

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Untersuchungen zu einem präkonditionierenden Effekt von Helium
bei einem Reperfusionsschaden nach partieller Ischämie der Leber**

Dissertation

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

vorgelegt von
Gabriel Andreas Plitzko

2014

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

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

Dekan

Erstgutachterin: Priv.-Doz. Dr. Bauer

Zweitgutachter: apl. Prof. Dr. Raffel

Meinen Eltern Sylvia und Winfried

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Braun S, Pitzko G, Bicknell L, Van Caster P, Schulz J, Barthuber C, Preckel B, Pannen BH, Bauer I (2013)

'Pretreatment with helium does not attenuate liver injury after warm ischemia reperfusion', *Shock*, 2014. 44 (5): p. 413-419.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	FiO₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
Aqua dest.	destilliertes Wasser	GSK-β	Glycogen Synthase Kinase 3β
ALT	Alanin-Aminotransferase	HMBG1	<i>High-mobility group protein B1</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase	HO-1	Hämoxygenase-1
ADP	Adenosindiphosphat	HO-2	Hämoxygenase-2
ATP	Adenosintriphosphat	HO-3	Hämoxygenase-3
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	HSP	Hitzeschockprotein
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>	HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
BGA	Blutgasanalyse	IC	<i>Intermittent clamping</i>
BSA	bovines Serumalbumin	IL-1	Interleukin-1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	IL-6	Interleukin-6
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	IL-12	Interleukin-12
CO	Kohlenstoffmonoxid	ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase
DMAPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>	IPC	ischämische Präkonditionierung (<i>Ischemic preconditioning</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid	IPF	initiale Mangelfunktion (<i>Initial poor function</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)	IPost	ischämische Postkonditionierung
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase		
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>		
FA	Formaldehyd-Agarose		

	<i>(Ischemic postconditioning)</i>	PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
IR	Ischämie-Reperfusion	PKC	Proteinkinase C
IR-Schaden	Ischämie-Reperfusionsschaden	PNF	primäre Nichtfunktion <i>(Primary non-function)</i>
KG	Körpergewicht	PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase	PTK	Protein Tyrosin Kinase
MAC-1	<i>Macrophage 1 antigen</i>	REST	<i>Relative expression software tool</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein-Kinase</i>	RIPC	ischämische Fernpräkonditionierung <i>(Remote ischemic preconditioning)</i>
MDA	Malondialdehyd	RNA	Ribonukleinsäure <i>(Ribonucleic acid)</i>
MDH	Malat-Dehydrogenase	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
MPO	Myeloperoxidase	rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
mPTP	<i>Mitochondrial permeability transition pore</i>	SD	Standardabweichung <i>(Standard deviation)</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>	sGC	lösliche Guanylatzyklase <i>(Soluble guanylyl cyclase)</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>	TBA	Thiobarbitursäure
NADPH	Reduzierte Form von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	TLR-4	<i>Toll-like receptor-4</i>
NO	Stickstoffmonoxid	TLR-9	<i>Toll-like receptor-9</i>
p53	Protein 53	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
PALP	Pyridoxalphosphat	TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
pCO₂	Partialdruck des Kohlenstoffdioxids		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck <i>(Positive end-expiratory pressure)</i>		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hepatischer Ischämie-Reperfusionsschaden	1
1.1.1	Pathogenese und molekulare Mechanismen	1
1.1.2	Protektiver Effekt der HO-1	3
1.1.3	Klinische Relevanz	6
1.2	Protektive Strategien gegen einen Ischämie-Reperfusionsschaden	9
1.2.1	Chirurgische Strategien	9
1.2.2	Pharmakologische Strategien	12
1.3	Fragestellung	15
2	Material und Methoden	18
2.1	Versuchstiere	18
2.2	Pharmaka	18
2.3	Geräte	19
2.4	Software	22
2.5	Reagentien	22
2.5.1	Real Time Quantitative PCR	22
2.5.2	ELISA	23
2.5.3	Protein-Isolation und Quantifizierung	23
2.5.4	MPO-Assay	24
2.6	Pufferlösungen	24
2.6.1	Real Time Quantitative PCR	24
2.6.2	ELISA	25
2.6.3	Protein-Isolation und Quantifizierung	25
2.7	ELISA Sets	26
2.8	Versuchsgruppen	26
2.9	Versuchsablauf	27
2.9.1	Einleitung der Anästhesie	28
2.9.2	Anlage der Gefäßzugänge	28
2.9.3	Aufrechterhaltung der Anästhesie und Relaxierung	29
2.9.4	Invasive Blutdruckmessung	30
2.9.5	Arterielle Blutgasanalyse	30
2.9.6	Temperaturmessung	31

