an intracellular free radical scavenger, reduces liver injury in hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplant.Proc.* 2004; 36: 849-853
89. Biber, A.: Pharmacokinetics of Ginkgo biloba extracts. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36 Suppl 1: S32-S37
90. Kanowski, S. and Hoerr, R.: Ginkgo biloba extract EGb 761 in dementia: intent-to-treat analyses of a 24-week, multi-center, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36: 297-303

91. Mouren, X., Caillard, P., and Schwartz, F.: Study of the antiischemic action of EGb 761 in the treatment of peripheral arterial occlusive disease by TcPo₂ determination. *Angiology* 1994; 45: 413-417
92. Goto, M., Kawano, S., Yoshihara, H., Takei, Y., Hijioka, T., Fukui, H., Matsunaga, T., Oshita, M., Kashiwagi, T., Fusamoto, H., and .: Hepatic tissue oxygenation as a predictive indicator of ischemia-reperfusion liver injury. *Hepatology* 1992; 15: 432-437
93. Ikeda, T., Yanaga, K., Kishikawa, K., Kakizoe, S., Shimada, M., and Sugimachi, K.: Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992; 16: 454-461
94. Vollmar, B., Glasz, J., Leiderer, R., Post, S., and Menger, M. D.: Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am.J.Pathol.* 1994; 145: 1421-1431
95. Pannen, B. H., Al Adili, F., Bauer, M., Clemens, M. G., and Geiger, K. K.: Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 755-764
96. Kawamura, E., Yamanaka, N., Okamoto, E., Tomoda, F., and Furukawa, K.: Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 1995; 21: 1138-1143
97. Goto, M., Takei, Y., Kawano, S., Nagano, K., Tsuji, S., Masuda, E., Nishimura, Y., Okumura, S., Kashiwagi, T., Fusamoto, H., and .: Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology* 1994; 19: 675-681
98. Tran-Thi, T. A., Kawada, N., and Decker, K.: Regulation of endothelin-1 action on the perfused rat liver. *FEBS Lett.* 1993; 318: 353-357

99. Eum, H. A. and Lee, S. M.: Effect of Trolox on altered vasoregulatory gene expression in hepatic ischemia/reperfusion. *Arch.Pharm.Res.* 2004; 27: 225-231
100. Saito, T., Fushimi, E., Tamura, T., Fujiwara, Y., Miura, H., Watanabe, H., Kibira, S., Hasegawa, H., and Miura, M.: L-nitro-arginine inhibits increase in endothelin binding sites induced by ischemia and reperfusion. *J.Mol.Cell Cardiol.* 2002; 34: 1041-1047
101. Kobayashi, H., Nonami, T., Kurokawa, T., Takeuchi, Y., Harada, A., Nakao, A., and Takagi, H.: Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J.Surg.Res.* 1995; 59: 772-779
102. Maitra, I., Marcocci, L., Droy-Lefaix, M. T., and Packer, L.: Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochem.Pharmacol.* 1995; 49: 1649-1655
103. Noda, Y., Anzai, K., Mori, A., Kohno, M., Shinmei, M., and Packer, L.: Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem.Mol.Biol.Int.* 1997; 42: 35-44
104. Pincemail, J., Dupuis, M., Nasr, C., Hans, P., Haag-Berrurier, M., Anton, R., and Deby, C.: Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia* 1989; 45: 708-712
105. Billiar, T. R.: The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology* 1995; 108: 603-605
106. Li, Z., Nakaya, Y., Niwa, Y., and Chen, X.: K(Ca) channel-opening activity of Ginkgo Biloba extracts and ginsenosides in cultured endothelial cells. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 2001; 28: 441-445

