

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Hämoglobin-Glutamer 200 reduziert den
Reperfusionsschaden der Rattenleber durch HO-1
Induktion während der Organreperfusion nach
kalter Ischämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Arne Macher

2014

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: apl. Prof. Dr. med. S. A. Topp

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. med. D. Graf

Meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

S. A. Topp, A. Krieg, A. Koch, C. M. Tidden, U. Ramp, T. Hohlfeld, A. Macher, J. Schulte am Esch, C. F. Eisenberger, N. H. Stoecklein, W. T. Knoefel. **Hemoglobin-glutamer 200 reduces reperfusion injury of the cold preserved rat liver by induction of heme oxygenase-1.** J Surg Res 2008 Dec.;150(2):243–254.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Ziele der Studie	15
1.2 Fragestellungen	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Tierversuchsgenehmigung	17
2.2 Versuchstiere	17
2.3 Hepatektomie	17
2.4 Reperfusion am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber	19
2.5 Experimentelle Gruppen und Versuchsablauf	23
2.6 Laborchemische Analysen	25
2.7 Messung der portalvenösen Flussrate	26
2.8 Histologische Beurteilung des Ischämie-Reperfusionsschadens	27
2.9 Spektrofluorimetrische Quantifizierung von Malondialdehyd (MDA) im Perfusat	28
2.10 Detektion der Apoptose mit Terminal Desoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) Assay	30
2.11 Western Blot-Analyse für HO-1	32
2.12 Statistische Analyse	36
3. Ergebnisse	37
3.1 Effekt von HbG200 auf Hämoglobin, Hämatokrit und Blutgase während der Reperfusion	37
3.2 Effekt von HbG200 auf die portalvenöse Flussrate	42
3.3 Der Effekt von HbG200 auf den Reperfusionsschaden	44
3.4 Histologische Analyse des Reperfusionsschadens	48
3.5 Analyse der Leberfunktion und der HO-Aktivität	51
3.6 Erhöhte Lipidperoxydation nach Leberreperfusion mit HbG200	53

<i>3.6 Ausmaß der hepatischen Apoptose nach kalter Organkonservierung und Reperfusion</i>	55
<i>3.7 Der Effekt des HbG200 auf die HO-1 Expression und die HO-Aktivität</i>	57
4. Diskussion	59
5. Zusammenfassung	65
6. Literaturverzeichnis	66
7. Anhang	78
<i>7.1 Abbildungsverzeichnis</i>	78
<i>7.2 Abkürzungsverzeichnis</i>	80
<i>7.3 Reaktionslösungen zur Gelelektrophorese</i>	83
<i>7.5 Kopie des Übungsscheins Tierversuchskurs</i>	86
8. Danksagungen	87
9. Lebenslauf	89
10. Eidesstattliche Versicherung	92

1. Einleitung

Seit den 80er-Jahren hat sich die Lebertransplantation zu einem Routine-Therapieverfahren für Patienten mit Lebererkrankungen entwickelt^{1,2}. Mit zunehmender Erfahrung im chirurgischen und perioperativen Management sowie der Entwicklung neuer Medikamente zur Immunsuppression und antiviralen Therapie haben sich die Ergebnisse der Transplantation so weit verbessert, dass bei geeigneten Patienten in erfahrenen Zentren 1-Jahres-Überlebensraten von 90% und 1-Jahres-Transplantatüberlebensraten von 80% oder sogar darüber erzielt werden können^{3,4}. Dabei hängt das Ergebnis im Einzelfall vom klinischen Zustand des Patienten vor der Transplantation, von der Grunderkrankung des Patienten und dessen Management, von Komorbiditäten und vor allem von der Qualität des Spenderorgans ab⁵.

Das zentrale Problem bei der Lebertransplantation ist heutzutage nach wie vor der ausgeprägte Mangel an verfügbaren Spenderorganen. Verschiedene Berichte weltweit geben eine Mortalität zwischen 5% und 10% für Patienten auf Organwartelisten an und beziffern diejenigen Patienten, die aufgrund des Organmangels und einer zwischenzeitlichen Verschlechterung ihrer Grunderkrankung von den Wartelisten genommen werden müssen mit circa 8%⁶. Basierend auf vielversprechenden Daten von verschiedenen Transplantationszentren weltweit werden zunehmend sogenannte „marginal grafts“ – grenzwertige Transplantatorgane – im Rahmen von erweiterten Einschlusskriterien („extended criteria“) verwendet^{7,8}. Für den Begriff „marginal graft“ existiert keine feste Definition, man kann diese Transplantate als Organe mit einem erhöhten Risiko der Organdysfunktion oder erhöhtem Organversagen umschreiben, so dass der Organempfänger einem höheren Risiko von Morbidität und Mortalität ausgesetzt ist. Auch gibt es keinen Konsens, welche spezifischen Faktoren ein Transplantatorgan als grenzwertig definieren oder welche Faktoren oder Kombination dergleichen zu einer Ablehnung eines grenzwertigen Organs führen⁹. Grundlegend kann man zwei Gruppen von „marginal grafts“ unterscheiden: die eine Gruppe beinhaltet Organe, die das Risiko besitzen Infektionen oder maligne Erkrankungen an den Empfänger zu übertragen; die andere Gruppe umfasst Organe mit einem hohen Risiko technischer Komplikationen und beeinträchtigter

Organfunktion, zum Beispiel steatotische Lebern, Organe von sogenannten „non-heart beating Donors (NHBD)“, ältere Organspender, Split-Lebern oder Organe mit langer Ischämiezeit⁸. Während in der ersten Gruppe heutzutage routinemäßig Hepatitis C virus-positive (HCV+) oder Hepatitis B core Antikörper-positive Spender für gleichsam positiv getestete Empfänger zugelassen sind, sollten Organe bei bekannter maligner Grunderkrankung nicht zur Transplantation genutzt werden¹⁰. Beispielhaft für die zweite Gruppe seien die steatotisch vorgeschädigten Lebern aufgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass diese durch Fetteinlagerung beeinträchtigten Organe aufgrund einer geringeren Hypoxietoleranz anfälliger für eine Organschädigung während der Reoxygenierung im Rahmen der Reperfusion sind, so dass das Risiko einer initial poor function (IPF) oder primary non-function (PNF) deutlich erhöht ist^{11,12}.

Die Evaluation des transplantierten Organs in Bezug auf seine Funktion ist ein entscheidender Aspekt des perioperativen Managements. Sie beginnt bereits intraoperativ nach der in-vivo Reperfusion der Spenderleber wo ein besonderes Augenmerk auf Organtexturierung und Farbe, Galleproduktion und Wiederherstellung der hämodynamischen Stabilität gerichtet wird. Die postoperative Leberfunktionsprüfung umfasst klinische Zeichen und Erhebung leberspezifischer Laborparameter wie die Normalisierung der plasmatischen Gerinnungswerte, Ausgleich einer Hypoglykämie und Reduktion einer Hyperbilirubinämie. Die Leberenzyme ALT und AST steigen in den ersten 48 bis 72 Stunden nach Transplantation deutlich an und sind in den nachfolgenden 24 bis 48 Stunden einem Regress unterworfen. Persistieren erhöhte Leberenzyme und ist die Prothrombinzeit erhöht, so spricht man von einer initial poor function (IPF) oder primären Dysfunktion des Transplantats^{13,14}. Eine noch schwerwiegendere Komplikation ist die so genannte primary non-function (PNF), das Transplantatversagen. Die PNF ist gekennzeichnet durch persistierende Hypoglykämie, Koagulopathie, fehlende oder geringe Galleproduktion, hohe und weiter steigende Leberenzymparameter, Koma, Nierenversagen und kardiogenen Schock. Die PNF führt ohne Retransplantation zum Tod des Patienten¹⁵.

Risikofaktoren für eine IPF oder PNF des Spenderorgans sind eine Spenderhospitalisierung länger als 3 Tage, ein Spenderalter größer als 49 Jahre, eine pathologisch gesicherte Leberzellverfettung (Steatose) und Transplantationen größenreduzierter Transplantatorgane sowie das Auftreten einer Niereninsuffizienz¹⁶. PLOEG et al. fanden 1993 heraus, dass bei Auftreten einer IPF des Lebertransplantates das Organversagen signifikant häufiger auftritt¹⁶.

Alle Spenderorgane, die transplantiert werden, erfahren nach Entnahme eine Schädigung, die durch die Organkonservierung und die Reperfusion im Empfängerorganismus hervorgerufen wird. Dieser Ischämie- und Reperfusionsschaden ist ein multifaktorieller Prozess, der je nach Ausprägung wesentlich die postoperative Funktion des Spenderorgans beeinflusst^{17,18}. Die hepatische Ischämie und Reperfusion (I/R) ist häufig mit der Zerstörung von verschiedenen Leberzellen assoziiert und trägt in bis zu 30% der Fälle zur IPF nach Lebertransplantation bei und kann - im schlimmsten Fall - in bis zu 5% der Fälle zu einer PNF des Spenderorgans führen¹⁹. In histopathologischen Untersuchungen zur Evaluation des Ausmaßes der Gewebeschädigung nach I/R der Leber zeigen sich unter anderem zelluläre Schwellung, Vakuolisierung, Aufschluss der Endothelzellintegrität und Leukozyteninfiltration. Dabei sind nicht-parenchymatöse Zellen der Leber (Kupffer-Zellen, sinusoidale Endothelzellen, Ito-Zellen) anfälliger für Schäden durch kalte Ischämie und Reperfusion als Hepatozyten²⁰.

Die kalte Ischämie (Organkonservierung) der Leber verursacht im Wesentlichen eine Schädigung des sinusoidalen Endothels und korreliert direkt mit dem Ausmaß des Reperfusionsschadens nach Wiederherstellung des Blutflusses. Die Organschädigung während der Reperfusion hingegen hängt auf zellulärer Ebene im Wesentlichen von drei Faktoren ab: (1) dem Ausmaß der Kupffer-Zellaktivierung, (2) dem Grad der Plättchen- und Leukozytenaktivierung und (3) dem Ausmaß der freigesetzten Entzündungsmediatoren²¹.

Die sinusoidalen Endothelzellen (SEC) sind der anfälligste Zelltyp, die während der Phase der kalten Ischämie im Rahmen der Lebertransplantation geschädigt werden^{22,23}. Während der kalten Ischämie tritt in diesen Zellen eine Inhibierung der Ca²⁺-ATPase

auf, wodurch es zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt²⁴. Dieser Calcium-Einstrom führt zur Aktivierung calcium-abhängiger Enzyme wie Calpain, Endonukleasen, ATPasen und Phospholipasen. Die erhöhte Calpain-Aktivität bewirkt einen Abbau von Aktin-Stressfasern in den sinusoidalen Endothelzellen und bewirkt eine Zellschwellung und Zellabrundung²⁵. Außerdem kommt es durch den Actin-Abbau zu einer Freisetzung von zink-abhängigen Endopeptidasen, den Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9) an der Oberfläche der sinusoidalen Endothelzellen²⁶. Diese Matrix-Metalloproteinasen liegen in einem präformierten inaktivierten Zustand an der Zelloberfläche von Endothelzellen vor und können durch verschiedene Stimuli aktiviert werden²⁷⁻²⁹. Matrix-Metalloproteinasen vermögen pro-TNF α an der Zelloberfläche zu TNF α zu modulieren, der aktivierte Entzündungsmediator führt wiederum zu einer Thrombozytenadhäsion³⁰. Eine derartige Aktivierung der Zelloberfläche der sinusoidalen Endothelzellen durch Kälte findet sich gleichsam durch vermehrte Expression von von-Willebrand Faktor (vWF). vWF ist ein Rezeptormolekül für Thrombozyten. Die vermehrte Expression von vWF an der Oberfläche der sinusoidalen Endothelzellen führt zu einer gesteigerten Plättchenadhäsion³¹. Inaktive Plättchen lagern sich an vWF von Endothelzellen an und werden dadurch aktiviert. Thrombozyten beinhalten unter anderem reichlich Calpain³² und reaktive Sauerstoffspezies wie Stickstoffmonoxid (NO)³³, Substanzen die wiederum zur Zellschädigung beitragen³⁴.

Mit Beginn der Reperfusionphase verschlechtern Leukozyten und Thrombozyten synergistisch die sinusoidale Endothelzellschädigung durch Induktion von Apoptose über einen Kupffer-Zell abhängigen Mechanismus³⁵. Kupffer-Zellen werden durch Toll-like Receptor-4 vermittelte Signalwege und Komplement aktiviert^{36,37}. Dabei setzen Kupffer-Zellen TNF α und Interleukin-1 frei³⁸. Diese beiden Mediatoren bewirken unter anderem eine Steigerung der CD11b Expression auf Leukozyten³⁹, was wiederum eine rasche Adhäsion und Aktivierung dieser Zellen auf sinusoidale Endothelzellen bewirkt. Die kälteinduzierte Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1⁴⁰, PECAM-1⁴¹, Selectin⁴²) an der Oberfläche sinusoidaler Endothelzellen während der kalten Ischämieperiode begünstigt zudem diese Zell-Zelladhäsionen. Außerdem wird auf der Zellmembran der Leukozyten ein

NADPH-abhängiges Oxidasesystem exprimiert, welches reaktive Sauerstoffspezies freisetzt¹⁹.

Hauptquelle der reaktiven Sauerstoffspezies im Rahmen der Reperfusion sind aktivierte Kupffer-Zellen⁴³. Reaktive Sauerstoffspezies stimulieren in ihrer Aufgabe als Mediator die Bildung von TNF α und Interleukin-10 in Endothelzellen⁴⁴. Hauptsächlich jedoch rufen reaktive Sauerstoffspezies durch Lipidperoxydation der Zellmembranen eine Zerstörung derselben hervor⁴⁵; es kommt zum Verlust der zellulären Integrität.

Die Leukozyten-Plättchen-Endothelzellen-Interaktion bei Organreperfusion, sowie die Akkumulation von chemotaktischen Substanzen führen zusammen mit der Freisetzung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sowie hydrolytischen Enzymen zu Mikrozirkulationsstörungen, bis hin zum „no reflow“ Phänomen⁴⁶⁻⁴⁸. Es kommt zu einem Flüssigkeitsverlust in den interstitiellen Raum mit konsekutiver intravaskulärer Hämokonzentration. Eine mechanische Einengung des kapillären Lumens in der Leber führt zu einem Anstieg des hydraulischen Widerstands, so dass die Reperfusion auf Mikroziirkulationsebene gestört ist⁴⁹. Dieses Phänomen des „no-reflow“ im Rahmen der Organreperfusion wird auch als „reflow Paradox“ bezeichnet, da trotz Perfusion der Spenderleber an genau derjenigen Stelle der Blutfluss durch mechanische Einengung unterbrochen ist, wo Sauerstoff benötigt wird⁵⁰. Durch die eingeschränkte Mikroziirkulation mit konsekutivem Sauerstoffmangel an den Zielzellen kommt es im Rahmen der Organreperfusion zu einer sekundären Organschädigung.

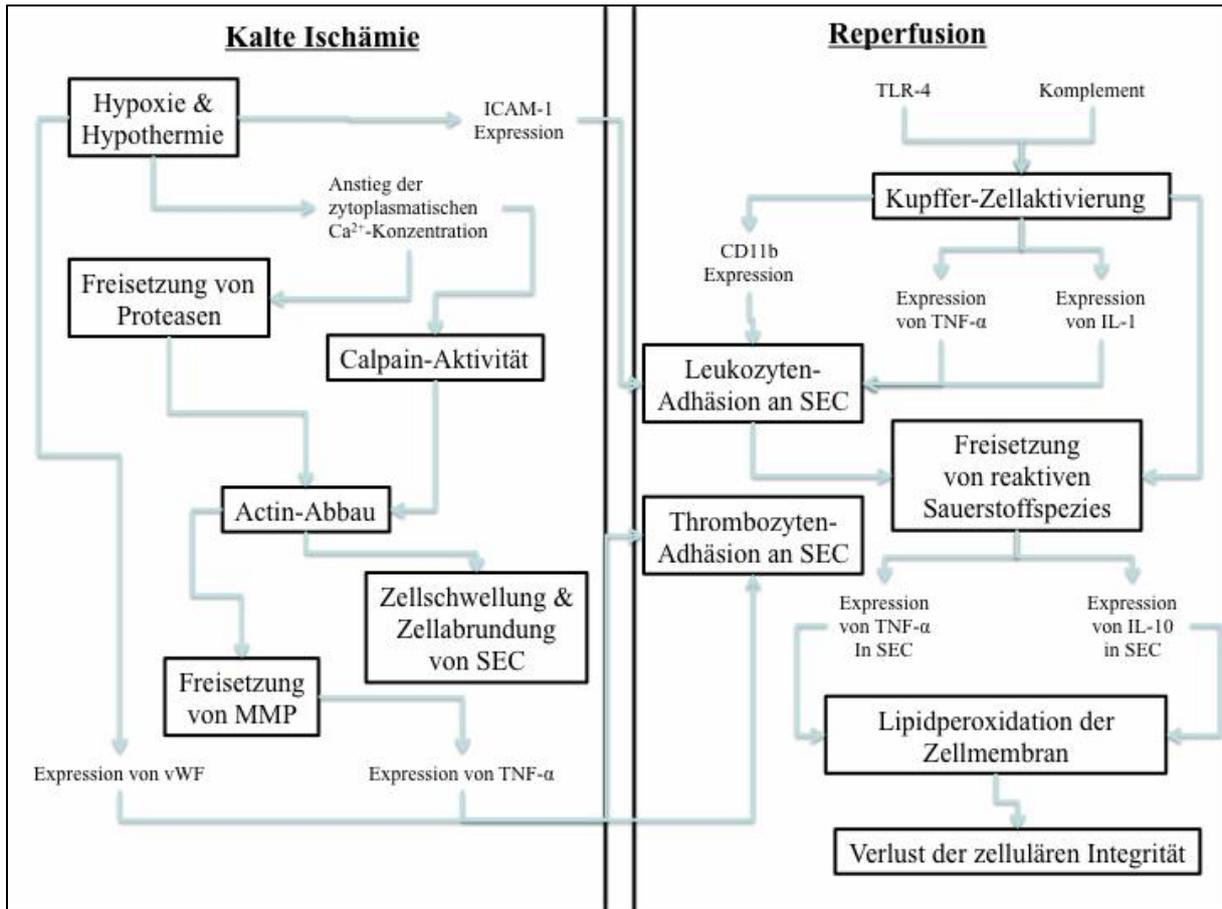


Abbildung 1 schematische Darstellung I/R-Schadens während der kalten Ischämie in sinusoidalen Endothelzellen (links) und während der Reperfusionsphase (rechts)

Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger (haemoglobin based oxygen carriers, HBOC) sind Lösungen zellfreien Hämoglobins, die entwickelt wurden, um Bluttransfusionen zu unterstützen oder sogar zu ersetzen⁵¹. In den 1990er Jahren wurden Hämoglobin-Glutamer-Präparate als HBOC entwickelt. Diese sind aus Hämoglobin durch chemische Vernetzung mittels Glutaraldehyd hergestellte Makromoleküle. Glutaraldehyd vernetzt die freien Hämoglobinmoleküle durch Stabilisierung der Tetramerstruktur durch unspezifische Modifikation an den α - und β -Globinketten und wirkt außerdem als Polymerisationsstoff des HBOC^{52,53}. Als sauerstofftragende Lösung kann das Medikament zur Behandlung der Anämie und der Ischämie genutzt werden. Je nach Polymerisationsgrad unterscheidet man folgende Varianten:

- bovines Hämoglobin-Glutamer 250 mit einer mittleren Molekülmasse von 250.000 Dalton (Hemopure[®] zur Anwendung in der Humanmedizin, Biopure Corp. Boston, MA, USA)
- bovines Hämoglobin-Glutamer 200 mit einer mittleren Molekülmasse von 200.000 Dalton (Oxyglobin[®] zur Anwendung in der Tiermedizin, Biopure Corp. Boston, MA, USA)

Als erste Substanz seiner Produktklasse (first-in-class product) ist Hemopure seit 2001 in Südafrika zur Behandlung der akuten Anämie bei erwachsenen Menschen zugelassen, beispielsweise perioperativ als vorübergehender Spenderblutersatz wenn eine Bluttransfusion nicht möglich ist⁵³, respektive zur Gewebeoxygenierung bei plastischen Operationen.

Hämoglobin-Glutamer 200 (HbG200, Oxyglobin[®], Biopure Corp., Boston, MA, USA) ist ein auf Hämoglobin basierender HBOC und gleicht dem Präparat Hemopure[®] bis auf die Molekülmasse. HbG200 war das erste Medikament, welches durch die United States Federal Drug Administration (FDA) zur Behandlung der Anämie bei Hunden zugelassen wurde⁵⁴. HbG200 besteht aus 13g/dl polymerisiertem Hämoglobin boviner Herkunft gelöst in einer modifizierten Ringer-Lactat-Lösung. HbG200 zirkuliert im Plasma und transportiert Sauerstoff unmittelbar nach Gabe an das Gewebe. Dabei ist die Sauerstoffaffinität von bovinem Hämoglobin ($p_{50} = 36\text{mmHg}$) geringer als die von humanem zellfreiem Hämoglobin ($p_{50} = 13\text{mmHg}$). Die Osmolalität der Lösung

beträgt 300mosm/kg. Die terminale Eliminationshalbwertszeit des Medikaments wird mit 18-43 Stunden für eine Dosierung von 10-13ml/kg Körpergewicht angegeben⁵⁵.

Durch die geringe Sauerstoffaffinität von bovinem Hämoglobin im Vergleich zu humanem Hämoglobin und der verbesserten Mikrozirkulation im Schockgeschehen konnten weiterführende Studien zeigen, dass durch Gabe von HbG200 eine verbesserte Oxygenierung verschiedener Gewebe erreicht werden konnte, beispielsweise in der Leber und am Skelettmuskel^{56,57}, an der Darmserosa und Darmmucosa⁵⁸ und am Herzmuskel^{59,60}. Durch Gabe von HbG200 erhöht sich die Sauerstoffextraktionsrate (ER_{O_2}) am Muskelgewebe im Vergleich zur Erythrozytengabe, gleichsam ist die Sauerstoffspannung (tP_{O_2}) nach HbG200-Applikation signifikant erhöht. Durch die azelluläre und damit geringer visköse Eigenschaft von HBOC kann diese Substanzklasse Sauerstoff in der Mikrozirkulation von schlecht oxygenierten Geweben besser abgeben und damit die Sauerstoffspannung im Zielgewebe deutlich verbessern⁶¹.