107. Kurtsoy, A., Canbay, S., Oktem, I. S., Akdemir, H., Koc, R. K., Menku, A., and Tucer, B.: Effect of EGb-761 on vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *Res.Exp.Med.(Berl)* 2000; 199: 207-215
108. Zhang, J., Fu, S., Liu, S., Mao, T., and Xiu, R.: The therapeutic effect of Ginkgo biloba extract in SHR rats and its possible mechanisms based on cerebral microvascular flow and vasomotion. *Clin.Hemorheol.Microcirc.* 2000; 23: 133-138
109. Koneru, B., Reddy, M. C., dela Torre, A. N., Patel, D., Ippolito, T., and Ferrante, R. J.: Studies of hepatic warm ischemia in the obese Zucker rat. *Transplantation* 1995; 59: 942-946
110. Sun, C. K., Zhang, X. Y., Zimmermann, A., Davis, G., and Wheatley, A. M.: Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation* 2001; 72: 1625-1631
111. Shiratori, Y., Kiriyaama, H., Fukushi, Y., Nagura, T., Takada, H., Hai, K., and Kamii, K.: Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig.Dis.Sci.* 1994; 39: 1265-1272
112. Walsh, T. R., Rao, P. N., Makowka, L., and Starzl, T. E.: Lipid peroxidation is a nonparenchymal cell event with reperfusion after prolonged liver ischemia. *J.Surg.Res.* 1990; 49: 18-22
113. Zimmerman, B. J., Grisham, M. B., and Granger, D. N.: Mechanisms of oxidant-mediated microvascular injury following reperfusion of the ischemic intestine. *Basic Life Sci.* 1988; 49: 881-886
114. Cutrin, J. C., Llesuy, S., and Boveris, A.: Primary role of Kupffer cell-hepatocyte communication in the expression of oxidative stress in the post-ischaemic liver. *Cell Biochem.Funct.* 1998; 16: 65-72
115. Jaeschke, H.: Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem.Biol.Interact.* 1991; 79: 115-136

116. Mizuno, S., Izumi, T., and Isaji, S.: Role of PAF in acute liver injury after extended hepatectomy: overexpression of PAF receptor mRNA in Kupffer cells. *Dig.Dis.Sci.* 2001; 46: 1299-1304
117. Yamakawa, Y., Takano, M., Patel, M., Tien, N., Takada, T., and Bulkley, G. B.: Interaction of platelet activating factor, reactive oxygen species generated by xanthine oxidase, and leukocytes in the generation of hepatic injury after shock/resuscitation. *Ann.Surg.* 2000; 231: 387-398
118. Serizawa, A., Nakamura, S., Suzuki, Baba, S., and Nakano, M.: Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996; 23: 1656-1663
119. Bautista, A. P. and Spitzer, J. J.: Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free Radic.Res.Comm.* 1992; 17: 195-209
120. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Mehra, M., and Prescott, S. M.: Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. *J.Cell Biol.* 1990; 110: 529-540
121. Sterner-Kock, A., Braun, R. K., Schrenzel, M. D., and Hyde, D. M.: Recombinant tumour necrosis factor-alpha and platelet-activating factor synergistically increase intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin-dependent neutrophil adherence to endothelium in vitro. *Immunology* 1996; 87: 454-460
122. Jaeschke, H. and Smith, C. W.: Cell adhesion and migration. III. Leukocyte adhesion and transmigration in the liver vasculature. *Am.J.Physiol* 1997; 273: G1169-G1173
123. Schutz, E., Wieland, E., Hensel, A., Niedmann, P. D., Dreiss, A., Armstrong, V. W., Schuff-Werner, P., and Oellerich, M.: Suppression of