In diesem Zusammenhang zeigten BURMEISTER et al. 2005 an Ratten, dass die prophylaktische Gabe von HbG200 vor akutem Koronarverschluss und anschließender Reperfusion signifikant die Infarktgröße und das Auftreten schwerer Herzrhythmusstörungen reduzieren konnte⁵⁹. In einer Anschlussstudie konnte die therapeutische Gabe von HbG200 30 Minuten nach erfolgtem Koronarverschluss ebenfalls erfolgreich die Infarktgröße am Myokard reduzieren⁶⁰.

Es wird angenommen, dass durch die geringere Sauerstoffaffinität von HBOCs und somit einem erhöhten Sauerstofftransfer im Bereich der Mikrozirkulation das Zielgewebe besser oxygeniert wird⁵³.

1.1 Ziele der Studie

Mikrozirkulationsstörungen nach kalter Ischämie und Reperfusion der Leber, führen im Verlauf der Organreperfusion zu einer verminderten Gewebsoxygenierung und konsekutiv zu einer sekundären Gewebsschädigung. I/R-Studien am Herzen von BURMEISTER et al. und REMPF et al. konnten zeigen, dass die Gabe von HBOCs vor bzw. nach kardialer Ischämie zu einer Verminderung der Infarktgröße führt^{59,60}.

In dieser Arbeit soll nunmehr mit Hilfe des Modells der isoliert-perfundierten Rattenleber (IPRL) überprüft werden, ob die Reperfusion mit HbG200 nach kalter Ischämie der Leber zu einer Verminderung des I/R-Schadens führt.

Weiterhin ist davon auszugehen, dass das gesteigerte Angebot von azellulärem Hämoglobin in Form von HbG200 zu einer gesteigerten Aktivierung des Hämoxigenase(HO)-Systems führt. HO-1 katalysiert den initialen Schritt im enzymatischen Häm-Abbau und vermittelt zytoprotektive Eigenschaften. Expression und Bedeutung der HO-1 im Rahmen unseres Modells zur Verminderung des Ischämie und Reperfusionsschadens nach kalter Ischämie der Leber sollen daher ebenfalls untersucht werden.

Durch das gesteigerte Angebot von Hämoglobin wird zudem erwartet, dass es zu einer erhöhten oxidativen Belastung im Rahmen der Reperfusion kommt. Die Auswirkungen einer eventuell gesteigerten Lipidperoxydation auf die Organschädigung und -funktion sind ebenfalls Bestandteil dieser Untersuchung.

1.2 Fragestellungen

Unter Verwendung des Modells der Isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL) sollen insbesondere folgende Fragen im Rahmen der Studie beantwortet werden:

1. Lässt sich durch Organreperfusion mit HbG200 der postischämische Reperfusionsschaden nach kalter Ischämie der Leber vermindern?
2. Lässt sich durch HbG200 die hepatoportale Perfusion verbessern?
3. Verbessert HbG200 die Organoxidation bzw. steigert eine vermehrte oxidative Belastung die Lipidperoxydation?
4. Welche Rolle spielt in diesem Zusammenhang eine mögliche HbG200 vermittelte Induktion der zytoprotektiven Hämoxxygenase-1?
5. Welchen Einfluss nimmt die Gabe von HbG200 bei Reperfusion auf die Apoptose?

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuchsgenehmigung

Die Versuche fanden unter Aufsicht der Versuchsleitung in der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich Heine Universität Düsseldorf gemäß des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1106, 1818) statt. Das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Fachbereich Tierschutz, Leibnitzstraße 10, 45659 Recklinghausen) erteilte am 29.11.2006 die Genehmigung zur Durchführung dieser Versuche (Tiergenehmigungsnummer: 50.05-240-48/03).

2.2. Versuchstiere

Es wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 200-240g sowie 400-450g (Fa. Taconic Hudson, NY, USA) verwendet. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich Heine Universität gemäß des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1106, 1818).

2.3 Hepatektomie

Die Hepatektomie an der Wistar-Ratte wurde unter Allgemeinanästhesie mit Isofluran durchgeführt. Die Einleitung der Narkose erfolgte in einem geeigneten Gefäß, mit 4% Isofluran. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte mittels einer Nasenmaske unter Reduktion des Isofluran auf 1-1,5%, bei konstanter Sauerstoffzufuhr von 1l/min. Die

Steuerung der Narkose erfolgte durch kontinuierliche Beobachtung der Atmungsaktivität.

Die Ratten wurden in Rückenlage fixiert und das Abdomen desinfiziert. Nach medianer Laparotomie und Exposition des Situs wurde die Leber von den Ligamenten und Adhäsionen am Zwerchfell befreit. Dabei wurde die Vena phrenica sinistra unterfahren und mit 7-0 Prolene Durchstichligatur ligiert. Im Ligamentum hepatoduodenale wurde dann der Ductus hepatocholedochus dargestellt und distal mit 6-0 Seide ligiert, danach inzidiert und schließlich mit einem 8cm langen Polyethylenschlauch kanüliert (Intramedic Clay Adams Brand, Innendurchmesser 0.58 mm/ Außendurchmesser 0.965 mm, Fa. Becton, Dickinson and Co., NJ, USA). Nun wurde der portalvenöse Zufluss aus der Vena gastrica dextra unterfahren und mit 6-0 Seide ligiert. Danach erfolgte die Präparation der Arteria und Vena renalis dextra und Ligierung der Selben mit 6-0 Seide. Analog wurde mit den rechtsseitigen suprarenalen Gefäßen verfahren-

Nach Ligatur der A. hepatica mit 6-0 Seide, wurde die Vena portae mit einer Gefäßklemme abgeklemmt und mit einem 14G Teflonschlauch kanüliert (Fa. Becton, Dickinson and Co., NJ, USA). Initiierung der kalten Ischämie durch Perfusion der Leber mit 15ml eiskalter heparinisierte Kochsalzlösung (10 IE Heparin/ml NaCl 0.9 %) unter konstantem Druck von 15cm Wassersäule und Inzision der supra- und infrahepatischen Vena cava. Der in die V. portae einliegende Teflonschlauch wurde mit 6-0 Seide zweifach gesichert. Nach Perfusion der Leber mit 4°C kalter Euro-Collins-Lösung wurde der in der Vena portae einliegende Schlauch abgeklemmt und die Hepatektomie komplettiert. Die supra- und infrahepatisch V. cava inferior wurden anschließend mit 12G Polyurethankanülen (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) kanüliert und dieselben mit jeweils einer 6-0 Seide-Ligatur fixiert. Zur Erzeugung eines signifikanten Konservierungsschadens wurde die Leber für 24h bei 4°C in 100ml eiskalter (4°C) Euro-Collins-Lösung aufbewahrt.

2.4 Reperfusion am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL) ist ein weltweit etabliertes Modell zur Untersuchung von Ischämie und Reperfusion der Leber. Größe und Anatomie der Rattenleber ermöglichen mit Hilfe des genannten Modells eine physiologische in vitro Perfusion des Organs^{20,25,35,62}.

Das Apparatdesign ist dem nach MILLER et al. angelehnt⁶³. Die Reperfusion der Leber erfolgt hierbei in einem mit Krebs-Henseleit befüllten Reservoir bei 37°C, druckgesteuert mit 15cm/H₂O. Die Oxygenierung erfolgt mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) durch eine konstante Begasung des Perfusates in einem Erlenmeyerkolben (Abbildung 2). Der pO₂ im Perfusat wird hierbei konstant bei >400mmHg gehalten. Der pH-Wert von 7,4 wurde während der Reperfusion durch wiederholte Titration von Natriumbicarbonat 8,4% aufrecht gehalten. Das in diesem geschlossenen System zirkulierende Perfusatvolumen wurde bei 100mL konstant gehalten.

Die Reperfusion der kältekonservierte Rattenleber erfolgte für 180 Minuten. Die Perfusatzusammensetzung wird unter 2.5 detailliert beschrieben. Der Hämatokrit betrug circa 14%. Natrium-Tauchlorat (10µmol/h) und Heparin (1000 IE/h) wurden dem System über eine zweite Rollerpumpe (Reglo Digital, Fa. Ismatec SA, Labortechnik, Glattbrugg, Schweiz) kontinuierlich zugefügt.

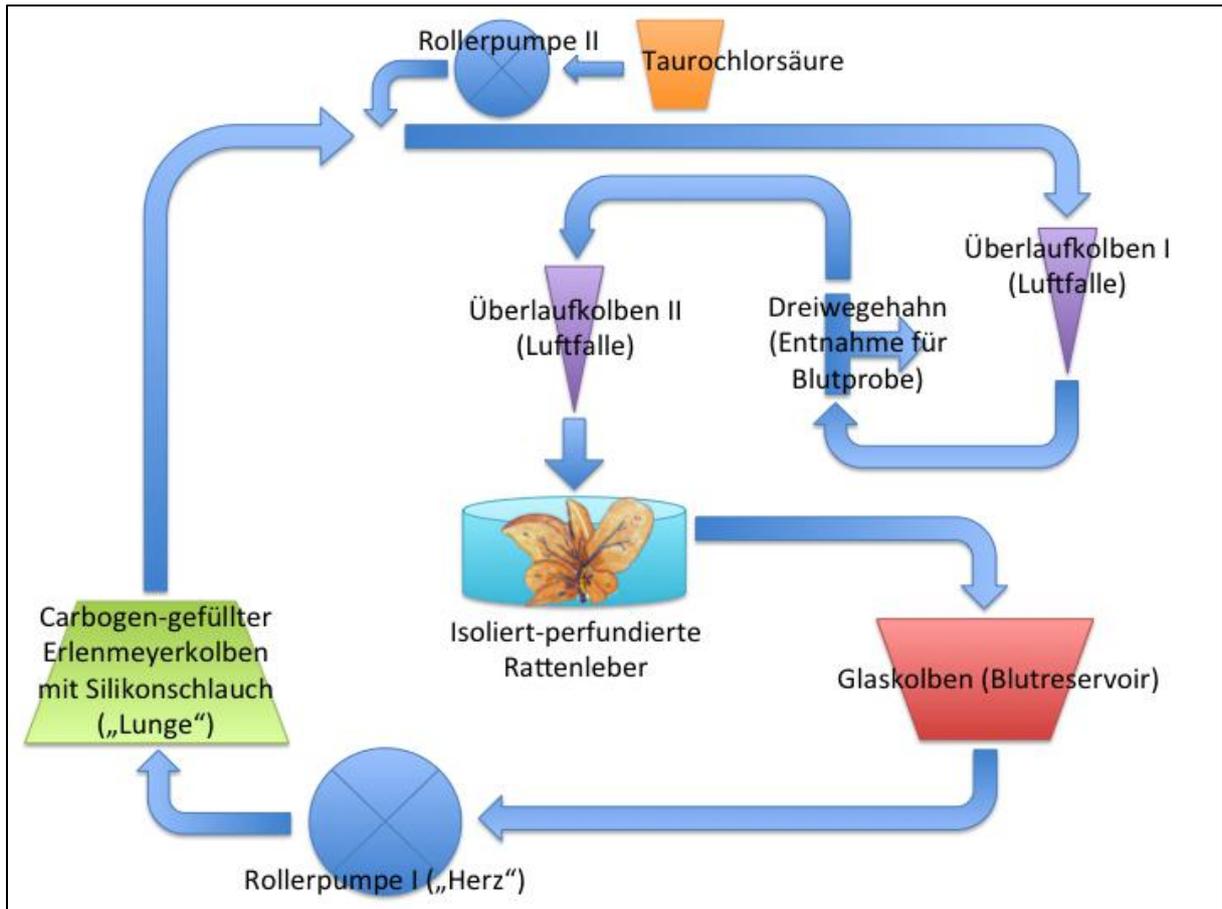


Abbildung 2 schematische Darstellung der in-vitro Reperfusion der isoliert perfundierten Rattenleber modifiziert nach Miller et al.⁶³

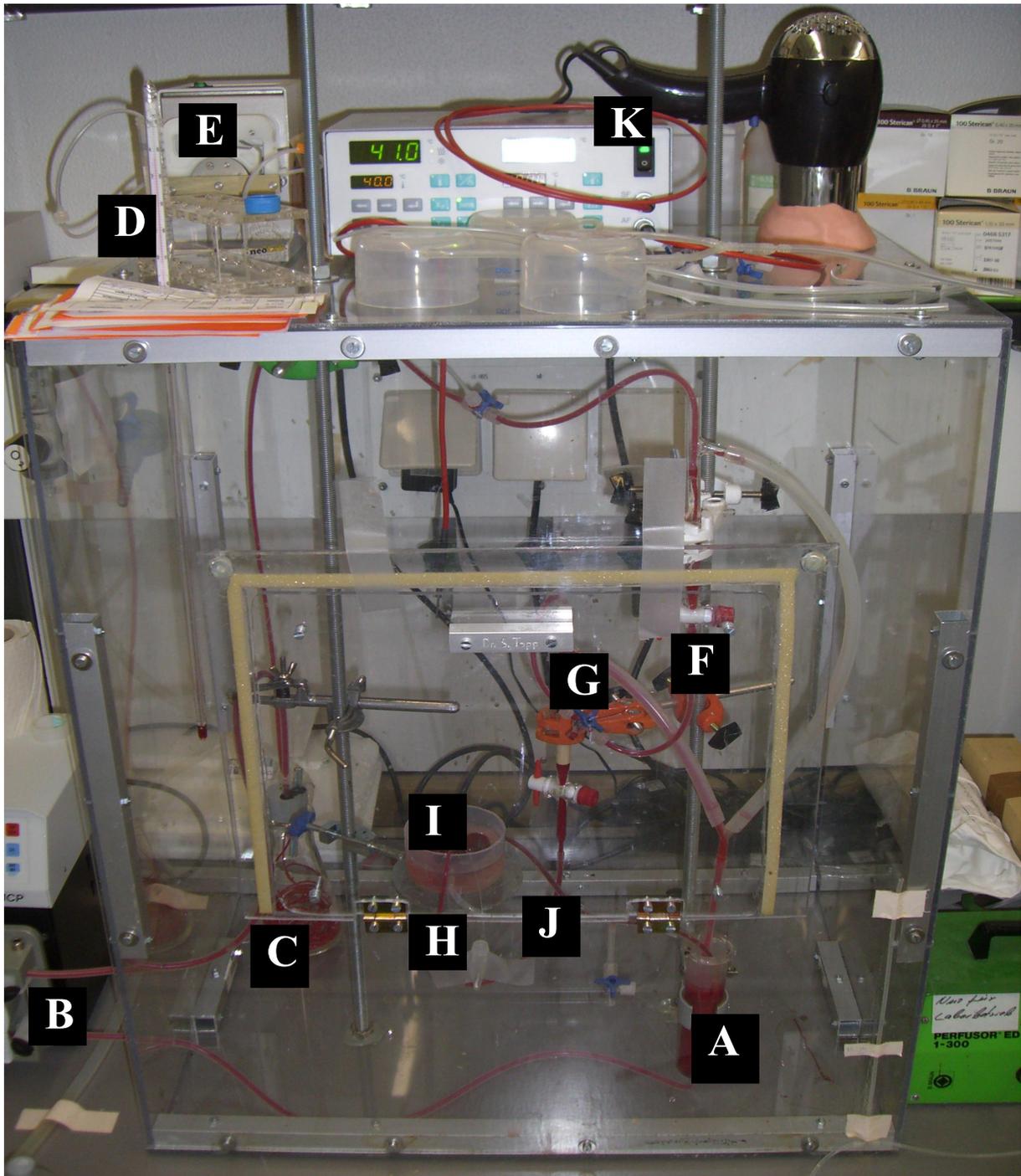


Abbildung 3 in-vitro Reperfusion der isolierten Rattenleber, modifiziert nach Miller et al.⁶³ (A: Glaskolben als Perfusatreservoir; B: Rollerpumpe I (MCP Standard, Fa. Ismatec); C: Lunge; D: Röhrchen mit Perfusat II; E: Rollerpumpe II (Reglo Digital, Fa. Ismatec); F: Überlaufkolben I; G: Überlaufkolben II; H: 14G Teflonschlauch zur Kanülierung der V. portae; I: Schale mit Euro Collins Lösung und Rattenleber in Reperfusion; J: Silikonschläuche der V. cava inferior und superior; K: Fön mit Temperaturmesser)

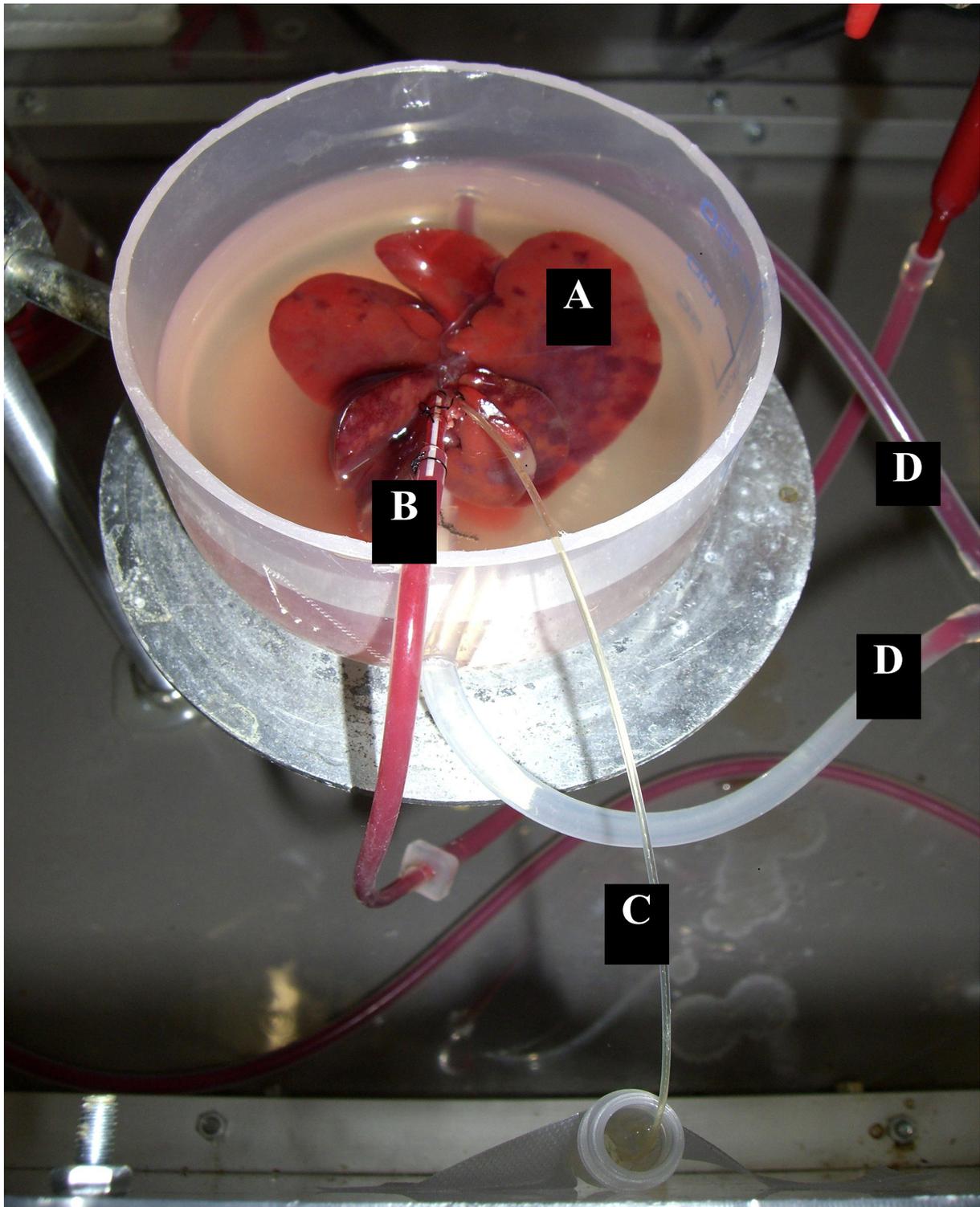


Abbildung 4 Detaildarstellung der **in-vitro** reperfundierten **Rattenleber** (A: Rattenleber in Euro-Collins Lösung; B: 14G Teflonschlauch zur Kanülierung der Vena portae, hierüber Reperfusion mit dem blutigen Perfusat; C: Galleableitung über einen PE-Schlauch (ID 0,58mm / AD 0,965 mm); D: Drainage des blutigen Perfusats über die supra- und infrahepatische Vena cava)

2.5 Experimentelle Gruppen und Versuchsablauf

Um den Effekt von Hämoglobin Glutamer 200 (Oxyglobin[®], (Fa. Biopure, Cambridge, MA, USA) in Bezug auf den Ischämie-Reperfusionsschaden zu evaluieren wurden drei verschiedene Perfusate mit einem jeweiligen Gesamtperfusionsvolumen von 100ml verwendet.

- **Gruppe A (Krebs-Henseleit-Lösung, n=6):** Das Perfusat bestand aus 40 ml Rattenblut von Wistar-Ratten und 60 ml Krebs-Henseleit-Lösung sowie 2,1g 0,2% bovinem Serumalbumin und 0,1g Dextrose (jeweils Fa. Sigma-Aldrich Corp., Saint Louis, Missouri, USA). Die Zusammensetzung wurde berechnet um einen einheitlichen Hämatokrit von 15% bei den Perfusaten zu erreichen.
- **Gruppe B (Krebs-Henseleit-Lösung + HAES 6%, n=6):** In der Gruppe wurde HAES 6% als Kontrolle verwendet, da die Partikelgröße und Osmolalität von HAES 6% denen des Oxyglobin[®] entspricht. Für die Gruppe B ergab sich folgende Perfusatzusammensetzung: 40ml Rattenblut, 30ml HAES 6%, 30ml Krebs-Henseleit-Lösung sowie 2,1g 0,2% bovinem Serumalbumin und 0,1g Dextrose.
- **Gruppe C (Krebs-Henseleit-Lösung + Oxyglobin, n=9) und Gruppe D (Krebs-Henseleit-Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert, n=4):** Für die Oxyglobin-Versuchsgruppen wurden die Perfusate so zusammengesetzt, dass die verwendete Oxyglobinkonzentration den Herstellerempfehlungen für die Anwendung von intravenös appliziertem Oxyglobin[®] bei Tieren entsprach. Um die empfohlene Konzentration von 3,9g/dl an polymerisiertem bovinem Hämoglobin bei einem Perfusionsvolumen von 100ml zu erreichen wurde für die Perfusate der Gruppen C und D ein Volumen von jeweils 30ml Oxyglobin[®] kalkuliert. Es ergab sich demnach für die Versuchsgruppen C und D eine Perfusatzusammensetzung von 40ml Rattenblut, 30ml Oxyglobin und 30ml Krebs-Henseleit-Lösung sowie 2,1g 0,2% bovinem Serumalbumin und 0,1g Dextrose.