- leukocyte-enhanced cold ischemia/reperfusion injury of liver endothelium with the benzoquinone antioxidant idebenone. *Clin.Biochem.* 1997; 30: 619-624
124. Sewerynek, E., Reiter, R. J., Melchiorri, D., Ortiz, G. G., and Lewinski, A.: Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepatogastroenterology* 1996; 43: 898-905
125. Smith, P. F., MacLennan, K., and Darlington, C. L.: The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a review of the possible relationship to platelet-activating factor (PAF). *J.Ethnopharmacol.* 1996; 50: 131-139
126. Taniai, H., Suematsu, M., Suzuki, T., Norimizu, S., Hori, R., Ishimura, Y., and Nimura, Y.: Endothelin B receptor-mediated protection against anoxia-reoxygenation injury in perfused rat liver: nitric oxide-dependent and -independent mechanisms. *Hepatology* 2001; 33: 894-901
127. Kawachi, S., Hines, I. N., Laroux, F. S., Hoffman, J., Bharwani, S., Gray, L., Leffer, D., and Grisham, M. B.: Nitric oxide synthase and postischemic liver injury. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000; 276: 851-854
128. Lin, H. I., Wang, D., Leu, F. J., Chen, C. F., and Chen, H. I.: Ischemia and reperfusion of liver induces eNOS and iNOS expression: effects of a NO donor and NOS inhibitor. *Chin J.Physiol* 2004; 47: 121-127
129. Uhlmann, D., Glasser, S., Lauer, H., Ludwig, S., Gaebel, G., Serr, F., Hauss, J., and Witzigmann, H.: Endothelin-a receptor blockade improves postischemic hepatic microhemodynamics. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 2004; 44 Suppl 1: S103-S104
130. Pannen, B. H., Al Adili, F., Bauer, M., Clemens, M. G., and Geiger, K. K.: Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 1998; 27: 755-764

131. Arthur, M. J.: Reactive oxygen intermediates and liver injury. *J.Hepatol.* 1988; 6: 125-131
132. Fujio, N., Hatayama, T., Kinoshita, H., and Yukioka, M.: Induction of four heat-shock proteins and their mRNAs in rat after whole-body hyperthermia. *J.Biochem.(Tokyo)* 1987; 101: 181-187
133. Martinez, J., Perez-Serrano, J., Bernadina, W. E., and Rodriguez-Caabeiro, F.: Using heat shock proteins as indicators of the immune function in wistar rats during a secondary *Trichinella spiralis* infection. *Vet.Parasitol.* 1999; 85: 269-275
134. Tacchini, L., Pogliaghi, G., Radice, L., Anzon, E., and Bernelli-Zazzera, A.: Differential activation of heat-shock and oxidation-specific stress genes in chemically induced oxidative stress. *Biochem.J.* 1995; 309 (Pt 2): 453-459
135. Araya, J., Tsuruma, T., Hirata, K., Yagihashi, A., Katsuramaki, T., Tarumi, K., Yanai, Y., and Watanabe, N.: Induction of heat shock protein-70 (hsp-70) reduces preservation injury in rat IEC-18 intestinal epithelial cells. *Transplant.Proc.* 2000; 32: 1663-1664
136. Doi, Y., Hamazaki, K., Yabuki, M., Tanaka, N., and Utsumi, K.: Effect of HSP70 induced by warm ischemia to the liver on liver function after partial hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 533-540
137. Schiaffonati, L., Cairo, G., Tacchini, L., Pappalardo, C., Gatti, S., Piazzini-Albani, A., and Bernelli-Zazzera, A.: Protein synthesis and gene expression in transplanted and postischemic livers. *Transplantation* 1993; 55: 977-982
138. Kukreja, R. C., Kontos, M. C., Loesser, K. E., Batra, S. K., Qian, Y. Z., Gbur, C. J., Jr., Naseem, S. A., Jesse, R. L., and Hess, M. L.: Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *Am.J.Physiol* 1994; 267: H2213-H2219

139. Marini, M., Frabetti, F., Musiani, D., and Franceschi, C.: Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. *Int.J.Radiat.Biol.* 1996; 70: 337-350
140. Kim, Y. M., de Vera, M. E., Watkins, S. C., and Billiar, T. R.: Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J.Biol.Chem.* 1997; 272: 1402-1411
141. Bonventre, J. V., Sukhatme, V. P., Bamberger, M., Ouellette, A. J., and Brown, D.: Localization of the protein product of the immediate early growth response gene, Egr-1, in the kidney after ischemia and reperfusion. *Cell Regul.* 1991; 2: 251-260
142. Peng, Y., Du, K., Ramirez, S., Diamond, R. H., and Taub, R.: Mitogenic up-regulation of the PRL-1 protein-tyrosine phosphatase gene by Egr-1. Egr-1 activation is an early event in liver regeneration. *J.Biol.Chem.* 1999; 274: 4513-4520
143. Yan, S. F., Fujita, T., Lu, J., Okada, K., Shan, Zou Y., Mackman, N., Pinsky, D. J., and Stern, D. M.: Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat.Med.* 2000; 6: 1355-1361
144. Houston, P., Dickson, M. C., Ludbrook, V., White, B., Schwachtgen, J. L., McVey, J. H., Mackman, N., Reese, J. M., Gorman, D. G., Campbell, C., and Braddock, M.: Fluid shear stress induction of the tissue factor promoter in vitro and in vivo is mediated by Egr-1. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 1999; 19: 281-289
145. Miyatake, Y., Ikeda, H., Michimata, R., Koizumi, S., Ishizu, A., Nishimura, N., and Yoshiki, T.: Differential modulation of gene expression among rat tissues with warm ischemia. *Exp.Mol.Pathol.* 2004; 77: 222-230

146. Mueller, L., Broering, D. C., Meyer, J., Vashist, Y., Goettsche, J., Wilms, C., and Rogiers, X.: The induction of the immediate-early-genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J.Hepatol.* 2002; 37: 606-612
147. Wung, B. S., Cheng, J. J., Chao, Y. J., Hsieh, H. J., and Wang, D. L.: Modulation of Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway by reactive oxygen species is involved in cyclic strain-induced early growth response-1 gene expression in endothelial cells. *Circ.Res.* 1999; 84: 804-812
148. Yan, S. F., Zou, Y. S., Gao, Y., Zhai, C., Mackman, N., Lee, S. L., Milbrandt, J., Pinsky, D., Kisiel, W., and Stern, D.: Tissue factor transcription driven by Egr-1 is a critical mechanism of murine pulmonary fibrin deposition in hypoxia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998; 95: 8298-8303

7. Danksagung

Prof. Dr. W.T. Knoefel, Direktor der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, möchte ich herzlichst für die Unterstützung und Förderung dieser Arbeit vor und nach meinem Wechsel an das Universitätsklinikum Düsseldorf danken.

Meine Danksagung gilt weiter Prof. Dr. Dr. h.c. X. Rogiers, Direktor der Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Überlassung des Themas und und PD Dr. M. Gundlach für die ausgezeichnete Betreuung während der Dissertation.

Besonderer Dank gebührt Dr. Stefan Topp, für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, stete Bereitschaft zur kritischen Diskussion der Ergebnisse meiner Arbeit und vor allem für die Ermutigung zur Bewerbung für das Werner-Otto Stipendium.

Auf diesem Wege möchte ich mich bei der Werner-Otto-Stiftung für das Stipendium für medizinischen wissenschaftlichen Nachwuchs bedanken, mit dessen Hilfe mir die Durchführung dieser Arbeit in vielerlei Hinsicht erleichtert wurde. Dank der großzügigen finanziellen Unterstützung war es mir möglich, mich voll und ganz der wissenschaftlichen Arbeit zu widmen und an verschiedenen, auch internationalen Kongressen teilzunehmen.

Für die stetige Unterstützung bei der labortechnischen und tierexperimentellen Arbeit und die immerwährende Hilfsbereitschaft, möchte ich mich herzlichst bei Frau Silke Brillhoff, Vet.-MTA im Chirurgischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern der Klinik für Allgemeinchirurgie, der Klinik für Hepatobiliäre und Transplantations Chirurgie und der Abteilung für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die sehr angenehme Zusammenarbeit danken.