In der Versuchsgruppe D wurde die HO-Aktivität durch intraperitoneale Applikation von SnPP eine Stunde vor Organentnahme inhibiert. Die benutzte Dosierung (10 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht) wies eine zuvor gezeigte Inhibierung der HO-Aktivität ohne Toxizität auf. Gemäß den Zubereitungsempfehlungen wurden 0,1M NaOH und SnPP unter Lichtschutz mit gleicher Menge Kochsalzlösung vermischt. Anschließend erfolgte die Titration bis ein pH-Wert von 7,4 erreicht wurde⁶⁴.

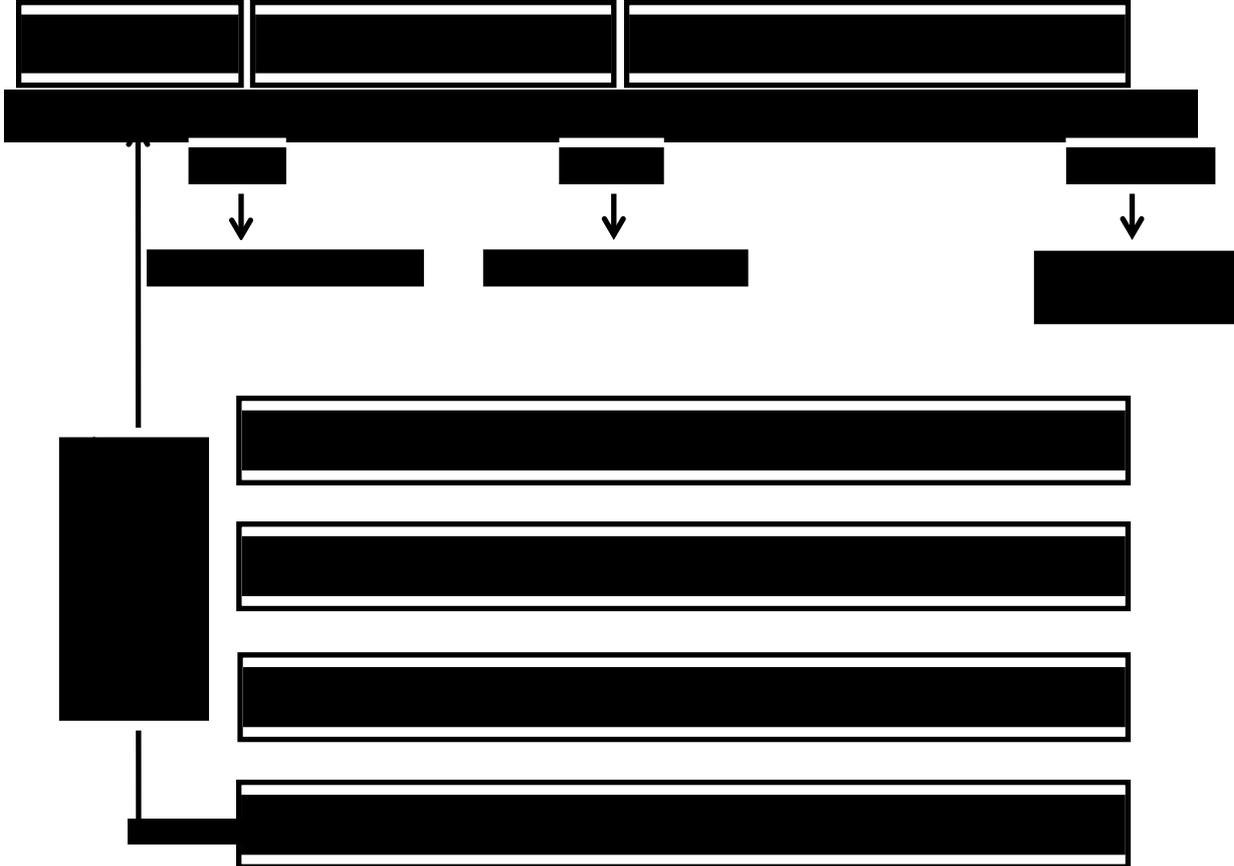


Abbildung 5 schematische Darstellung des Versuchsablaufs

2.6 Laborchemische Analysen

Während der Reperfusion wurden in dreißig minütigen Intervallen Blutproben mit einem jeweiligen Volumen von 1ml gewonnen. Während der Reperfusion wurden diese Blutproben bei 4°C gelagert. Blutgasanalysen wurden an einem kalibrierten Blutgasanalysegerät (Blood Gas Analyzer ABL-505, Fa. Radiometer, Kopenhagen) bei 0 / 5 / 15 / 30 / 60 / 90 / 120 / 150 und 180 Minuten nach Reperfusion durchgeführt. Nach Beendigung der 180 minütigen Reperfusion erfolgte die Bestimmung der Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl sowie des Hämatokrit-Wertes in den jeweiligen Blutproben an einem Blutanalysegerät (ABX Micros ABC Vet, Fa. HORIBA ABX Inc., Irvine, CA, USA). Anschließend wurden die Proben für fünf Minuten bei 1500rpm zentrifugiert und 780µl des Plasmas abpipettiert. Diese bei 4°C gelagerten Plasmaproben wurden durch das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege) des Universitätsklinikums Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für die Bestimmung von Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Bilirubin bearbeitet. Als Analysegerät wurde ein Cobas Mira Analyser (Fa. Roche, Schweiz) verwendet. Außerdem wurde die Galleexkretion nach 180 minütiger Reperfusion bestimmt.

2.7 Messung der portalvenösen Flussrate

Bei dem Modell der IPRL handelt es sich um ein druckgesteuertes System mit einem konstanten Perfusionsdruck von 15mmH₂O an der V. portae. Die Perfusion der Leber wurde durch eine Flussmessung über die 14G Teflonkanüle in der V. portae evaluiert. Die Messungen erfolgten bei 0 / 5 / 15 / 30 / 60 / 90 / 120 / 150 und 180 Minuten nach Reperfusion. Es wurden pro Messung zwei Werte bestimmt und der Mittelwert der beiden Werte verwendet. Durch Stoppen des Blutflusses vor dem Überlaufkolben II ergab sich am Überlaufkolben ein Flussvolumen pro Zeiteinheit. Anhand einer am Überlaufkolben II aufgetragenen Skalierung von 575µl/Einheit konnte durch Messen der Zeit das Perfusionsvolumen pro Zeiteinheit über folgende Formel berechnet werden:

$$\frac{575\mu l}{Zeit [s]} \times 60s = x \mu l/min$$

2.8 Histologische Beurteilung des Ischämie-Reperfusionsschadens

Die Lebergewebeproben wurden zur Beurteilung der zellulären Integrität histologisch aufgearbeitet. Repräsentative Leberproben wurden nach 180 minütiger Reperfusion in 4%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden Hämatoxylin und Eosin-, Elastica van Gieson und Gömeri-gefärbte Schnitte von den Präparaten angefertigt. Diese wurden unter dem Mikroskop anhand einer Punkteskala für den Schweregrad von Leberschäden nach CAMARGO et al. bewertet⁶⁵. Dazu wurden der Grad der zytoplasmatischen Vakuolisierung, der Hämorrhagie und der Nekrose mit Untergang von Leberzellsträngen sowie der Grad der Apoptose jeweils mit 0-3 Punkten bewertet und die einzelnen Werte zu einer Summe addiert. Die Punktesumme repräsentierte den Schweregrad der Organschädigung.

- Grad 1: 1-4 Punkte,
- Grad 2: 5-8 Punkte und
- Grad 3: 9-12 Punkte.

Die histologische Untersuchung aller Gewebeproben erfolgte verblindet durch Prof. Baldus am Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

2.9 Spektrofluorimetrische Quantifizierung von Malondialdehyd (MDA) im Perfusat

D

Malondialdehyd (MDA) ist eine organische Verbindung mit der chemischen Formel $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$. MDA ist ein natürlich vorkommendes hoch reaktives Molekül. Im biochemischen Kontext bauen reaktive Sauerstoffmoleküle mehrfach ungesättigte Fettsäuren ab, dabei kommt es zur Bildung von Malondialdehyd. Dieses Molekül ist ein reaktives Aldehyd und ist eines der vielen reaktiven elektrophilen Moleküle, die toxischen Stress in Zellen verursachen. MDA bildet kovalente Proteinbindungen aus, es kommt zur Bildung von sogenannten advanced lipoxidation end products (ALE). Die Bildung dieses Aldehyds wird als Biomarker verwendet um oxidativen Stress zu quantifizieren.

Um den Grad der Lipidperoxydation zu bestimmen wurde Malondialdehyd (MDA) in den Proben des Perfusats nach 180 minütiger Leberreperfusion analog der von Ledergerber und Hartmann beschriebenen Prozedur quantifiziert. Zur Deproteinisierung erfolgte das Ansäuern von 400 µl Perfusatsplasma aus jeder Probe mit 240 µl Trichloressigsäure (20% TCA in 0.6M HCl, 20g/100ml, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Mischung wurde anschließend für 5 Minuten bei 4°C mit 14000G zentrifugiert. 200 µl des Perfusat-Überstands wurden in eine Mischung aus Thiobarbitursäure-Lösung (0.53 TBA, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland) und Kalium-Natrium-Phosphatpuffer (0.01M KH_2PO_4 , 0.05 M Na_2HPO_4 , pH 7.4, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) pipettiert.

Die Inkubation des Gemisches erfolgte durch dreißigminütiges Erhitzen bei 70°C und Abkühlung für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde die spektralfluorimetrische Messung der Proben mit einem Fluoroskan Ascent Fluorometer ($\lambda_{\text{excitation}}$: 533nm, $\lambda_{\text{emission}}$: 555nm, Fa. MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA, USA) vorgenommen.

Um die Kalibrierungskurve zu bestimmen wurden 400 µL einer 100 µM-10 nM 1,1,3,3-Tetraethoxypropan mit 240 µL Trichloracetat (20% TCA in 0.6 M HCl;

Merck, Aurora, OH) vermischt. 100 μL des Überstands wurden in 100 μL Thiobarbitursäure-Lösung in 0.01 M KH_2PO_4 , 0,05 M Na_2HPO_4 mit einem pH-Wert von 7,4 pipettiert um das Reaktionsprodukt von MDA und Thiobarbiturat zu erhalten. Messungen erfolgten, wie zuvor beschrieben, nach dreißigminütigem Erhitzen bei 70°C und 30 min Abkühlen bei Raumtemperatur.

2.10 Detektion der Apoptose mit Terminal Desoxynucleotidyl Tranferase-Mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) Assay

Um die Anzahl der durch Apoptose untergegangenen Zellen zu bestimmen, erfolgte die Markierung und Detektion von DNA-Strangbrüchen mithilfe der direkten TUNEL-Detektionsmethode (In situ cell death detection kit Fluorescein; Fa. Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland).

Die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) dient der Darstellung von Zellkernen apoptotischer Zellen. „TdT“ steht für „terminal desoxynucleotidyl transferase“, ein Enzym, das in einem Zwischenschritt der Technik verwendet wird. Während der Apoptose wird der DNA-Strang des Zellkerns durch die Aktivität von Endonukleasen fragmentiert. Die an den Bruchenden freiwerdenden Hydroxylgruppen (3'-OH-Gruppen) werden durch das Enzym TdT mit markierten Nucleotiden versehen, welche z. B. aufgrund von Fluoreszenz mit entsprechenden Mikroskopen sichtbar gemacht werden können. Die Methode wurde 1992 erstmals beschrieben⁶⁶.

Kryokonserviertes Gewebe aus Leberproben wurde in 5 µm große Schnitte geteilt und für 20min bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd fixiert und dann einmal für eine Dauer von 30 Minuten mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Dann erfolgte die Permeabilisierung der Zellen in 0,1% Triton X-100 und 0,1% Natriumcitrat für 2 Minuten auf Eis. Nach einem erneuten Waschschrift wurde die Durchführung der TUNEL-Reaktion entsprechend den Herstellerangaben für 60 Minuten bei 37°C vorgenommen. Die TUNEL-Reaktionslösung besteht aus TdT und Fluorescein-dUTP. Während des Inkubationsschritts katalysiert TdT die Anlagerung von Fluorescein-dUTP an die freien 3'-OH Enden der DNA. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Nuclei nach der TUNEL-Prozedur 5 Minuten lang andersfarbig mit einer 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)-Farblösung gekennzeichnet. Als Negativkontrolle wurde Lebergewebe lediglich mit der labeling solution behandelt; eine Positivkontrolle erfolgte, indem Strangbrüche durch zehnmünütige Inkubation von Lebergewebsstücken aus unbehandelten Ratten mit

rekombinater DNase I induziert wurden. Bis zu 100 DAPI-markierte Nuclei konnten in der Blindstudie innerhalb von fünf zufällig ausgewählten Feldern pro Präparation mit einem Axioplan Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) gezählt werden. Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen konnte dann anhand des Verhältnisses von hellgrün fluoreszierenden und DAPI-positiven apoptotischen Nuclei und der Gesamtzahl an DAPI-positiven Nuclei errechnet werden.

2.11 Western Blot-Analyse für HO-1

Der Western Blot dient der schnellen sensitiven Detektion von Proteinen, die auf Nitrozellulosemembranen fixiert sind. Die Antigene (Proteine) werden nach der Elektrophorese auf die Filter transferiert. Die Methode basiert auf ELISA, unter Benutzung von Anti-IgG als zweiten Antikörper, an den entweder alkalische Phosphatase oder Peroxidase gebunden ist. Für die Detektion stehen menschliche, Maus- und Kaninchen-Antikörper zur Verfügung. Der erste Antikörper (AK) bindet spezifisch an ein Protein (Antigen, AG), der zweite Antikörper bindet an den konstanten Teil des ersten Antikörpers. Die Phosphatase respektive die Peroxidase rufen unter Zugabe eines Substrates eine Farbreaktion der spezifischen Proteine hervor.

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt mit Hilfe von Acrylamidgelen. Die Gele werden in eine speziell dafür vorgesehene Apparatur gegossen. Das Gel setzt sich auf zwei Komponenten zusammen: 1. Trenngel und 2. Sammelgel. Den unteren Teil des Gels bildete ein 12%iges Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Trenngel und dient der Auftrennung der Proteine. Den oberen Teil bildete das Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Sammelgel, es ist 5%ig und dient der Sammlung der Proteine, damit diese gleichzeitig in das Trenngel laufen. Die Substanzen für die Reaktionslösungen zur Gelelektrophorese sind im Anhang aufgelistet.

Die Gelgießapparatur wurde jeweils zusammengebaut, die dafür benötigten Glasplatten wurden zuvor mit Aqua dest., und anschließend mit Ethanol gereinigt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, pro Gel waren 6ml Lösung notwendig. Für 6ml Gel wurden 10ml Lösung angesetzt, der Überschuss wurde als Polymerisierungskontrolle verwendet. Die Substanzen wurde zusammenpipettiert, wobei das 10%ige Ammonium-Persulfat als vorletzter und TEMED (Tetramethylethylendiamin) als letzter Bestandteil hinzugegeben wurde, da beide Substanzen zusammen die Polymerisation des Gels bewirken. Anschließend wurde das Gel in die Gelkammer gegossen, indem mit Hilfe einer Pipette ca. 6ml Gellösung in die Gelkammer übertragen wurde, dies entspricht circa 2/3 der Höhe der Gelkammer.

Anschließend wurde das Gel vorsichtig mit Isopropanol überschichtet, damit das Gel an der Oberfläche nicht eintrocknete. Nach circa 30 Minuten war das Gel polymerisiert, der Isopropanol-Überzug wurde abgegossen, der Rest konnte abdampfen.

Danach wurde die Herstellung des Sammelgels durchgeführt. Pro Gel wurden 3ml Lösung benötigt. Analog dem Trenngel wurden die Substanzen zusammenpipettiert, wobei Ammonium-Persulfat und TEMED erneut als letzte Substanzen hinzugegeben wurden. Das Sammelgel polymerisiert schneller als das Trenngel, so dass das Gießen rascher erfolgen musste. Mit Hilfe einer Glaspasteurpipette wurde das Sammelgel luftblasenfrei in die Gelkammer pipettiert. Zwischen die beiden Gelplatten wurde vorsichtig ein Kamm zur Aussparung der Probestaschen platziert, danach polymerisierte das Sammelgel. Die Probestaschen wurden mit einem Permanentmarker gekennzeichnet, da nach Entfernung des Kamms diese optisch nicht mehr erkennbar waren.

Sowohl die Anode als auch die Kathode wurden vor der Benutzung mit Aqua dest. gesättigt. Hierzu wurden mit Aqua dest. getränkte Zellstofftücher auf die jeweiligen Flächen gelegt und vor dem Blotaufbau wieder entfernt. Korrespondierend der Gelgröße wurde 3MM-Whatmanpapier (3MM CHR, 100 sheets, Cat. No.: 3030 6132, Whatman International Ltd, Kent, UK) zugeschnitten. Zum Aufbau der Anode wurden auf die Anodenplatte 6 Blätter 3MM-Whatmanpapier einzeln in der Anode Lösung R getränkt und auf die Apparatur gelegt, danach wurden 3 Blätter 3MM-Whatmanpapier einzeln in der Anode Lösung S getränkt und anschließend auf die Apparatur platziert. Daraufhin wurde Nitrozellulose ebenfalls in der Anode Lösung S getränkt und auf die Apparatur gelegt. Jetzt wurde das zuvor angefertigte Proteingel luftblasenfrei aufgelegt und mit etwas Anode Lösung S übergossen. Anschließend wurden insgesamt 9 Blätter 3MM-Whatmanpapier in der Kathode Lösung T getränkt und schlussendlich auf das Proteingel gelegt wurden. Bei jedem der Arbeitsschritte wurden mit einer Pipette Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten herausgedrückt. Nach Auflage der Kathodenplatte wurden Anode und Kathode das Gerät angeschlossen und bei ca. 36 mA der Blot für circa 60 Minuten durchgeführt ($0.8\text{mA}/\text{cm}^2$).

In die ausgesparten Probenaschen wurden die Proben pipettiert. Eine Tasche wurde mit einer Referenz, einem Proteinstandard, der mehrere Proteine bekannter Größe beinhaltet, befüllt. Es wurde zudem ein sichtbarer, negativ geladener Farbstoff (Bromphenolblau) zugesetzt.

Es erfolgte die Homogenisierung von Lebergewebe in sechs Einheiten eines eiskalten Proteinextraktionspuffers (50mM Tris-HCL, 10mM Ethylendiamintetraacetat, 1% (vol/vol) Triton X-100, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 0.05 mM Pepstatin A, 0.2 mM Leupeptin in destilliertem Wasser).

Nach Zentrifugieren bei 10000G über 10 Minuten wurde der resultierende Niederschlag erneut in Extraktionspuffer gelöst und dann die Gesamtproteinkonzentration mit der Bradford-Reaktion (Protein Assay Kit II, Bio-Rad, Hercules, CA) bestimmt und mittels Platerader analysiert. Dabei wird eine Bindung zwischen einem Farbstoff und einem Protein genutzt, die in Abhängigkeit der vorliegenden Proteinkonzentration eine Farbänderung hervorruft. Der maximale Absorptionsgrad für das im Assay Kit verwendeten Coomassie[®] Brilliant Blau G-250 in einer sauren Lösung verschiebt sich bei Vorliegen einer Proteinbindung von 465nm zu 595nm. Coomassie[®] Brilliant Blau G-250 bindet primär an basische und aromatische Aminosäurereste, im Besonderen an Arginin. Es erfolgte anschließend die Lösung des Homogenats in einem 1:1-Verhältnis in einem sample Puffer und das Kochen des Gemischs über 10 Minuten bei 95 °C (sample buffer: 50 mM Tris-HCL pH 6.8, 10% wt/vol Natriumdodecylsulfat, 10% vol/vol Glycerol, 10% vol/vol 2-Mercaptoethanol, 0.02% wt/vol Bromphenolblau). Die Proteinproben wurden bei -80 °C bis zur Trennung durch Gelelektrophorese gelagert. 40µg der Proteinproben wurden auf ein 10%iges Natriumdodecylsulfatpolyacrylamid-Gel mit Proteinstandard HO-1 gegeben (rekombinante Ratte; StressGen Biotechnologies, Yorkshire, UK) und der Elektrophorese zugeführt. Nach Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran wurden die Blots über Nacht bei 4 °C in einer Blocking Solution (5% wt/vol Halbfettmilchpulver und 0.1% vol/vol Tween-20 in PBS) inkubiert. Die Entfernung unspezifischer Proteinbindungen erfolgte durch Waschen (3x5 min) mit einem Waschpuffer (Tween 20, 0.1% vol/vol in PBS). Die Blots wurden eine Stunde lang mit dem primären polyklonalen Rattenantikörper gegen HO-1 (1:2000; Fa. StressGen

Biotechnologies, Yorkshire, UK) behandelt. Ein monoklonaler Mausantikörper gegen Beta-Actin (1:4000), ein Standard-*housekeeping*-Protein, wurde verwendet, um eine gleichwertige Beladung sicherzustellen.

Abhängig von der Spezies des Tieres, aus dem die Antikörper gewonnen wurden, wurden entsprechende sekundäre Antikörper gegen horseradish peroxidase angewendet.

Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde auf Hyperfil ECL-Film (Fa. Amsterdam Pharmacia Biotech, Bucks, UK) unter Verwendung eines „chemiluminescence luminol reagent kit“ (Fa. Santa Cruz Biotechnology) entwickelt. Die Banden wurden densitometrisch durch Anwendung der Software Scion Image (Fa. Scion Corporation, NIH, Frederick, MD, USA).

2.12 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD) angegeben. Die Statistische Differenz zwischen den Gruppen wurde mittels unifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) für unbalancierte Studien bestimmt, gefolgt von einem Bonferroni post hoc Test oder - wenn angemessen - Student's t-Test. Differenzen wurden als signifikant erachtet bei $p < 0.05$. Für die statistischen Analysen wurde SPSS 12.01 verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Effekt von HbG200 auf Hämoglobin, Hämatokrit und Blutgase während der Reperfusion

Die Addition von HbG200 zum Perfusat der isoliert perfundierten Rattenleber erhöhte die Hämoglobinkonzentration des Perfusats um 3.3 g/dL (Abbildung 6). Der initiale Hämatokrit von 14 % reduzierte sich zirkulationsbedingt im Verlauf der Reperfusion in allen Versuchsgruppen im wesentlichen durch Hämolyse auf 11.6 % (Abbildung 7). Der pO_2 der Perfusate wurde in allen Versuchsgruppen stets über 400 mmHg gehalten (Abbildung 8). Der initiale Abfall der pO_2 -Werte von 550 mmHg auf über 400 mmHg in allen vier Versuchsgruppen spiegelt den Sauerstoffverbrauch des reperfundierten Organs wider.

Der pCO_2 -Wert war während der Reperfusion in den Versuchsgruppen A (Krebs Henseleit Lösung), C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) und D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert) ähnlich. Eine signifikant reduzierte CO_2 Produktion konnte nach 90 minütiger Reperfusion lediglich in Versuchsgruppe B (Krebs Henseleit Lösung + HAES6%) verzeichnet werden. * $p < 0.05$, Gruppe B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) vs. Gruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin), ANOVA, t-Test (Abbildung 9).

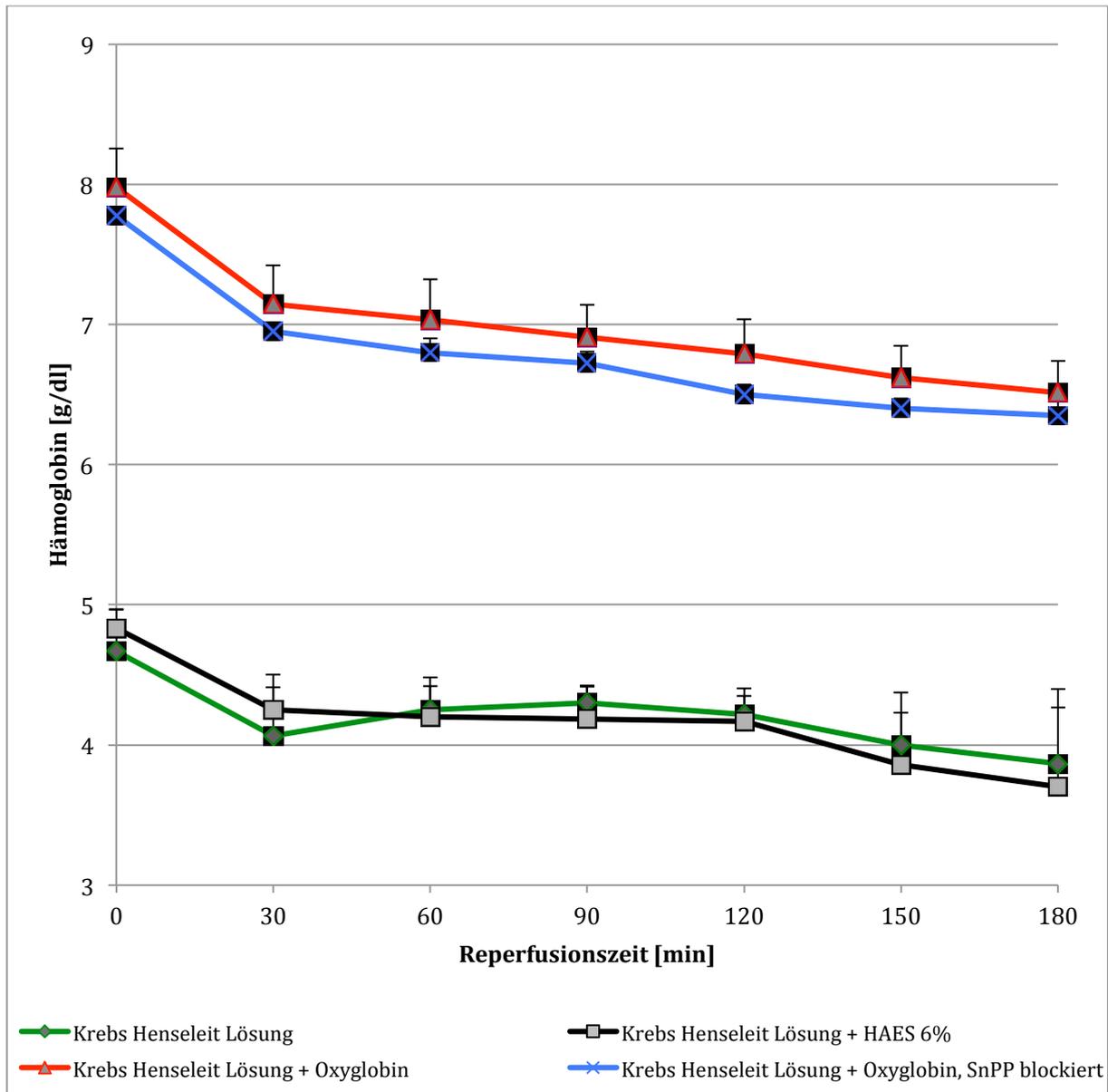


Abbildung 6 Hämoglobin-Konzentration im Perfusat während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen zeigen die Oxyglobin[®]-Gruppen wie berechnet eine erhöhte Hämoglobin-Konzentration um durchschnittlich 3.3 g/dL. $p < 0.01$, Gruppen A (Krebs Henseleit Lösung) und B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) vs. Gruppen C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin[®]) und D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin[®], SnPP blockiert), ANOVA, t-Test

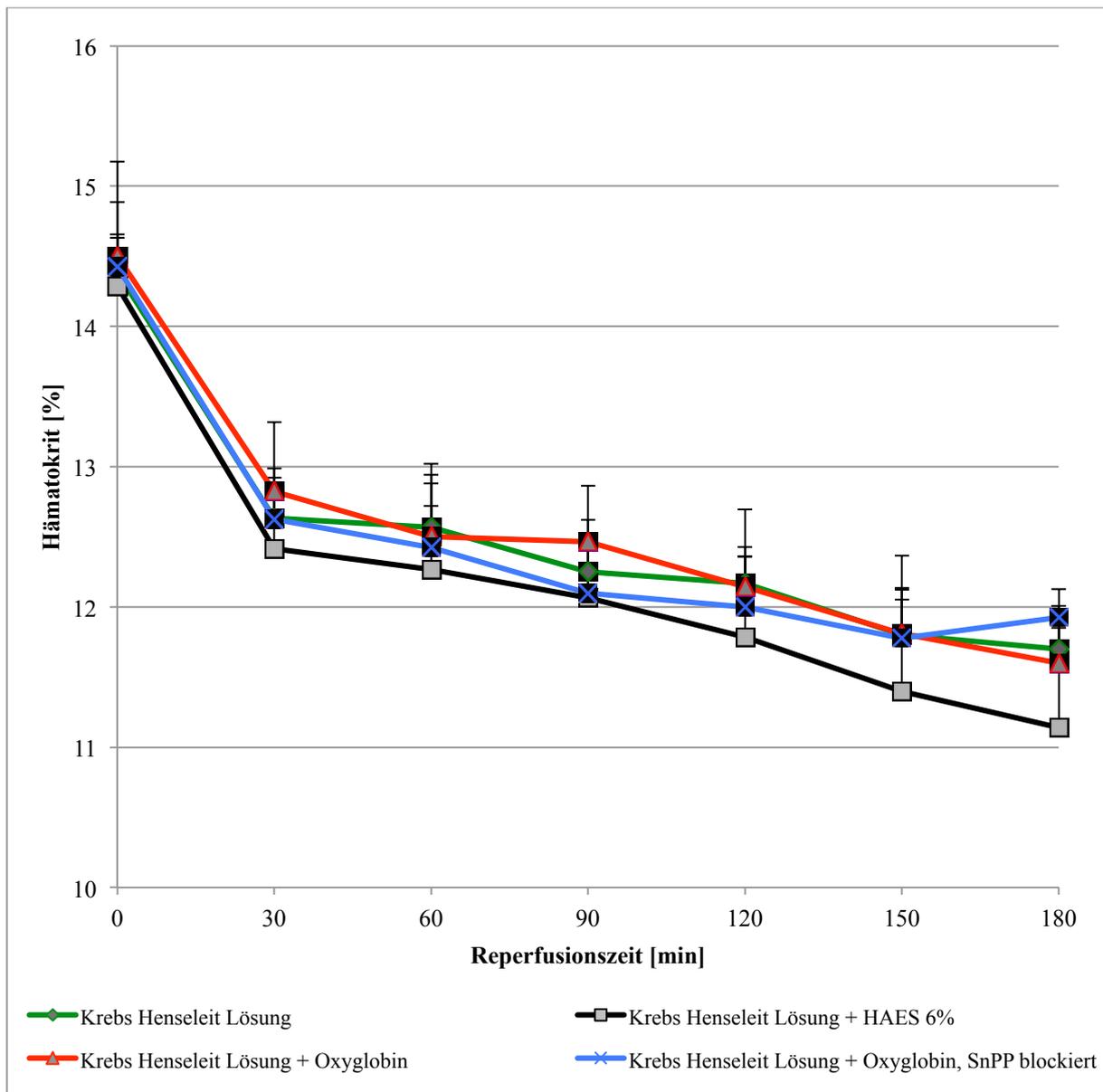


Abbildung 7 Hämatokrit im Perfusat während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL. Der Hämatokrit-Wert war in allen 4 Versuchsgruppen nicht signifikant verschieden und reduzierte sich im Verlauf der Reperfusion von 14 % auf 11.6 %.

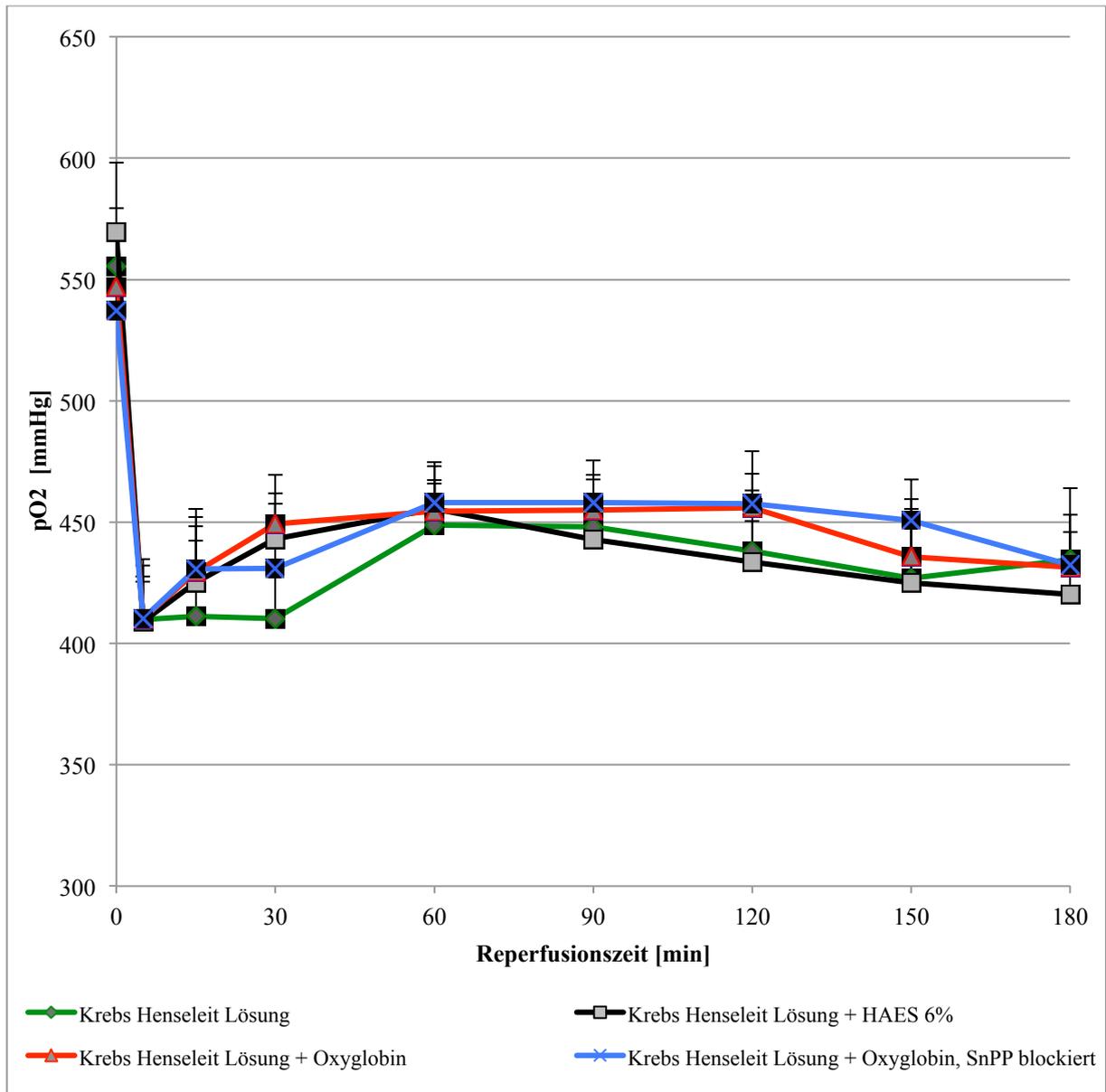


Abbildung 8 Sauerstoffpartialdruck (pO₂) im Perfusat während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL. Der pO₂-Wert wurde in allen 4 Versuchsgruppen über die gesamte Reperfusionszeit über 400 mmHg gehalten.

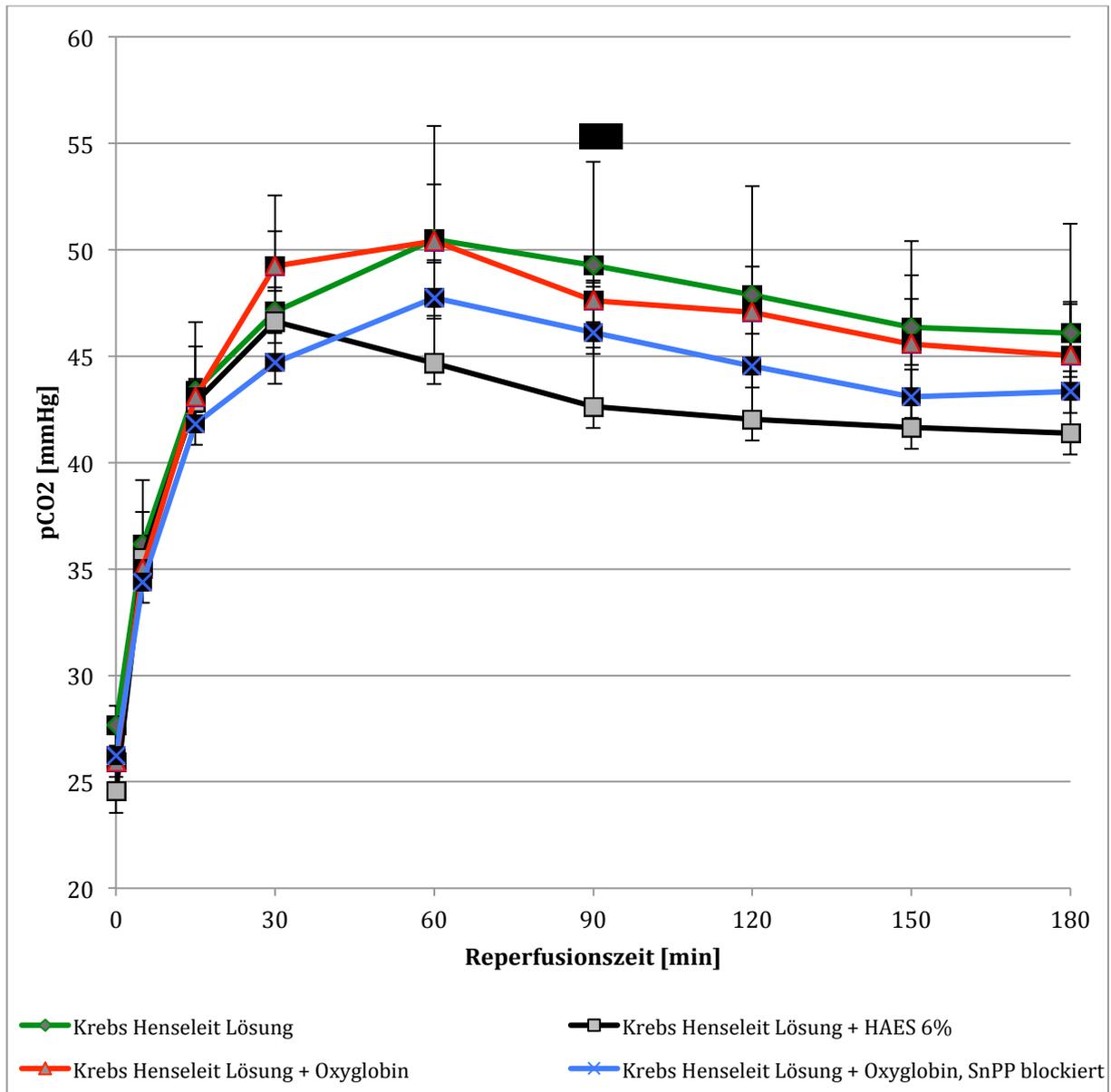


Abbildung 9 Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO₂) im Perfusat während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL. Der pCO₂-Wert war während der Reperfusion in den Versuchsgruppen A (Krebs Henseleit Lösung), C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin[®]) und D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin[®], SnPP blockiert) ähnlich. Ein reduzierte CO₂ Produktion konnte in Versuchsgruppe B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) verzeichnet werden, was zu einer statistischen Signifikanz bei 90 minütiger Reperfusion führte *p<0.05, Gruppe B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) vs. Gruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin[®]), ANOVA, t-Test

3.2 Effekt von HbG200 auf die portalvenöse Flussrate

Die portalvenöse Flussrate fiel in den ersten 30 Minuten der Reperfusion in allen vier Versuchsgruppen zunächst ab und verbesserte sich anschließend wieder. Dabei war die portalvenöse Flussrate der Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung) mit Werten zwischen 14 und 18 ml/min höher als die Flussraten der Gruppen C und D, die Werte zwischen 9 und 16 ml/min erreichten.

Bei den Versuchstieren der Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung) war die portalvenöse Flussrate mit 18-19 ml/min nach circa 90 Minuten wieder auf dem Niveau wie zu Beginn der Reperfusion. In der Versuchsgruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) fiel die Flussrate zunächst auf Werte von 9 ml/min ab, verbesserte sich während des Versuchs dann langsamer aber kontinuierlich linear. Dabei wurden zum Ende des Versuches äquivalente Werte von 18 ml/min erreicht wie in der Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung).

In der Gruppe B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) verbesserte sich die portalvenöse Flussrate nach dem initialen Abfall von 17 ml/min auf Werte bis 12 ml/min bis zum Ende des Versuches nur wenig bis 15 ml/min. Nach 120 minütiger Reperfusion war die maximale portalvenöse Flussrate in der Gruppe B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) signifikant geringer im Vergleich zur Versuchsgruppe A (Krebs Henseleit Lösung, $p < 0.05$).

Die geringste portalvenöse Flussrate zeigte sich nach 120 minütiger Reperfusion bei SnPP-geblockten Rattenlebern der Versuchsgruppe D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert). Hier fiel die Flussrate von initial 12 ml/min auf Werte bis 9 ml/min ab, nach 60 Minuten wurden Flussraten von 11 – 14 ml/min erreicht (Abbildung 10).