8. Lebenslauf

Am 8. Oktober 1976 wurde ich als Tochter des Dipl.-Ing. Prof. Dr. Albrecht Schutte und seiner Frau Anne-Kathrin, geborene Eimecke, in Lemgo geboren.

Die Grundschule Kampstraße in Lemgo besuchte ich von 1982 bis 1986. Es folgte von 1986 bis 1995 der Besuch des Annette-von-Droste-Hülshof-Gymnasiums in Gelsenkirchen-Buer mit Erlangung der allgemeinen Hochschulreife.

Zum Wintersemester 1995 trat ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg an und absolvierte im Frühjahr 1998 das Physikum, im Frühjahr 2000 das erste Staatsexamen und im Frühjahr 2002 das zweite Staatsexamen.

Vom September 2000 bis zum September 2001 erhielt ich das Werner-Otto-Stipendium zur Förderung des medizinischen wissenschaftlichen Nachwuchses.

Von 1996 bis 2003 arbeitete ich als studentische Aushilfskraft in der Chirurgischen Notaufnahme des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Nach Vollendung des Praktischen Jahres konnte ich das Medizinstudium im Mai 2003 mit dem dritten Staatsexamen abschließen.

Seit September 2003 arbeite ich als Ärztin im Praktikum/wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

9. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werks kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Anja Schutte

Einfluß von Ginkgo Biloba Extrakt (EGB 761) auf den Reperfusionsschaden nach warmer Ischämie der gesunden und verfetteten Rattenleber

A. Schutte

Einleitung: Zeitlich begrenzte Organischämie und Reperfusion (I/R) bewirkt über mikrozirkulatorische und metabolische Veränderungen eine Schädigung des Organs, die unter anderem durch Bildung freier Radikale hervorgerufen wird. Ginkgo Biloba Extrakt (EGB761) ist ein standardisiertes pflanzliches Präparat, das reaktive Sauerstoffradikale neutralisiert. Diese Studie untersucht die Wirkungen von EGB761 auf den Reperfusionsschaden nach warmer Ischämie der gesunden und verfetteten Rattenleber.

Material und Methoden: Bei 10 Lewis-Ratten wurde für 60 Min. eine warme Ischämie des linken Leberlappens induziert. 10 Minuten vor der 2-stündigen Reperfusion erfolgte bei der Hälfte der Tiere die Applikation von EGB761. Tiere ohne Ischämie dienten als Kontrolle. Die Mikrozirkulation und Leukozytenadhäsion wurden durch intravitale Fluoreszenzmikroskopie beurteilt. Transaminasen und die Expression von Heat Shock Protein 70 (HSP70) und Early Growth Response Faktor-1 (EGR-1) mRNA dienten als Parameter der hepatozellulären Integrität.

Ergebnisse: Die Gabe von EGB761 verbesserte bei allen Rattenlebern signifikant die postischämische Mikrozirkulation und verminderte die sinusoidale Leukozytenadhäsion während der Reperfusion. Die Verbesserung der Mikrozirkulation korrelierte nicht mit einer Verminderung der Serum-Transaminasen. Die HSP70 und EGR-1 mRNA Expression nach EGB761-Gabe war gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Diskussion: Die Ergebnisse dieser Studie zeigen eindrucksvoll, dass sich durch EGB761 effektiv die hepatische Mikrozirkulation verbessern und die endotheliale Leukozytenadhäsion nach Ischämie und Reperfusion der Leber reduzieren lässt. Überraschenderweise konnte keine Reduktion des hepatischen Ischämie und Reperfusionsschadens erreicht werden. Folgeversuche müssen zeigen ob die Transaminasenerhöhung durch EGB761 nur passager Folge einer verbesserten Mikrozirkulation und Rekrutierung nicht-perfundierter Areale ist und ob die gesteigerte HSP70-Expression spezifisch durch EGB761 induziert wird.