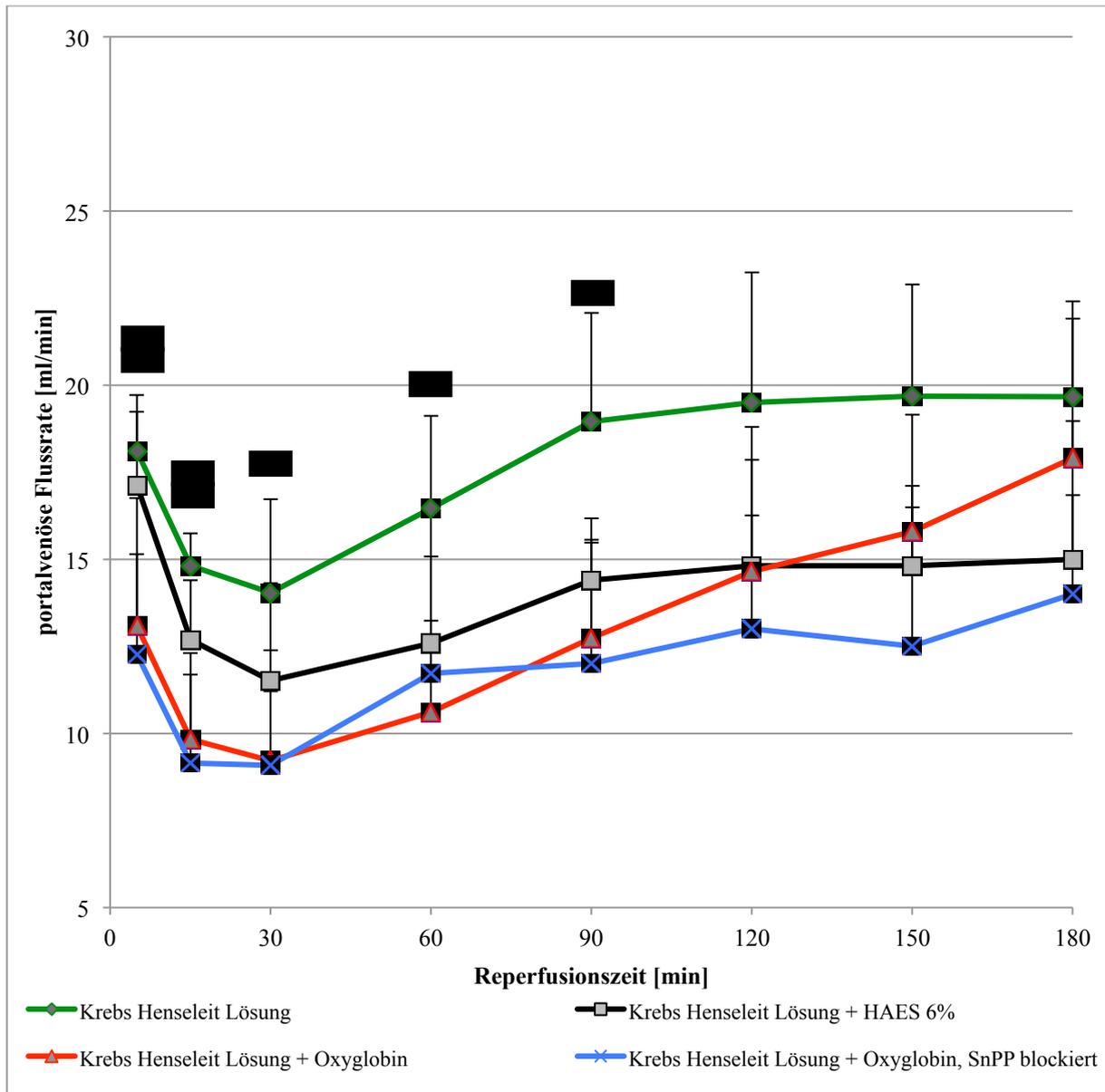


Abbildung 10 portalvenöse Flussrate während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL. Die Quantifizierung der portal-venösen Flussrate ergab in allen experimentellen Gruppen eine Reduktion der Selben während der ersten dreißig Minuten der jeweiligen Reperfusion. Im Vergleich zur Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung) zeigten die beiden Gruppen C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) und D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert), in denen das Perfusat der isoliert reperfundierten Rattenleber mit HbG200 versetzt worden war, eine signifikant geringere portalvenöse Flussrate (* $p < 0.05$, Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung) vs. Gruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin), # $p < 0.05$, Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung) vs. Gruppe D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert), ANOVA, Bonferroni).

3.3 Der Effekt von HbG200 auf den Reperfusionsschaden

Um das Ausmaß des Reperfusionsschadens zu evaluieren wurden die Transaminasen ALT und AST im Perfusat in 30 minütigen Intervallen während der Reperfusion bestimmt. Nach 180min Reperfusion waren die Transaminasen in allen Perfusaten der Versuchsgruppen A bis D erhöht. In der Versuchsgruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) waren die AST- und ALT-Werte nach 180 minütiger Reperfusion im Vergleich zu den Versuchsgruppen A (Krebs Henseleit Lösung) und B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) jedoch signifikant am niedrigsten ($p < 0.05$). Der positive Effekt eines verminderten Reperfusionsschadens wurde durch die intraperitoneale Gabe von SnPP in Gruppe D aufgehoben.

	AST [U/l]		ALT [U/l]	
	0min	180min	0min	180min
Gruppe A Krebs Henseleit-Lösung	16 ± 2	170 ± 37	9 ± 5	140 ± 28
Gruppe B Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%	22 ± 7	225 ± 47	15 ± 11	203 ± 62
Gruppe C Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin®	34 ± 12	129 ± 24 *	12 ± 6	72 ± 27 *
Gruppe D Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin®, SnPP blockiert	32 ± 4	184 ± 21 **	16 ± 4	133 ± 32 **

Abbildung 11 tabellarische Darstellung der AST und ALT-Werte zu Beginn (0min) und 180min nach Reperfusion der IPRL. Die Transaminasen waren in allen Perfusaten der Versuchsgruppen A bis D erhöht. In der Versuchsgruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) waren die AST- und ALT-Werte nach 180 minütiger Reperfusion im Vergleich zu den Versuchsgruppen A (Krebs Henseleit Lösung) und B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) jedoch signifikant am niedrigsten (*p < 0.05, Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung) bzw. Gruppe B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) vs. Gruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin), **p < 0.05, Gruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) vs. Gruppe D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert), ANOVA,t-Test).

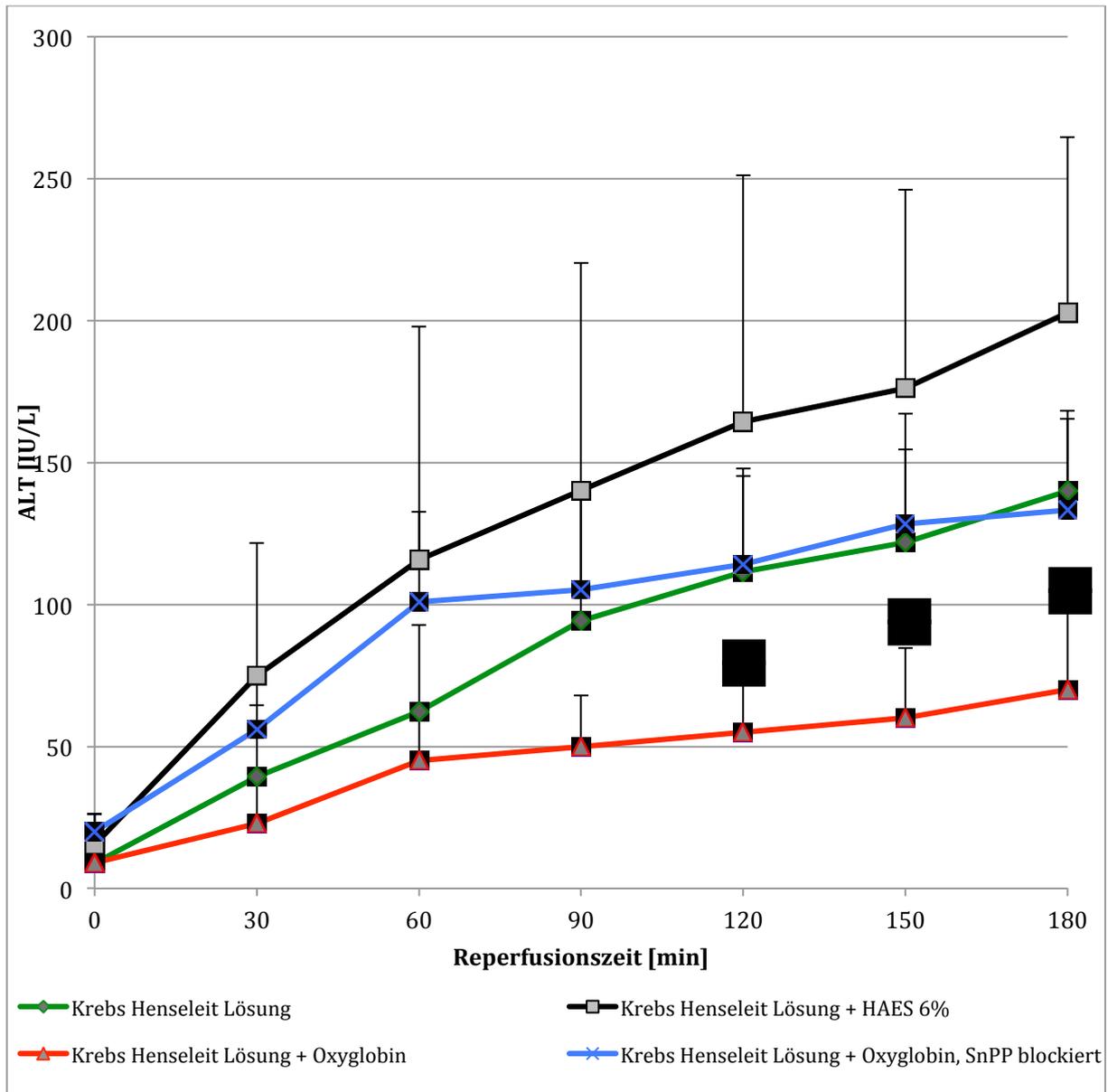


Abbildung 12 Effekt von HbG200 auf die ALT Konzentration während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL. Die Zugabe von HbG200 zu dem Perfusat reduzierte signifikant die ALT-Konzentration im Perfusat gegenüber der Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung). Dieses Ergebnis spiegelt eine Reduktion des Reperfusionsschadens wider. (*p < 0.05 vs. Gruppe C [Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin], #p < 0.05 vs. Gruppe D [Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert], ANOVA, t-Test).

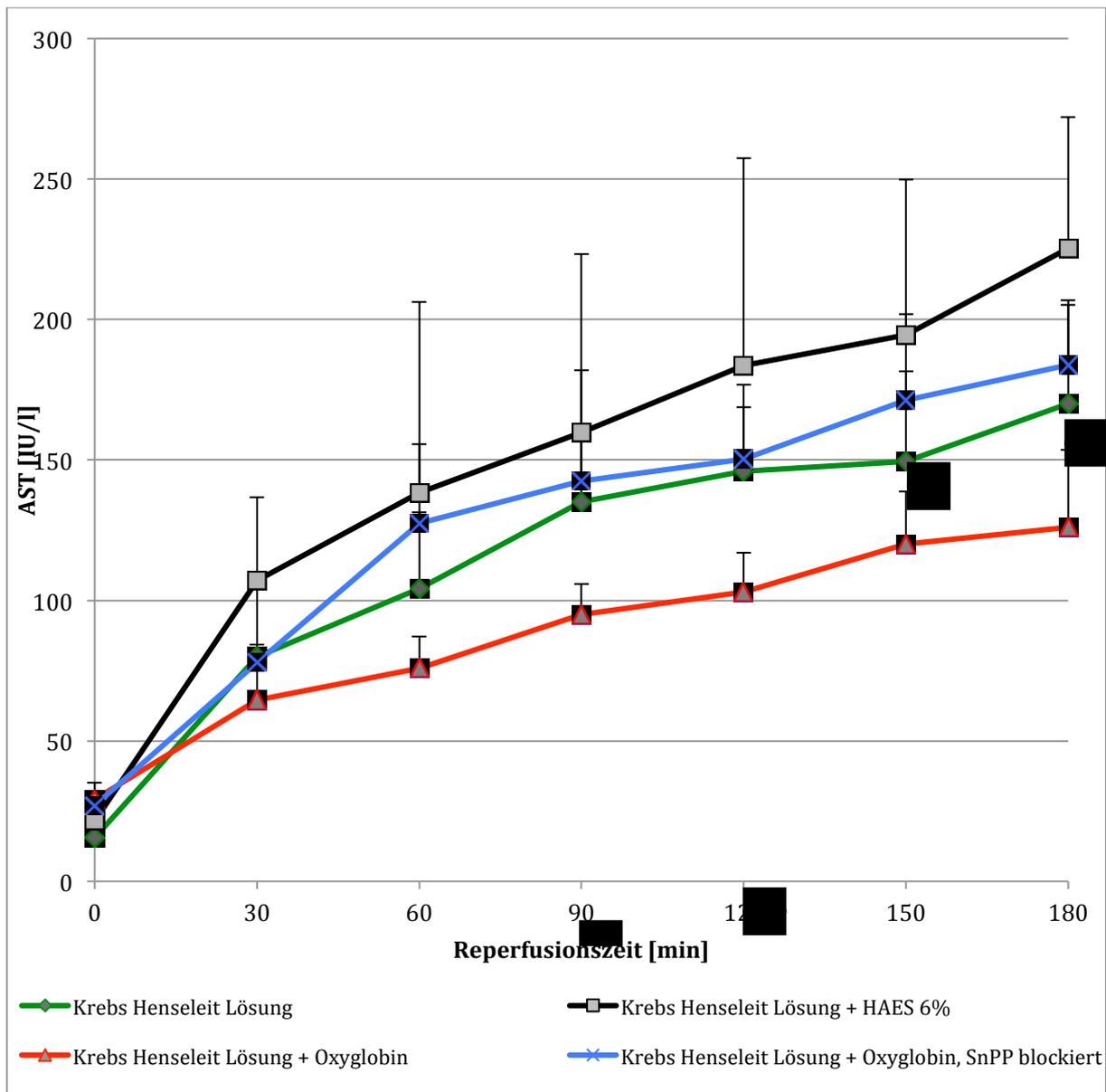


Abbildung 13 Effekt von HbG200 auf die AST Konzentration während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL. Die Zugabe von HbG200 zu dem Perfusat reduzierte signifikant die AST-Konzentration im Perfusat gegenüber der Gruppe A. Dieses Ergebnis spiegelt analog den Ergebnissen der ALT-Konzentration eine Reduktion des Reperfusionsschadens wider. (* $p < 0.05$ vs. Gruppe C [Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin], # $p < 0.05$ vs. Gruppe D [Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert], ANOVA, t-Test).

3.4 Histologische Analyse des Reperfusionsschadens

Um einen histologischen Eindruck des Parenchymschadens nach 180 minütiger Reperfusion zu erhalten wurden die Gewebeproben durch die Mitarbeiter des hiesigen Instituts für Pathologie gemäß der Punkteskala für den Schweregrad von Leberschäden nach CAMARGO et al.⁶⁵ aufgearbeitet.

Die morphometrische Analyse der Lebergewebeproben ergab einen deutlich reduzierten Parenchymschaden in der Gruppe C (Krebs-Henseleit Lösung + Oxyglobin) im Vergleich zu den Gruppen A (Krebs-Henseleit Lösung) und B (Krebs-Henseleit Lösung + HAES 6%).

Im Detail ergab die Quantifizierung des Parenchymschadens in den Versuchsgruppen A und B einen Grad-2 Zellschaden von bis zu 80%. In der Versuchsgruppe C (Krebs-Henseleit Lösung + Oxyglobin) hingegen zeigte sich ein deutlich reduzierter Zellschaden (68 % Grad-1, 32 % Grad-2 Zellschaden). Die Blockierung mit SnPP führte in der Gruppe D (Krebs-Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert) zu einem vermehrten Gewebeschaden mit mehr als 70% Grad-2 Zellschaden, vergleichbar mit den Werten der Versuchsgruppen A und B. Ein drittgradiger Leberparenchymschaden fand sich in allen 4 Versuchsgruppen nicht. Die histologische Beurteilung ergab außerdem, dass in allen 4 Versuchsgruppen keine morphometrischen Unterschiede der Zellapoptose vorlagen.

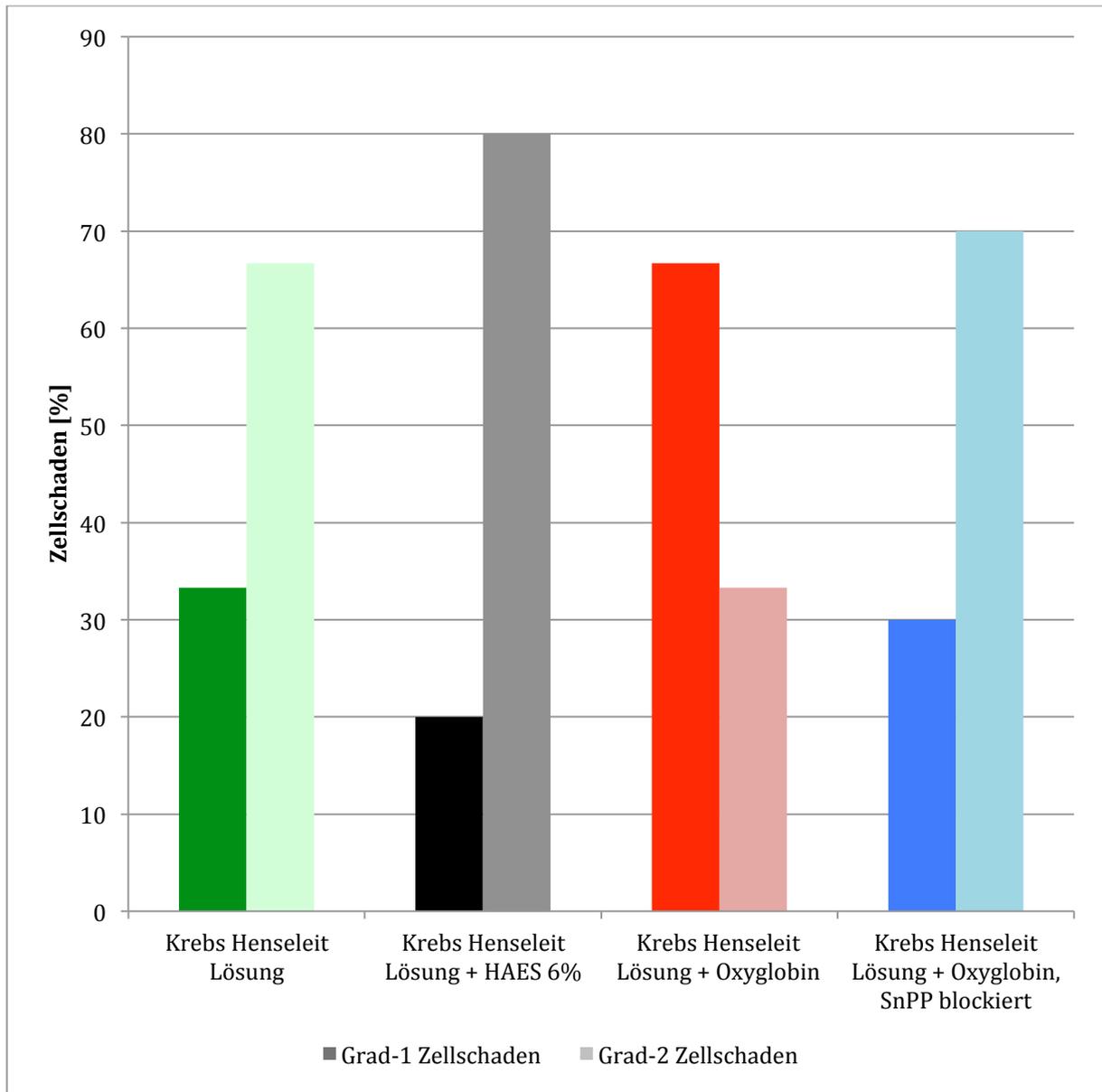


Abbildung 14 Quantifizierung des Parenchymschadens der Rattenlebern unter Anwendung des durch CAMARGO et al. erarbeiteten Punktescore⁶⁵.

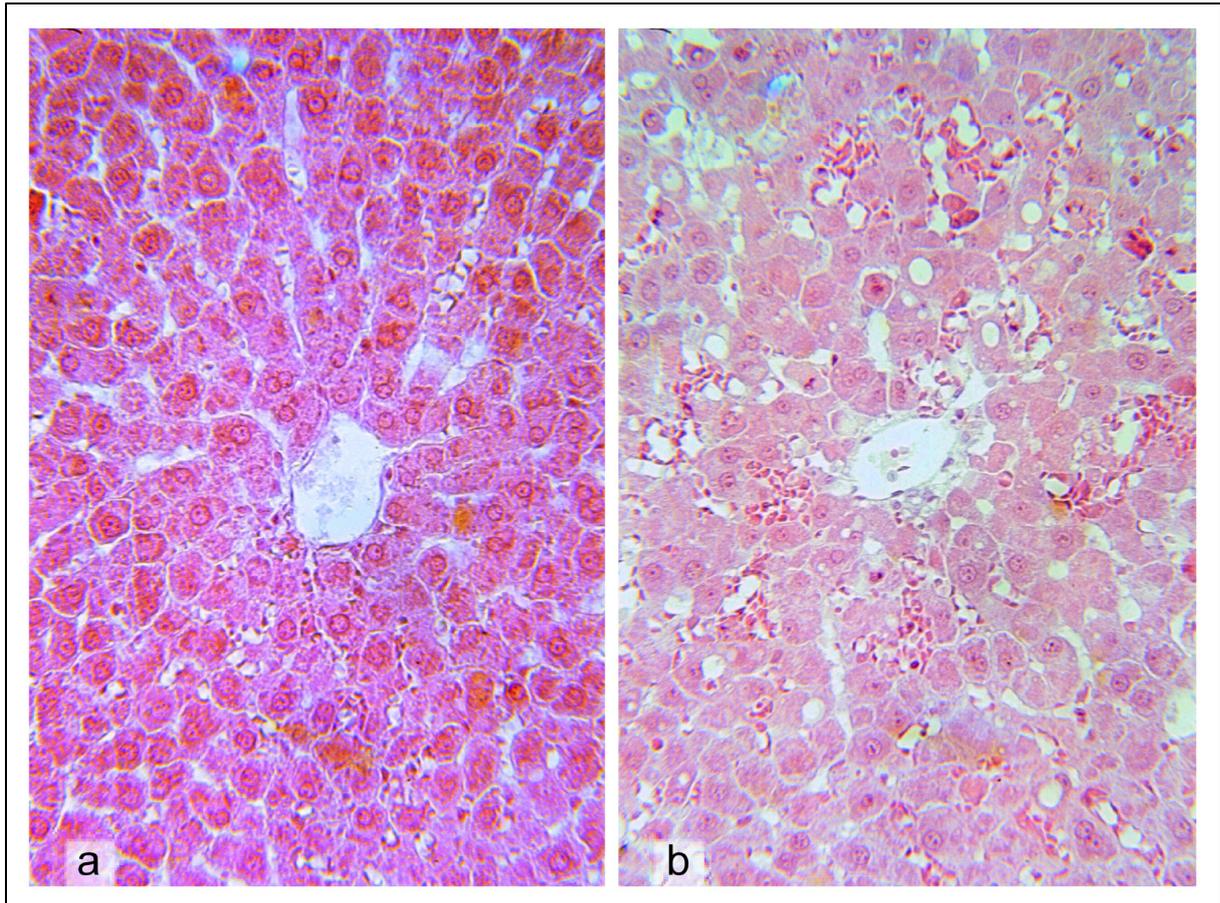


Abbildung 15 Repräsentative Darstellung des hepatischen I/R-Schadens an Hämatoxylin und Eosin-gefärbten Lebersektionen nach 180 minütiger Reperfusion der IPRL. (a) repräsentative Darstellung einer Lebersektion nach Reperfusion mit Krebs-Henseleit Lösung und Oxyglobin (Versuchsgruppe C, Vergrößerung 10x); (b) repräsentative Darstellung einer Lebersektion nach Reperfusion für die Versuchsgruppen A, B und D (Vergrößerung 10x). Im Hinblick auf die zytoplasmatische Vakuolenbildung, den Grad der Hämorrhagie und Nekrose mit Auflösung der hepatischen Stränge konnte Oxyglobin® die histologischen Zeichen des I/R-Schadens signifikant reduzieren.

3.5 Analyse der Leberfunktion und der HO-Aktivität

Zur Evaluation der Leberfunktion wurde die Galleproduktion nach 180 minütiger Reperfusion gemessen. Das Gesamtvolumen der Galleproduktion zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. So wurden in allen Versuchsgruppen zwischen 0,63 und 0,77 ml Galle während 180 min Reperfusion produziert.

In der Versuchsgruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin®) veränderte sich die Farbe des Gallesekrets nach 5 bis 10 minütiger Reperfusion ins Dunkelbraune aufgrund einer signifikant erhöhten Bilirubinkonzentration (* $p < 0,01$ vs. Gruppe A [Krebs Henseleit Lösung], B [Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%], D [Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert], ANOVA, t-Test).

	Galleproduktion nach 180 min. Reperfusion [ml]	Bilirubinkonzentration nach 180min. Reperfusion [mg/dl]
Krebs Henseleit-Lösung	0,77 ± 0,35	1,84 ± 0,47
Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%	0,63 ± 0,31	2,22 ± 0,18
Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin®	0,65 ± 0,21	9,28 ± 2,77 *
Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin®, SnPP blockiert	0,68 ± 0,11	2,46 ± 1,14

Abbildung 16 Tabellarische Darstellung der Galleproduktion und Bilirubinkonzentration 180min nach Reperfusion der IPRL. Die Galleproduktion in den vier Versuchsgruppen zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Zugabe von HbG200 zum Perfusat erhöhte die Bilirubinkonzentration in der Galleausscheidung signifikant. NB: eine Applikation von SnPP vor Organentnahme reduzierte die Bilirubinkonzentration auf das Niveau der Kontrollgruppen (*p < 0,01 vs. Gruppe A [Krebs Henseleit Lösung], B [Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%], D [Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert], ANOVA, t-Test).

3.6 Erhöhte Lipidperoxydation nach Leberreperfusion mit HbG200

Malondialdehyd (MDA), ein Surrogatmarker für die Lipidperoxydation, korreliert mit einem erhöhten Anteil an reaktiven Sauerstoffspezies und dem Grad an oxidativem Stress. Um den oxidativen Stress während der Organreperfusion zu analysieren wurde MDA im Perfusat nach 180 minütiger Leberreperfusion bestimmt. In den Versuchsgruppen C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) und D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert) wurde ein MDA Wert von 247.7 ± 200 nM respektive 389.8 ± 133 nM erreicht. Diese beiden Werte waren signifikant höher als in den Kontrollgruppen A (Krebs Henseleit Lösung) und B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%) mit 8.8 ± 1.9 nM respektive 20.0 ± 14.3 nM ($p < 0.01$).

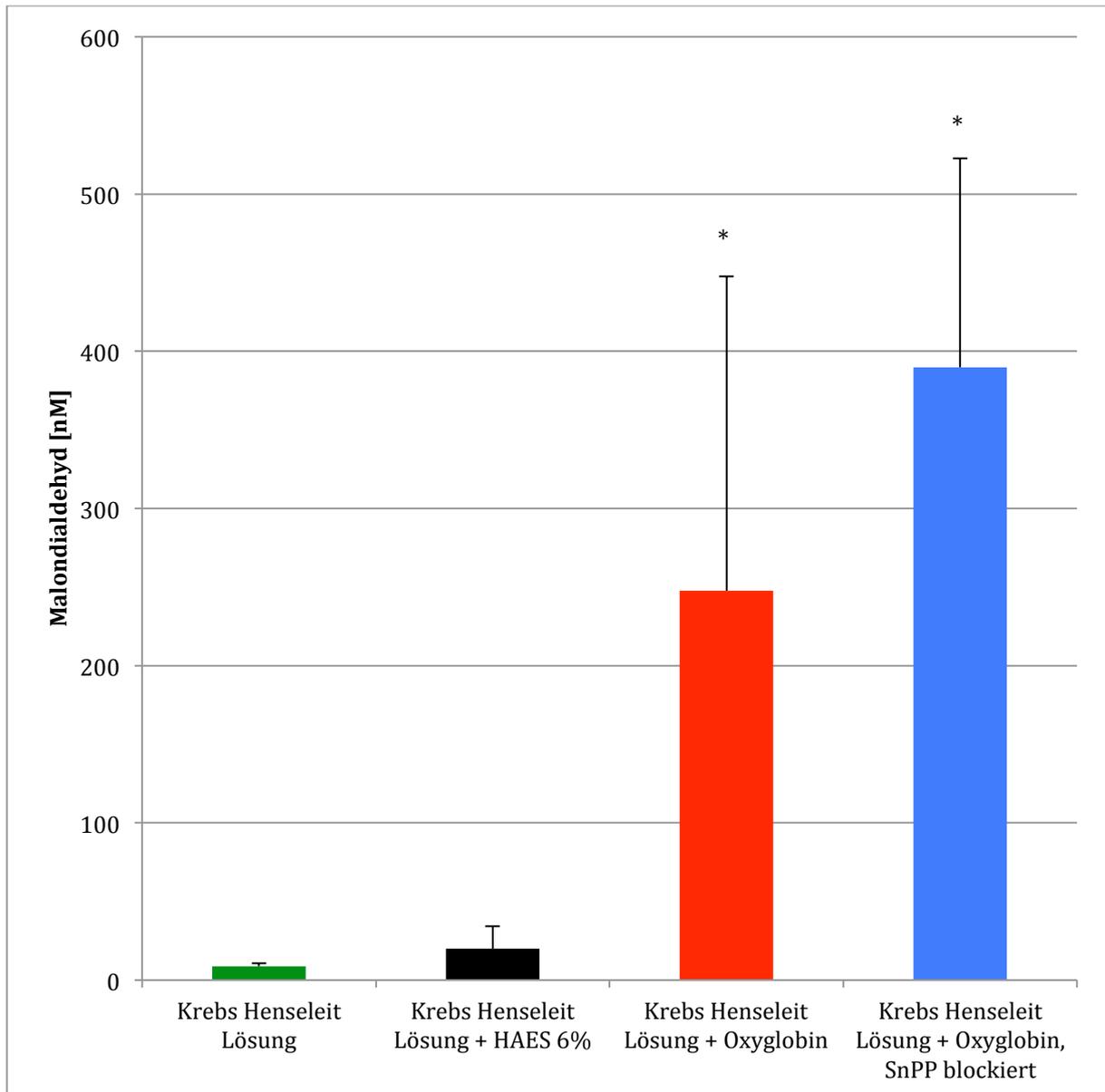


Abbildung 17 Effekt von HbG200 auf die Lipidperoxydation nach 180 minütiger Reperfusion der IPRL. Die Zugabe von HbG200 zum Perfusat erhöhte die Malondialdehyd-Konzentration signifikant in den Gruppen C und D (* $p < 0,01$ vs. Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung) und B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%), ANOVA, t-Test).

3.6 Ausmaß der hepatischen Apoptose nach kalter Organkonservierung und Reperfusion

Um das Ausmaß der Zellapoptose histologisch festzustellen wurde ein TUNEL Assay verwendet. Zwischen den Versuchsgruppen A und C konnten keine Unterschiede bezüglich der Zellapoptose festgestellt werden. Weniger als 5% der Zellen wurde nach 180 minütiger Reperfusion mit oder ohne HbG200 versetztem Perfusat (Gruppe A respektive Gruppe C) mit der TUNEL Methode positiv detektiert.

In der Versuchsgruppe B hingegen zeigten sich mit 11% signifikant mehr apoptotische Zellen nach Reperfusion mit HAES 6%-haltigem Perfusat (*p < 0,01 vs. Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung), C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) und D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert), ANOVA, t-Test).

In der Gruppe D fanden sich 7% apoptotische Zellen. Dieser Wert ist statistisch nicht signifikant gegenüber den Ergebnissen der anderen drei Versuchsgruppen.

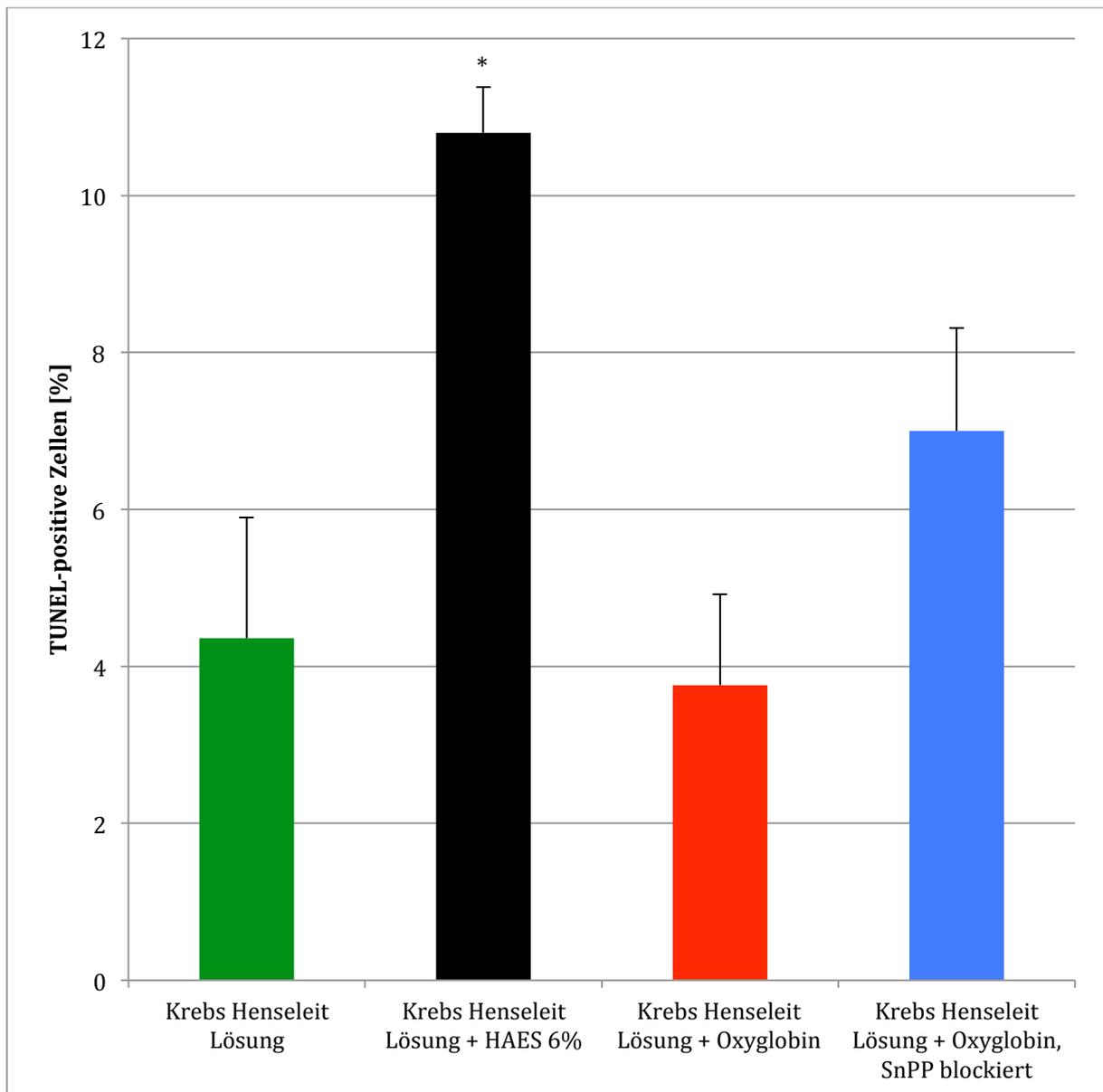


Abbildung 18 Effekt von HbG200 auf die Zellapoptose nach 180 minütiger Reperfusion der IPRL. Die Zugabe von HbG200 zum Perfusat verbesserte die Zellapoptoserate nicht signifikant. In der Versuchsgruppe B war die Rate der Zellapoptose mit $11\% \pm 0.5\%$ signifikant erhöht (* $p < 0,01$ vs. Gruppe A (Krebs Henseleit Lösung), C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) und D (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert), ANOVA, t-Test). In der Gruppe D fanden sich 7% apoptotische Zellen. Dieser Wert ist statistisch nicht signifikant gegenüber Gruppe C erhöht.

3.7 Der Effekt des HbG200 auf die HO-1 Expression und die HO-Aktivität

Die HO-1 Expression wurde per Western Blot Analyse bewertet. Nach 24 stündiger kalter Organkonservierung und 180 minütiger Reperfusion der IPRL war die HO-1 Expression in allen Gruppen erhöht. In den Rattenlebern, die mit HbG200 reperfundiert wurden (Versuchsgruppen C [Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin] und D [Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, SnPP blockiert]) war die HO-1 Expression zwei bis dreifach höher verglichen mit den Kontrollgruppen A (Krebs Henseleit Lösung) und B (Krebs Henseleit Lösung + HAES 6%). Eine vorherige Behandlung der Versuchstiere mit SnPP verhinderte nicht die Induktion von HO-1 bei Lebern, die mit HbG200 versetzten Perfusaten behandelt wurden. Die signifikant erhöhte HO-1 Expression in der Versuchsgruppe C (Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin, $p < 0.05$) korreliert stark mit einer erhöhten Bilirubin-Produktion, was eine erhöhte HO-1 Aktivität widerspiegelt. Nach 180 minütiger Reperfusion enthielt das ausgeschiedene Gallesekret der mit HbG200 reperfundierten Lebern (Versuchsgruppe C, Krebs Henseleit Lösung + Oxyglobin) mehr als die 4-fache Bilirubinkonzentration gegenüber den Kontrollgruppen A und B (Gruppe C: 9.28 ± 2.8 mg/dL, Gruppe A: 1.84 ± 0.5 mg/dL, Gruppe B: 2.22 ± 0.2 mg/dL).

Weiterhin führte die funktionelle Blockade der HO-1 durch die Applikation von SnPP zu einer geringeren Bilirubinkonzentration in der produzierten Galle mit gleichen Werten wie in den Versuchsgruppen A und B gemessen (2.46 ± 1.1 mg/dL, vergleiche Abbildung 15).

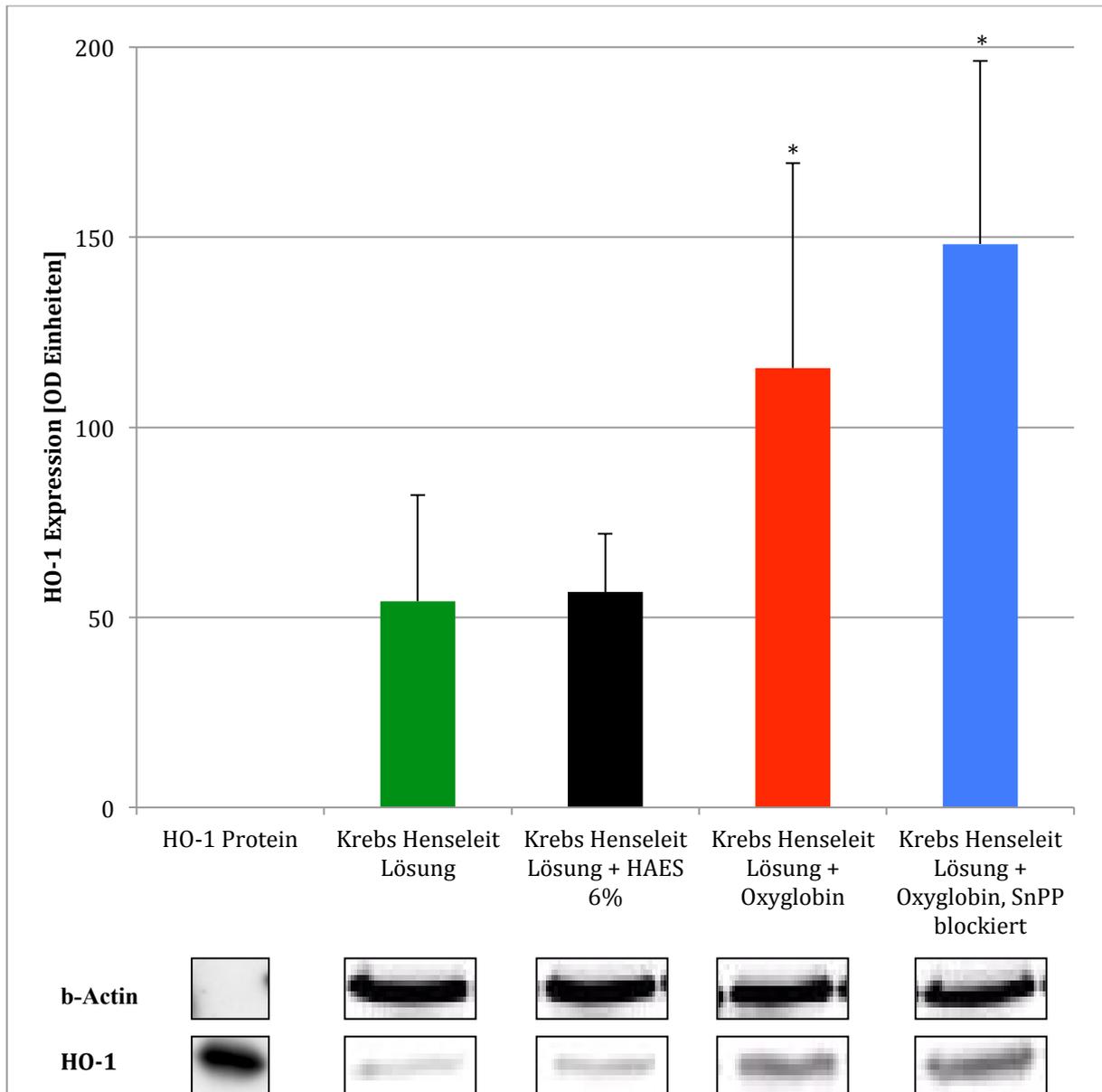


Abbildung 19 Hepatische Expression der HO-1 bemessen durch Western Blot Analyse nach 180 minütiger Reperfusion der IPR. Die Expression der HO-1 war in den mit HbG200 versetzten Perfusaten (Gruppe C und D) signifikant höher (* $p < 0,01$ vs. Gruppen A und B, ANOVA, t-Test).

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Hämoglobin-Glutamer 200 (HbG200), ein gereinigter hämoglobin-basierter Sauerstoff-Träger boviner Herkunft, ein effektives Agens darstellt um den Reperfusionsschaden nach kalter Leberischämie zu reduzieren. So konnte gezeigt werden, dass die Leberreperfusion mit HbG200 die Organschädigung nach kalter Leberkonservierung signifikant vermindert. Es ist davon auszugehen, dass die Minimierung des kalten Ischämie-Reperfusionsschadens durch eine verbesserte Organoxygenierung und eine Hämoglobin-vermittelte Induktion der Hämoxygenase-1 (HO-1) hervorgerufen wird, welches die Biliverdin und Bilirubin-Produktion steigert. Diese beiden Moleküle sind wichtige Antioxidantien und wirken als intrazelluläre Radikalfänger^{67,68}.

In allen Versuchsgruppen zeigte sich nach Reperfusion eine Verminderung des portalvenösen Blutflusses, wobei die Flüße in Gruppe C und D gegenüber den beiden Kontrollgruppen A und B in den ersten 60 Minuten signifikant niedriger waren.

Vasokonstriktion ist ein bekannter Nebeneffekt zellfreier Hämoglobinlösungen, da Hämoglobin eine hohe Affinität zu Stickstoffmonoxid (NO) besitzt. NO und Endothelin-1 (ET-1) sind vasoaktive Moleküle und halten als Gegenspieler den sinusoidalen Fluss der Leber innerhalb eines dynamischen Fließgleichgewichtes⁶⁹, wobei NO vasodilatatorisch wirkt. Ein weiteres wichtiges Vasorelaxanz innerhalb der hepatischen Mikrozirkulation ist Kohlenstoffmonoxid (CO). CO entsteht im Rahmen des Hämoglobinstoffwechsels durch den hämoxygenase-vermittelten Abbau zu Biliverdin, wobei zweiwertiges Eisen und CO freigesetzt werden. Die vasorelaxierende Wirkung des CO konnte in vitro und in vivo für verschiedene Gewebe und Zelltypen nachgewiesen werden⁸⁴⁻⁸⁶. CO wirkt an den Kupffer-Zellen der Leber als ein endogener Faktor um den Tonus der Sinusoide zu reduzieren⁷⁰. PANNEN et al. konnten die wichtige Funktion von CO als endogener Faktor herausarbeiten, der als Modulator der vaskulären portal-venösen Perfusion dient⁷¹. Während Stickstoffmonoxid (NO) ein potenter Vasodilatator im Bereich der arteriellen hepatischen Zirkulation darstellt, aber nur einen geringen vasodilatatorischen Effekt

im portalvenösen Gefäßbett hat, so reguliert CO nicht den arteriellen Gefäßtonus der Leber, sondern hat relaxierende Wirkung auf den portalvenösen Gefäßtonus. Eine erhöhte Konzentration an CO führt zu einem vergrößerten Gefäßlumen und einem erleichterten Blutfluss im betroffenen Stromgebiet. In der Situation des I/R-Schadens, in der es über die in der Einleitung genannten Mechanismen zu einer Mikrozirkulationsstörung – unter anderem mit Konstriktion der Arteriolen – kommt, könnte eine erhöhte Konzentration an CO diese Vorgänge abschwächen und somit einen pathophysiologisch bedeutsamen Teilaspekt des Ischämie-Reperfusionsschadens begrenzen. Intravitalmikroskopische Studien an der Leber zeigten, dass CO für die Aufrechterhaltung eines niedrigen sinusoidalen Tonus und einer suffizienten Perfusion unter Normalbedingungen⁷⁰ und nach hämorrhagischem Schock⁷¹ notwendig ist. Die Untersuchung der Mikrozirkulation an einem Hautlappen-Modell zeigte vergleichbare vasoregulatorische Effekte der Hämoxigenase, die von den Autoren auf CO zurückgeführt wurden^{72,73}.

Die Reperfusion der kalt konservierten Rattenleber mit einer HbG200 supplementierten Lösung führte in diesen Experimenten initial zu einer Verminderung des portalvenösen Flußes, gefolgt von einer kontinuierlichen Steigerung der portalvenösen Flußrate, die nach 120 Minuten Reperfusion wieder ähnliche Werte wie Kontrollgruppe A erreicht. Während sich die initial verminderte portalvenöse Flußrate durch eine gesteigerte Endothelin-1 Wirkung, aufgrund mangelnder NO-Aktivität erklärt, so läßt sich die kontinuierliche Verbesserung der Flußrate in Gruppe C im Wesentlichen durch eine zunehmende CO-Freisetzung erklären. Die Substratinduktion der Hämoxigenase durch HbG200 führt zu gesteigerter Aktivität des Enzyms und somit zu einer vermehrten Bildung von CO. Unterstützt wird diese These vor allem dadurch, dass in Gruppe D nach SnPP-Blockade der Hämoxigenase die Verbesserung des portalvenösen Blutflusses im Wesentlichen ausbleibt.

Der Reperfusionsschaden und die Organfunktion nach kalter Ischämie/Reperfusion der Leber korrelieren normalerweise mit dem portalvenösen Blutfluß. Das mikrovaskuläre Perfusionsversagen der Leber im Rahmen der Organreperfusion ist durch eine Heterogenität der sinusoidalen Perfusion charakterisiert und führt normalerweise zu einem Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffzufuhr und Sauerstoffbedarf innerhalb der

Sinusoide. Dieser Mechanismus trägt letztlich zur Organdysfunktion und einem Organversagen bei^{70,74}.

In diesem Zusammenhang demonstrierten CABRALES et al., dass HbG200 temporär abnorm niedrige Gewebepfusionswerte in Bezug auf arteriolären und venulären Blutfluss und funktioneller kapillärer Dichte herbeiführt⁷⁵. Paradoxe Weise kommt es unter HbG200-Gabe zwar zu einem reduziertem Sauerstofftransport im Mikrozirkulationsgebiet, trotzdem ergeben sich wahrscheinlich erhöhte pO₂ Werte im Gewebe. Mehrere Studien zeigen sowohl am theoretischen Modell als auch an tierexperimentellen Modellen der Austauschtransfusion sowie der Ischämie/Reperfusion, dass im Mikrozirkulationsgebiet der Leber in Gegenwart von freiem Hämoglobin die Sauerstoffabgabe und Sauerstoffdiffusion in das Gewebe markant erhöht sind⁷⁵⁻⁷⁸. Basierend auf diesen Ergebnissen postulierten CABRALES et al., dass der Sauerstoffbedarf im Mikrozirkulationsgebiet und im Gewebe in Gegenwart von molekularem Hämoglobin reduziert ist und dass die Infusion von freien Hämoglobin-Lösungen das Gewebe vor den Effekten der Hypoxie schützen kann⁷⁵. Diese Erkenntnisse stützen die Ergebnisse dieser Arbeit und erklären, warum der Reperfusionsschaden nach kalter I/R der Leber mit einem HbG200 supplementierten Perfusat (Gruppe C) nicht negativ durch den deutlich reduzierten portalvenösen Blutfluss beeinträchtigt wurde. Sie erläutern zudem, warum eine Reperfusion mit HAES 6% supplementiertem Perfusat einen beeinträchtigten portalvenösen Blutfluss ergab und mit den höchsten Transaminasen-Werten, einer erhöhten Prozentzahl an apoptotischen Zellen und histologisch nachgewiesener Gewebeschädigung vergesellschaftet war. Es ist daher davon auszugehen, dass die Reduktion des Reperfusionsschadens trotz eines initial schlechteren hepatischen Blutflusses durch eine signifikante Verbesserung der Organoxygenierung erreicht wird.

Eine offensichtliche Steigerung der Organoxygenierung durch HbG200 wird untermauert durch den Nachweis erhöhter Malondialdehyd-Werte. Dies spiegelt sich in den hohen MDA-Werten der HbG200-supplementierten Perfusaten der Gruppen C und D wider.

Von den vielen biologischen Zielen des oxidativen Stresses sind Lipide die am meisten beteiligte Molekülklasse. Lipidoxidation führt zur Bildung von weiteren Produkten, insbesondere Aldehyde. Aldehyde besitzen die Fähigkeit den oxidativen Schaden weiter zu exazerbieren⁷⁹. Langlebigkeit und hohe Reaktivität zeichnen diese Moleküle aus und befähigen sie innerhalb und außerhalb von Zellen mit anderen Biomolekülen wie Nukleinsäuren und Proteinen zu interagieren⁸⁰. Dabei tritt häufig ein irreversibler Schaden an den Funktionsmechanismen der Zellen auf. Malondialdehyd (MDA) ist der Hauptvertreter dieser Molekülklasse und ein vielfach untersuchtes Molekül. MDA entsteht hauptsächlich durch die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren⁸¹. Es ist ein reaktives Aldehyd und eines von vielen sogenannten „reaktiven elektrophilen Spezies“. Diese Verbindungen verursachen toxischen Stress an und in Zellen und können kovalente Proteinbindungen ausbilden, die zu sogenannte „advanced lipoxidation end-products“ (ALE) führen⁸². MDA wird als Surrogatmarker für Lipidperoxydation verwendet⁸³ und korreliert mit der Höhe des oxidativen Stress^{23,84}.

Auf den ersten Blick erscheinen die Ergebnisse dieser Arbeit widersprüchlich in Bezug auf eine Verminderung des Reperfusionsschadens der mit HbG200 supplementiert reperfundierten Lebern, da eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffradikale zusammen mit einer erhöhten Lipidperoxygenierung normalerweise eine erhöhte Organschädigung zur Folge hat⁸⁴.

Die Organreperfusion mit HbG200-supplementiertem Perfusat nach kalter Ischämie führte in diesen Experimenten zu einer Induktion der zytoprotektiven Hämoxigenase-1. Hämoglobin-Glutamer 200 besteht aus Häm, welches als Substrat und höchstpotenter Induktor von HO-1 gilt⁸⁵. HO-1 spielt eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der oxidativen und antioxidativen Homöostase wenn ein Zellschaden auftritt⁸⁶. HO-1 katalysiert die initiale und geschwindigkeitslimitierende Reaktion im Hämkatabolismus. Dabei handelt es sich um die oxidative Aufspaltung des Häm Moleküls in äquimolare Anteile von Biliverdin-IXa, Kohlenstoffmonoxid und Eisen⁸⁷. Biliverdin-IXa wird durch das Enzym Biliverdinreduktase weiter reduziert zu Bilirubin, welches als potentes Antioxidans agiert und Zellen gegen oxidativen Stress schützt⁸⁸.

Die Hochregulation der HO-1 Expression ist einer der kritischen zytoprotektiven Mechanismen und wird durch zellulären Stress wie Entzündung, Ischämie, Hypoxie, Hyperoxie, Hyperthermie oder Strahlung induziert⁸⁹. MAINES et al. konnte zeigen, dass die Induktion von HO-1 einer der sensitivsten Indikatoren für durch oxidativen Stress hervorgerufenen zellulären Schaden darstellt⁸⁷. Dadurch, dass die Induktion von HO-1 durch Applikation von verschiedenen Antioxidantien wie α -Tocopherol oder Allopurinol unterbunden wird, nimmt man an, dass die Induktion der HO-1 im Rahmen des I/R-Schadens unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies erfolgt⁹⁰. Der genaue Mechanismus der HO-1 vermittelten Zytoprotektion gegen den I/R-Schaden sowie die Immunmodulation sind immer noch nicht genau erfasst, die Verringerung des hepatischen I/R-Schadens scheint allerdings auf einer direkten HO-1 Überexpression und nicht einem enzymatischen Signalweg zu basieren⁹¹.

In dieser Arbeit verursachte die Organreperfusion mit HbG200 supplementiertem Perfusat nach kalter I/R der Leber einen signifikanten Anstieg der hepatischen HO-1-Expression, die in der Western Blot Analyse gezeigt werden konnte (S. 54f.). Die Analyse der Galleexkretion erbrachte in allen 4 Versuchsgruppen ähnliche Mengen, die mit HbG200-supplementiertem Perfusat reperfundierten Leber schieden jedoch Galle mit einer hohen Bilirubin-Konzentration aus. Dieses Ergebnis untermauert eine gesteigerten HO-Aktivität während der Organreperfusion.

Die antioxidativen Effekte durch HO-1 Induktion zusammen mit einer erhöhten Bilirubinproduktion wurden ausführlich in einer Reihe von Transplantationsmodellen beschrieben^{65,67,92}. HO-1 hält die Gewebearchitektur aufrecht, stabilisiert die Organfunktion und führt letztendlich zu einem verlängerten Transplantatüberleben^{67,92}.

Unkonjugiertes Bilirubin und Biliverdin - die Endprodukte des HO-Katabolismus bei Säugetieren - gelten selbst als wichtige Induktoren für HO-1, insbesondere wenn eine biliäre Dysfunktion im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens auftritt⁶⁷. Biliverdin und Bilirubin sind starke Antioxidantien, die als intrazelluläre Radikalfänger dienen. Sie binden Hydroxylradikale, Sauerstoff- und Lipidhydroperoxide⁹³ und können so zur Verringerung des Zellschadens im Rahmen der Ischämie- und Reperfusionsphasen beitragen. Neben diesen antioxidativen

Effekten konnten die Arbeitsgruppen um NEUZIL und STOCKER sowie NAGAKAMI et al. zeigen, dass Bilirubin Auswirkungen auf die zelluläre Immunantwort hat: Bilirubin kann die humane Lymphozytenantwort unter anderem durch Produktion von Interleukin-2 und antikörper-abhängige sowie antikörper-unabhängige Signalwege inhibieren^{94,95}. Ferner konnte Biliverdin eine inhibitorische Wirkung auf das humane Komplement-System in vitro nachgesagt werden⁹⁵.

Die Wichtigkeit der HO-1-Induktion in unserem Modell wurde bestätigt durch Inhibition der HO-Aktivität mit SnPP vor Organentnahme. Hierdurch wurde nicht nur die Bilirubinproduktion auf Kontrollgruppenniveau reduziert, sondern hob auch den positiven Effekt auf den Reperfusionsschaden auf. Analog zu den Studien von CARRAWAY et al. und SCHMIDT et al. hatte SnPP keinen Effekt auf die HO-1 Proteinexpression, so dass die hier aufgestellte Hypothese weiter gestärkt wird, dass eine erhöhte Biliverdin- und Bilirubin-Produktion in diesem Reperfusionmodell sehr wichtig ist für die Reduktion des Reperfusionsschadens^{96,97}. Die offensichtlichen zytoprotektiven Effekte des Biliverdin und Bilirubin in diesem Ischämie-Reperfusionmodell korrespondieren sehr gut mit vorherigen Studien von FONDEVILLA et al.⁹⁸, die zeigen, dass die Reperfusion kältekonservierter Rattenlebern mit einem Biliverdin-versetztem Perfusat sowohl in vitro als auch im Rahmen eines Transplantationsmodells Rattenlebern vor einem Ischämie- und Reperfusionsschaden schützt⁹⁹.

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit zeigt, dass die Leberreperfusion mit einem Perfusat bestehend aus polymerisierten bovinen Hämoglobinmolekülen (HbG200, Oxyglobin®) den Reperfusionsschaden nach kalter Leberkonservierung effektiv reduziert. Die Leberreperfusion war temporär mit einer reduzierten portalen Flussrate und einer langsamen Restitution der Leberperfusion assoziiert, während die Gewebeoxygenierung aufrecht erhalten werden konnte. In der initialen Reperusionsphase könnte dies von Vorteil sein, um die höchst fragilen sinusoidalen Endothelzellen nach kalter Leberkonservierung zu schützen.

Nach kalter Ischämie und Reperfusion bewirkt HbG200 eine verbesserte Organoxygenierung und eine Induktion von HO-1 mit sukzessiver Hämaufspaltung. Der Hämabbau resultiert in einer erhöhten Bilirubin und Kohlenstoffmonoxid-Produktion, ein essentieller Prozess um die antioxidativen Eigenschaften von HO-1 zu mediieren und die hepatische Mikrozirkulation zu schützen. Es ist davon auszugehen, daß in diesem Modell der erhöhte oxidative Stress während der Reperfusion in Gegenwart von polymerisiertem Hämoglobin durch die antioxidativen Eigenschaften von HO-1 mehr als kompensiert wird. Die intravenöse Applikation von Lösungen, die freie Hämoglobinmoleküle beinhalten (HBOC), könnte eine attraktive Herangehensweise zur Reduktion des I/R-Schadens bei Lebertransplantaten sein. Die deutlich erhöhten MDA-Werte nach Leberreperfusion mit HbG200 versetztem Perfusat, belegen einen hohen Grad an oxidativem Stress, durch die verbesserte Organoxygenierung. Es ist daher davon auszugehen, dass in Situationen, in denen eine insuffiziente HO-1 Aktivität besteht, die Organreperfusion mit Hämoglobin-Glutamer 200 mehr Schaden als Nutzen an Kälte-konservierten Lebern anrichten kann.

In diesem Zusammenhang werden weiterführende Studien zeigen, ob die HbG200-Präkonditionierung potentieller Transplantatlebern, zur HO-1 Induktion vor Explantation, eine alternative Möglichkeit darstellt, um den negativen Effekt der Lipidperoxydation bei Reperfusion zu umgehen und den Ischämie-/Reperfusionsschaden zu vermindern.

6. Literaturverzeichnis

1. Adam, R. & Hoti, E. Liver transplantation: the current situation. *Semin. Liver Dis.* **29**, 3–18 (2009).
2. Strassburg, C. P. & Manns, M. P. Lebertransplantation. *Internist* **50**, 550–560 (2009).
3. Berg, C. L. *et al.* Liver and intestine transplantation in the United States 1998–2007. *Am J Transplant* **9**, 907–931 (2009).
4. Schrem, H. *et al.* Langzeit-Outcome nach Lebertransplantation. *Chirurg* **79**, 121–129 (2008).
5. Schlitt, H. J. *et al.* [Current developments in liver transplantation in Germany: MELD-based organ allocation and incentives for transplant centres]. *Z Gastroenterol* **49**, 30–38 (2011).
6. Barshes, N. R., Horwitz, I. B., Franzini, L., Vierling, J. M. & Goss, J. A. Waitlist mortality decreases with increased use of extended criteria donor liver grafts at adult liver transplant centers. *Am J Transplant* **7**, 1265–1270 (2007).
7. Busuttil, R. W. & Tanaka, K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* **9**, 651–663 (2003).
8. Attia, M., Silva, M. A. & Mirza, D. F. The marginal liver donor--an update. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* **21**, 713–724 (2008).
9. Foster, R., Zimmerman, M. & Trotter, J. F. Expanding donor options: marginal, living, and split donors. *Clin Liver Dis* **11**, 417–429 (2007).

10. Gastaca, M. Extended criteria donors in liver transplantation: adapting donor quality and recipient. *Transplant Proc* **41**, 975–979 (2009).
11. Selzner, M. & Clavien, P. A. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin. Liver Dis.* **21**, 105–113 (2001).
12. Koneru, B. & Dikdan, G. Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation* **73**, 325–330 (2002).
13. Strasberg, S. M., Howard, T. K., Molmenti, E. P. & Hertl, M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* **20**, 829–838 (1994).
14. Baumgartner, U. *et al.* Early detection of graft dysfunction after orthotopic liver transplantation in man by serum and biliary bile acid analysis. *Hepatogastroenterology* **42**, 950–960 (1995).
15. Uemura, T. *et al.* Liver retransplantation for primary nonfunction: analysis of a 20-year single-center experience. *Liver Transpl* **13**, 227–233 (2007).
16. Ploeg, R. J. *et al.* Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis. *Transplantation* **55**, 807–813 (1993).
17. Jaeschke, H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J. Hepatol.* **25**, 774–780 (1996).
18. Serracino-Inglott, F., Habib, N. A. & Mathie, R. T. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* **181**, 160–166 (2001).
19. de Rougemont, O., Dutkowski, P. & Clavien, P.-A. Biological modulation of liver ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant* **15**, 183–189 (2010).

20. Gao, W., Bentley, R. C., Madden, J. F. & Clavien, P. A. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* **27**, 1652–1660 (1998).
21. Farmer, D. G., Amersi, F., Kupiec-Weglinski, J. & Busuttil, R. W. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. *Transplantation Reviews* **14**, 106–126 (2000).
22. Imamura, H., Brault, A. & Huet, P. M. Effects of extended cold preservation and transplantation on the rat liver microcirculation. *Hepatology* **25**, 664–671 (1997).
23. Clavien, P. A., Harvey, P. R. & Strasberg, S. M. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* **53**, 957–978 (1992).
24. Bigelow, D. J. & Thomas, D. D. Rotational dynamics of lipid and the Ca-ATPase in sarcoplasmic reticulum. The molecular basis of activation by diethyl ether. *J Biol Chem* **262**, 13449–13456 (1987).
25. Upadhyay, G. A., Topp, S. A., Hotchkiss, R. S., Anagli, J. & Strasberg, S. M. Effect of cold preservation on intracellular calcium concentration and calpain activity in rat sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* **37**, 313–323 (2003).
26. Upadhyay, A. G. *et al.* Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat. *Hepatology* **26**, 922–928 (1997).
27. Burns, E. H., Marciel, A. M. & Musser, J. M. Activation of a 66-kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infect. Immun.* **64**, 4744–4750 (1996).

28. Partridge, C. A., Phillips, P. G., Niedbala, M. J. & Jeffrey, J. J. Localization and activation of type IV collagenase/gelatinase at endothelial focal contacts. *Am J Physiol* **272**, L813–22 (1997).
29. Gomez, D. E., Yoshiji, H., Kim, J. C. & Thorgeirsson, U. P. Ulex europaeus I lectin induces activation of matrix-metalloproteinase-2 in endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 177–182 (1995).
30. Gearing, A. J. *et al.* Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF- α . *J. Leukoc. Biol.* **57**, 774–777 (1995).
31. Upadhyya, G. A. & Strasberg, S. M. Platelet adherence to isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation. *Transplantation* **73**, 1764–1770 (2002).
32. Schoenwaelder, S. M., Yuan, Y., Cooray, P., Salem, H. H. & Jackson, S. P. Calpain cleavage of focal adhesion proteins regulates the cytoskeletal attachment of integrin α IIb β 3 (platelet glycoprotein IIb/IIIa) and the cellular retraction of fibrin clots. *J Biol Chem* **272**, 1694–1702 (1997).
33. Gow, A. J., Thom, S. R. & Ischiropoulos, H. Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol* **274**, L112–8 (1998).
34. Bauer, G. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res.* **20**, 4115–4139 (2000).
35. Sindram, D., Porte, R. J., Hoffman, M. R., Bentley, R. C. & Clavien, P. A. Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver: a Kupffer cell-mediated injury. *FASEB J* **15**, 1230–1232 (2001).

36. Colletti, L. M. *et al.* Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* **85**, 1936–1943 (1990).
37. Jaeschke, H., Farhood, A., Bautista, A. P., Spolarics, Z. & Spitzer, J. J. Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* **264**, G801–9 (1993).
38. Shito, M. *et al.* Interleukin 1 Receptor Blockade Reduces Tumor Necrosis Factor Production, Tissue Injury, and Mortality After Hepatic Ischemia-Reperfusion in the Rat 1. *Transplantation* **63**, 143 (1997).
39. Bajt, M. L., Farhood, A. & Jaeschke, H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G1188–95 (2001).
40. Topp, S. A., Upadhyay, G. A. & Strasberg, S. M. Leukocyte adhesion to cold-preserved rat endothelial cells: role of actin disassembly and ICAM-1. *Liver Transpl* **9**, 1286–1294 (2003).
41. Farooq, M. M. *et al.* PECAM-1/IgG attenuates peroxynitrite-mediated extremity reperfusion injury. *J Vasc Surg* **34**, 555–558 (2001).
42. Vachharajani, T. J., Work, J., Issekutz, A. C. & Granger, D. N. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **278**, H1613–7 (2000).
43. Jaeschke, H. & Farhood, A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* **260**, G355–62 (1991).

44. Le Moine, O. *et al.* Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice. *Hepatology* **31**, 1266–1274 (2000).
45. Omar, R., Nomikos, I., Piccorelli, G., Savino, J. & Agarwal, N. Prevention of postischaemic lipid peroxidation and liver cell injury by iron chelation. *Gut* **30**, 510–514 (1989).
46. Eppihimer, M. J. & Granger, D. N. Ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial interactions in postcapillary venules. *Shock* **8**, 16–25 (1997).
47. Grace, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg* **81**, 637–647 (1994).
48. Menger, M. D., Pelikan, S., Steiner, D. & Messmer, K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* **263**, H1901–6 (1992).
49. Menger, M. D., Rücker, M. & Vollmar, B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary 'no-reflow'. *Shock* **8**, 2–7 (1997).
50. Tauber, S., Menger, M. D. & Lehr, H.-A. Microvascular in vivo assessment of reperfusion injury: significance of prostaglandin E(1) and I(2) in postischemic "no-reflow" and "reflow-paradox". *J Surg Res* **120**, 1–11 (2004).
51. Winslow, R. M. New transfusion strategies: red cell substitutes. *Annu Rev Med* **50**, 337–353 (1999).
52. Haney, C. R., Buehler, P. W. & Gulati, A. Purification and chemical modifications of hemoglobin in developing hemoglobin based oxygen carriers. *Adv Drug Deliv Rev* **40**, 153–169 (2000).

53. Driessen, B., Jahr, J. S., Lurie, F., Golkaryeh, M. S. & Gunther, R. A. Arterial oxygenation and oxygen delivery after hemoglobin-based oxygen carrier infusion in canine hypovolemic shock: a dose-response study. *Crit Care Med* **31**, 1771–1779 (2003).
54. Food and Drug Administration. *21CFR522.1125 Hemoglobin glutamer-200 (bovine)* 63 *Federal Register* 11598, March 10. (1998).
55. Driessen, B., Jahr, J. S., Lurie, F., Griffey, S. M. & Gunther, R. A. Effects of haemoglobin-based oxygen carrier hemoglobin glutamer-200 (bovine) on intestinal perfusion and oxygenation in a canine hypovolaemia model. *Br J Anaesth* **86**, 683–692 (2001).
56. Gottschalk, A. *et al.* Effects of isovolaemic haemodilution on oxygenation of liver and skeletal muscle. *Eur J Anaesthesiol* **22**, 181–188 (2005).
57. Freitag, M. *et al.* Enhanced central organ oxygenation after application of bovine cell-free hemoglobin HBOC-201. *Can J Anaesth* **52**, 904–914 (2005).
58. van Iterson, M., Siegemund, M., Burhop, K. & Ince, C. Hemoglobin-based oxygen carrier provides heterogeneous microvascular oxygenation in heart and gut after hemorrhage in pigs. *J Trauma* **55**, 1111–1124 (2003).
59. Burmeister, M. A. *et al.* Effects of prophylactic or therapeutic application of bovine haemoglobin HBOC-200 on ischaemia-reperfusion injury following acute coronary ligation in rats. *Br J Anaesth* **95**, 737–745 (2005).
60. Rempf, C. *et al.* Administration of bovine polymerized haemoglobin before and during coronary occlusion reduces infarct size in rabbits. *Br J Anaesth* **103**, 496–504 (2009).

61. Standl, T. *et al.* Hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 provides higher and faster increase in oxygen tension in skeletal muscle of anemic dogs than do stored red blood cells. *J Vasc Surg* **37**, 859–865 (2003).
62. Cywes, R. *et al.* Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology* **18**, 635–647 (1993).
63. Miller, L. L., Bly, C. G., Watson, M. L. & Bale, W. F. The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. *J Exp Med* **94**, 431–453 (1951).
64. Willis, D., Moore, A. R., Frederick, R. & Willoughby, D. A. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat. Med.* **2**, 87–90 (1996).
65. Camargo, C. A., Madden, J. F., Gao, W., Selvan, R. S. & Clavien, P. A. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* **26**, 1513–1520 (1997).
66. Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**, 493–501 (1992).
67. Kato, Y. *et al.* Bilirubin rinse: A simple protectant against the rat liver graft injury mimicking heme oxygenase-1 preconditioning. *Hepatology* **38**, 364–373 (2003).
68. Katori, M., Busuttil, R. W. & Kupiec-Weglinski, J. W. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* **74**, 905–912 (2002).

69. Sacerdoti, D. *et al.* Role of the heme oxygenases in abnormalities of the mesenteric circulation in cirrhotic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **308**, 636–643 (2004).
70. Suematsu, M. *et al.* Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* **96**, 2431–2437 (1995).
71. Pannen, B. H. *et al.* Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* **102**, 1220–1228 (1998).
72. Kubulus, D. *et al.* Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2332–40 (2004).
73. Rücker, M. *et al.* Local heat-shock priming-induced improvement in microvascular perfusion in osteomyocutaneous flaps is mediated by heat-shock protein 32. *Br J Surg* **88**, 450–457 (2001).
74. Koo, A. *et al.* Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* **15**, 507–514 (1992).
75. Cabrales, P., Tsai, A. G. & Intaglietta, M. Increased tissue PO₂ and decreased O₂ delivery and consumption after 80% exchange transfusion with polymerized hemoglobin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**, H2825–33 (2004).
76. Clemens, M. G., Bauer, M., Pannen, B. H., Bauer, I. & Zhang, J. X. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* **8**, 80–85 (1997).

77. Federspiel, W. J. & Popel, A. S. A theoretical analysis of the effect of the particulate nature of blood on oxygen release in capillaries. *Microvasc Res* **32**, 164–189 (1986).
78. Horn, E. P. *et al.* Bovine hemoglobin increases skeletal muscle oxygenation during 95% artificial arterial stenosis. *Surgery* **121**, 411–418 (1997).
79. Uchida, K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* **28**, 1685–1696 (2000).
80. del Rio, D., Stewart, A. J. & Pellegrini, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **15**, 316–328 (2005).
81. Pryor, W. A. & Stanley, J. P. Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* **40**, 3615–3617 (1975).
82. Farmer, E. E. & Davoine, C. Reactive electrophile species. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 380–386 (2007).
83. Moore, K. & Roberts, L. J. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* **28**, 659–671 (1998).
84. Hughes, G. S. *et al.* Physiology and pharmacokinetics of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in humans. *Crit Care Med* **24**, 756–764 (1996).
85. Kirkby, K. A. & Adin, C. A. Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F563–71 (2006).

86. Soares, M. P. & Bach, F. H. Heme oxygenase-1 in organ transplantation. *Front Biosci* **12**, 4932–4945 (2007).
87. Maines, M. D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 517–554 (1997).
88. Tenhunen, R., Marver, H. S. & Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **61**, 748–755 (1968).
89. Choi, A. M. & Alam, J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 9–19 (1996).
90. Tomaro, M. L., Frydman, J. & Frydman, R. B. Heme oxygenase induction by CoCl₂, Co-protoporphyrin IX, phenylhydrazine, and diamide: evidence for oxidative stress involvement. *Arch Biochem Biophys* **286**, 610–617 (1991).
91. Kato, H. *et al.* Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant* **1**, 121–128 (2001).
92. Caswell, J. E. *et al.* A novel hemoglobin-based blood substitute protects against myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H1796–801 (2005).
93. Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. & Ames, B. N. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**, 1043–1046 (1987).

94. Neuzil, J. & Stocker, R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* **269**, 16712–16719 (1994).
95. Nakagami, T., Toyomura, K., Kinoshita, T. & Morisawa, S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim Biophys Acta* **1158**, 189–193 (1993).
96. Carraway, M. S., Ghio, A. J., Taylor, J. L. & Piantadosi, C. A. Induction of ferritin and heme oxygenase-1 by endotoxin in the lung. *Am J Physiol* **275**, L583–92 (1998).
97. Schmidt, R. *et al.* Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Ann Surg* **245**, 931–942 (2007).
98. Fondevila, C. *et al.* Biliverdin protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* **35**, 1798–1799 (2003).
99. Bauer, M. Heme oxygenase in liver transplantation: heme catabolism and metabolites in the search of function. *Hepatology* **38**, 286–288 (2003).

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 schematische Darstellung I/R-Schadens während der kalten Ischämie in sinusoidalen Endothelzellen (links) und während der Reperfusionsphase (rechts)	12
Abbildung 2 schematische Darstellung der in-vitro Reperfusion der isoliert perfundierten Rattenleber modifiziert nach Miller et al. ⁶³	20
Abbildung 3 in-vitro Reperfusion der isolierten Rattenleber, modifiziert nach Miller et al. ⁶³	21
Abbildung 4 Detaildarstellung der in-vitro reperfundierten Rattenleber	22
Abbildung 5 schematische Darstellung des Versuchsablaufs	24
Abbildung 6 Hämoglobin-Konzentration im Perfusat während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL	38
Abbildung 7 Hämatokrit im Perfusat während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL	39
Abbildung 8 Sauerstoffpartialdruck (pO ₂) im Perfusat während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL.	40
Abbildung 9 Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO ₂) im Perfusat während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL.	41

Abbildung 10 portalvenöse Flussrate während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL.	43
Abbildung 11 Tabellarische Darstellung der AST und ALT-Werte zu Beginn (0min) und 180min nach Reperfusion der IPRL.	45
Abbildung 12 Effekt von HbG200 auf die ALT Konzentration während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL.	46
Abbildung 13 Effekt von HbG200 auf die AST Konzentration während der 180 minütigen Reperfusion der IPRL.	47
Abbildung 14 Quantifizierung des Parenchymschadens der Rattenlebern unter Anwendung des durch CAMARGO et al. erarbeiteten Punktescore ⁶⁵ .	49
Abbildung 15 Repräsentative Darstellung des hepatischen I/R-Schadens an Hämatoxylin und Eosin-gefärbten Lebersektionen nach 180 minütiger Reperfusion der IPRL.	50
Abbildung 16 Tabellarische Darstellung der Galleproduktion und Bilirubin-konzentration 180min nach Reperfusion der IPRL.	52
Abbildung 17 Effekt von HbG200 auf die Lipidperoxydation nach 180 minütiger Reperfusion der IPRL.	54
Abbildung 18 Effekt von HbG200 auf die Zellapoptose nach 180 minütiger Reperfusion der IPRL.	56
Abbildung 19 Hepatische Expression der HO-1 bemessen durch Western Blot Analyse nach 180 minütiger Reperfusion der IPRL.	58

7.2 Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
ALE	advanced lipoxidation end products
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calcium
CAT	Catalase
CD	cluster of differentiation
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat (cyclic guanosine-monophosphate)
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER _{O2}	Extraktionsrate von Sauerstoff
ET-1	Endothelin-1
Fe ²⁺	Eisen

GTP	Guanosin-Triphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAES	Hydroxyäthylstärke
HbG200	Hämoglobin Glutamer 200
HBOC	hemoglobin-based oxygen carrier
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HO-1	Hämoxygenase-1
HO-2	Hämoxygenase-2
HSP	heat-shock protein
HSP32	Hitzeschockprotein 32
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IPF	initial poor function
IPRL	isoliert perfundierte Rattenleber
KH ₂ PO ₄	Kalium-Natrium-Phosphat
MDA	Malondialdehyd
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NHBD	non-heart-beating donors
NO	Stickstoffmonoxid

O ₂	Sauerstoff
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule, syn.:cluster of differentiation 31 (CD31)
PNF	primary non-function
SD	Standardabweichung (standard derivative)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SEC	sinusoidale Endothelzellen
sGC	lösliche Guanylat-Cyclase (soluble guanylate-cyclase)
SnPP	Zinn-Protoporphyrin-IX
SOD	Superoxiddismutase
TBA	Thiobabitursäure (thiobabaturacid)
TCA	Trichloressigsäure
TdT	terminale Desoxynukleotidyltransferase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
tP _{O₂}	Oberflächenspannung von Sauerstoff
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UW-Lösung	University-Of-Wisconsin-Lösung
vWF	von Willebrand Faktor

7.3 Reaktionslösungen zur Gelelektrophorese

Gelelektrophorese

Trenngel

Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gel 12% ig,	10ml
H ₂ O	3,3ml
Acrylamid-Mix 30 %ig	4.0ml
1.5M Tris Puffer (pH 8.8)	2.5ml
SDS 10%ig	0.1ml
Ammoniumpersulfat 10%ig	0.1ml
TEMED	0.004ml

Sammelgel

Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gel 5% ig,	3ml
H ₂ O	2,1ml
Acrylamid-Mix 30%ig	0.5ml
1.0M Tris Puffer (pH 6.8)	0.38ml
SDS 10%ig	0.03ml
Ammoniumpersulfat 10%ig	0.03ml
TEMED	0.003ml

Lämml-Puffer

1.0M Tris Puffer (pH 6.8)	3.2ml
Bromphenolblau	5mg
SDS 10%ig	1.5g
Glycerin	3.5ml
Mercaptoethanol	2.5ml

PAGE Laufpuffer 10x konzentriert

ad Aqua dest.	1000ml
SDS (Natriumdodecylsulfat)	10g
Tris	30g
Glycin	144g

Lösungsansätze

Anode Lösung R

pH 10.4

Tris	36.3g	18.15g
Methanol	200ml	100ml
	Ad 1000ml	ad 500ml

Anode Lösung S

pH 10.4

Tris	3.03g	1,515g
Methanol	200ml	100ml
	ad 1000ml	ad 500ml

Kathode Lösung T

pH 7.6

6-Amino-n-Hexansäure	5.20g	2.6g
Methanol	200ml	100ml
	ad 1000ml	ad 500ml

Blocking Reagenz

PBS-Lösung	200ml
Polysorbat-20	0.5ml
Milchpulver	15-20g

Waschpuffer

PBS-Lösung	400ml
Polysorbat-20	1ml

Destain-Lösung

Methanol	100ml
Essigsäure	100ml
Aqua dest.	800ml

Ponceau-Rot Proteinfärbung

Ponceau S Pulver	0.5g
Eisessig	1ml

ad 100 ml Aqua dest, anschließende Filtration.

7.5 Kopie des Übungsscheins Tierversuchskurs



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

Universitätsklinikum Düsseldorf
Tierversuchsanlage

Zentrale Einrichtung
Geschäftsf. Direktorin: Dr. Annemarie Treiber

Übungsschein

Arne Macher

Allg.- und Viszeralchirurgie
geb. am: 23.08.1979
in: Neuss

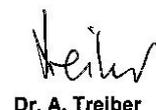
hat an der versuchstierkundlichen Einführung für wissenschaftliche und technische Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises gem. § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes mit Erfolg teilgenommen.

Den Teilnehmern werden theoretische Kenntnisse und praktische Fähigkeiten auf dem Gebiet der Versuchstierkunde vermittelt.

Allg. Kurseinführung; Entwicklung des Tierschutzgedankens; Tierschutzgesetz, Verordnungen, (Alters-, Geschlechtsbestimmung)	3 Std.
Einführung in die Versuchstierkunde (Markierung von Versuchstieren)	3 Std.
Gesundheitsüberwachung von Versuchstierhaltungen (Probenentnahme; Gefahrstoffe, Abwasser)	3 Std.
Narkose (am Beispiel kleiner Nagel); sachgerechter Umgang mit Narkotika	3 Std.
Belastung im Tierversuch; Schmerztherapie	3 Std.
Statistische Grundbegriffe und Verfahren	3 Std.
Vergleichende Anatomie und Physiologie ausgewählter Versuchstiere (Skelett und Gelenke, Verdauungssystem, Medikamente)	4,5 Std.
Führung durch die Tierversuchsanlage	1,5 Std.
Ersatz- und Ergänzungsmethoden	3 Std.
Antragsverfahren, Meldeverordnung	3 Std.
Tierspezifische Übungen:	
Umgang mit kleinen Nagern (Maus, Ratte) (Zucht und Genetik, Haltung, Fütterung, Verhalten, Handling, Gesundheitszustand; Vaginalabstrich, Applikation und Probenentnahme; Euthanasie)	6 Std.
Transgene Tiere	3 Std.
Immunisierung; Umgang mit Kaninchen, Meerschweinchen, Hühnern (Verhalten, Handling, Haltung, Fütterung, Gesundheitszustand; Applikation und Probenentnahme; Narkose und Euthanasie)	3 Std.
Umgang mit Hund, Katze, Schwein (theor.) (Verhalten, Handling, Haltung, Fütterung, Gesundheitskontrolle; Applikation und Probenentnahme; Narkose und Euthanasie)	6 Std.

Bei allen fettgedruckten Teilen und 3 Modulen tierspezifische Übungen ist die Teilnahme obligatorisch

Düsseldorf, den 07.09.2007



Dr. A. Treiber

8. Danksagungen

Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie in der Arbeitsgruppe „Mechanismen und Therapie des kalten Konservierungs- und Reperfusionsschadens der Leber“ zu erstellen.

Der meiste Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Stefan A. Topp, der mit seiner Betreuung und seinem Engagement den größten Anteil am Zustandekommen dieser Dissertation hat. Ohne seine intensive und stets zielgerichtete Anleitung sowie seine unermüdliche Geduld wäre die Fertigstellung meiner Arbeit nicht vorstellbar gewesen.

Für die Durchführung der TUNEL-Assays, aber vor allem für die hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die angenehme Atmosphäre und die daraus erwachsene Freundschaft danke ich Herrn PD Dr. med. Andreas Krieg. Seine wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer geschätzt.

Prof. Dr. med. Nikolas H. Stoecklein und insbesondere Imke Hoffmann sowie dem gesamten Team des chirurgischen Forschungslabors danke ich sehr für die Durchführung der Western-Blot Analysen und der fortwährenden Unterstützung.

Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld und vor allem Kirsten Bartkowski danke ich für die spektrofluorimetrischen Messungen. Außerdem möchte ich Prof. Dr. med. Uwe Ramp und Prof Dr. med. Stephan Ernst Baldus für die histologischen Untersuchungen der Rattenlebern danken.

Daneben möchte ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Mechanismen und Therapie des kalten Konservierungs- und Reperfusionsschadens der Leber“ für die stets kollegiale Atmosphäre danken. Ganz herzlich danke ich Dr. med. Christian Vay und Dr. med. Luisa Zacarias Föhrding für ihre Ratschläge und Diskussionen.

Meinen Eltern Bernhardine und Wolfgang Macher danke ich herzlich für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse an meiner Arbeit.

Meiner Frau Julia Anna Macher danke ich von ganzem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung, ihre Liebe und Motivation.

9. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name Arne Macher
Geburtsort Neuss
Geburtsdatum 23. August 1979
Familienstand verheiratet
Nationalität deutsch

Konfession katholisch

Schulbildung

1986 bis 1990 Tannenbusch-Grundschule in Dormagen-Delhoven
1990 bis Mai 1999 Norbert-Gymnasium Knechtsteden
19. Mai 1999 Abitur am Norbert-Gymnasium Knechtsteden

Zivildienst

August 1999 bis August 2000 Pflegedienst in der Klinik für Kinder-Onkologie, Hämatologie und Klinische Immunologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

Studium

Oktober 2001 bis Dezember 2006 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
15. Dezember 2006 Approbation als Arzt

Februar 2007 bis September 2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Seit Oktober 2011 Assistenzarzt der Chirurgischen Klinik Krankenhaus Holweide, Kliniken der Stadt Köln gGmbH

14. März 2013

Erlangung der Bezeichnung Arzt für Viszeralchirurgie

Publikationen

1. S. A. Topp, A. Krieg, A. Koch, C. M. Tidden, U. Ramp, T. Hohlfeld, **A. Macher**, J. Schulte am Esch, C. F. Eisenberger, N. H. Stoecklein, W. T. Knoefel. **Hemoglobin-glutamer 200 reduces reperfusion injury of the cold preserved rat liver by induction of heme oxygenase-1.** J Surg Res 2008 Dec.;150(2):243–254.
2. S. A. Topp, **A. Macher**, N. H. Stoecklein, W. T. Knoefel (Dept. of General, Visceral and Pediatric Surgery, University Hospital Düsseldorf, Düsseldorf, Germany) et al., **Hemoglobin-Glutamer 200 (Oxyglobin®) Preconditioning of the liver reduces cold ischemia/reperfusion injury** Hepatology Supplement: The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2009, Volume 50 (2009), Issue S4 Pages IIA–IVA, 1A–1246A
3. M. G. Donner, S. A. Topp, A. Krienen, P. Cebula, **A. Macher**, T. Gehrmann, B. H. Pannen, W. T. Knoefel, D. Häussinger. **Pericentral Downregulation of BSEP and MRP2 Following Experimental Ischemia and Reperfusion is restored by Hbg200-Mediated preinduction of Heme Oxygenase-1.** J Hepatol 2011;54 IS - :S23–S24.
4. L. Zacarias Föhrding, **A. Macher**, S. Braunstein, W. T. Knoefel, S. A. Topp. **Small intestine bleeding due to multifocal angiosarcoma.** World J Gastroenterol. 2012 Nov 28;18(44):6494-500
5. **A. Macher**, C. Limmroth, D. Wasmuth, G. Kunstmann, A. Linderer, M. Brockmann, C. F. Eisenberger **Management of advanced colorectal carcinoma in a young female.** 3rd ITLT Essen 2013, Interdisciplinary Treatment of Liver Tumors, Poster Exhibition, Essen, Germany, 18. – 20. April 2013

Buchbeiträge

1. **A. Macher**, S. A. Topp, W. T. Knoefel (Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), **Umfrage: Instrumente zur Leberresektion**, in „Chirurgische Praxis“, Band 69 (2008) Hans Marseille Verlag GmbH München
2. **A. Macher**, C. F. Eisenberger, W. T. Knoefel (Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Kinderchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) **Erweiterte Resektion und Funktionserhalt in der Chirurgie des**

nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms in „Klinische Onkologie 2011/2012, Bd. 1: Lymphome, Leukämien, Bronchial-CA“ von Stephan Roth, Rainer Haas, Nobert Gattermann, Ulrich Germing, Roland Fenk und Guido Kobbe (Hrsg.), Düsseldorf 2011, ISBN 978-3-940671-72-1

Kongressbeiträge

1. S. A. Topp, **A. Macher**, W. T. Knoefel (Dept. of General, Visceral and Pediatric Surgery, University Hospital Düsseldorf, Düsseldorf, Germany) et al., **Hemoglobin-Glutamer 200 (Oxyglobin®) Preconditioning Of The Liver Reduces Cold Ischemia/Reperfusion Injury**, Poster Session II, Sunday, November 1st 2008, The 60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases: The Liver Meeting 2009, Boston, MA, USA
2. **A. Macher**, S. A. Topp, S. Braunstein, M. A. Renter, C. F. Eisenberger, W. T. Knoefel / Düsseldorf, **Das Angiosarkom des Dünndarms - Case Report einer sehr seltenen Tumorentität**, Posterbegehung II Onkologische Chirurgie, 127. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 21. April 2010
3. **A. Macher**, A. Raffel, M. Krausch, F. Miese, K. Cupisti, C. F. Eisenberger, W. T. Knoefel / Düsseldorf, **Auftreten einer angio-bronchialen Fistel nach Port-a-cath Implantation – Kasuistik einer seltenen Komplikation**, DGT Posterbegehung, 128. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 04. Mai 2011
4. **A. Macher**, C. F. Eisenberger, A. Raffel, M. Krausch, A. Krieg, P. Reinecke, W. T. Knoefel / Düsseldorf, **Adenomyom der Gallengangsampulle - Kasuistik einer seltenen Tumorentität**, DGAV Posterbegehung Leber, Galle, Pankreas I, 128. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, 05. Mai 2011
5. **A. Macher**, D. Wasmuth, G. Kunstmann, A. Linderer, C. Limmroth, M. Brockmann, C. F. Eisenberger. **Management des fortgeschrittenen Rektumkarzinoms einer jungen Patientin**. Postersession I – Der interessante Fall, 179. Jahrestagung der Vereinigung der Niederrheinisch-Westfälischen Chirurgen, 28. November 2012, Gewinner des Poster-Preises
6. **A. Macher**, C. Limmroth, D. Wasmuth, G. Kunstmann, A. Linderer, M. Brockmann, C. F. Eisenberger **Management of advanced colorectal carcinoma in a young female**. 3rd ITLT Essen 2013, Interdisciplinary Treatment of Liver Tumors, Poster Exhibition, Essen, Germany, 18. – 20. April 2013

Düsseldorf, 27. September 2014

Arne Macher

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 27. September 2014

Arne Macher