2.9.7	Präparation der Leberpforte und Ischämie-Induktion	31
2.9.8	Entnahme des Probenmaterials	33
2.10	Bestimmung der Serumaktivität von AST und ALT	33
2.10.1	Aufbereitung der Proben.....	34
2.10.2	Messmethode	34
2.11	Real Time Quantitative PCR	36
2.11.1	RNA-Isolierung	36
2.11.2	Kontrolle der RNA-Reinheit und -Integrität	37
2.11.3	Reverse Transkription der RNA in cDNA.....	37
2.11.4	Amplifikation der cDNA.....	38
2.11.5	Auswertung.....	38
2.12	ELISA zur quantitativen Bestimmung von Zytokinen	39
2.13	Protein-Isolierung und Quantifizierung.....	41
2.14	MDA-Assay	42
2.15	MPO-Assay	43
2.16	Statistische Auswertung	44
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Serumaktivität von AST und ALT	46
3.2	Genexpression der HO-1	47
3.3	Serumkonzentration und Genexpression von Interleukin-10	48
3.4	Serumkonzentration und Genexpression von Tumornekrosefaktor- α	49
3.5	MDA-Konzentration im Leberparenchym	50
3.6	MPO-Konzentration im Leberparenchym	51
3.7	Physiologische Daten.....	52
4	Diskussion.....	54
4.1	Methodik.....	55
4.2	Ergebnisse	60
4.3	Schlussfolgerungen.....	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis.....	68
7	Anhang.....	78
8	Danksagungen	79
9	Eidesstattliche Versicherung.....	80

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Inflammatorische Signalwege der frühen und späten Phase eines Ischämie-Reperfusionsschadens (angelehnt an Klune et al., 2010 [4]).	3
Abb. 2: Übersicht über die protektiven Effekte der HO-1-Metaboliten im Rahmen eines IR-Schadens.	4
Abb. 3: Regenerationszyklus des Bilirubins.	5
Abb. 4: Vasookkludierende Verfahren zur intraoperativen Blutungskontrolle bei Leberteilresektionen (angelehnt an Bahde et al., 2010 [1]).	7
Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs in den einzelnen Versuchsgruppen.	27
Abb. 6: Anatomische Struktur der Rattenleber (angelehnt an Martins et al., 2007 [142]).	32
Abb. 7: AST-katalysierte Reaktion mit PALP als Coenzym.	35
Abb. 8: Indikatorreaktion zur Messung der abnehmenden NADH-Konzentration.	35
Abb. 9: ALT-katalysierte Reaktion mit PALP als Coenzym.	35
Abb. 10: Indikatorreaktion zur Messung der abnehmenden NADH-Konzentration.	35
Abb. 11: Relative Quantifizierung der Real Time PCR-Ergebnisse nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.	39
Abb. 12: Reaktion von MDA mit zwei Molekülen TBA zu einem Farbkomplex.	43
Abb. 13: Serumaktivität der AST in den einzelnen Versuchsgruppen.	46
Abb. 14: Serumaktivität der ALT in den einzelnen Versuchsgruppen.	46
Abb. 15: Relative Genexpression der HO-1 in den einzelnen Versuchsgruppen.	47
Abb. 16: Serumkonzentration von IL-10 in den einzelnen Versuchsgruppen.	48
Abb. 17: Relative Genexpression von IL-10 in den einzelnen Versuchsgruppen.	48
Abb. 18: Serumkonzentration von TNF- α in den einzelnen Versuchsgruppen.	50
Abb. 19: Relative Genexpression von TNF- α in den einzelnen Versuchsgruppen.	50
Abb. 20: Konzentration von MDA im Leberparenchym in den einzelnen Versuchsgruppen.	51
Abb. 21: Konzentration der MPO im Leberparenchym in den einzelnen Versuchsgruppen.	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anteile der einzelnen Leberlappen am gesamten Lebervolumen [142]....	32
Tabelle 2: TaqMan® Expression Assays (Real Time Quantitative PCR).....	38
Tabelle 3: Standardverdünnungsreihe zur Proteinbestimmung nach Lowry.....	42
Tabelle 4: Serumaktivität von AST und ALT.....	46
Tabelle 5: Relative Genexpression der HO-1.....	48
Tabelle 6: Serumkonzentration und relative Genexpression von IL-10.....	49
Tabelle 7: Serumkonzentration und relative Genexpression von TNF- α	50
Tabelle 8: MDA Konzentration im Leberparenchym.....	51
Tabelle 9: MPO Konzentration im Leberparenchym.....	52
Tabelle 10: Körpertemperatur der Versuchstiere.	53
Tabelle 11: Messwerte der arteriellen BGA der Versuchstiere.....	53
Tabelle 12: Übersicht über verschiedene Modelle zur Induktion eines hepatischen IR-Schadens.....	56
Tabelle 13: Übersicht über verschiedene Modelle für eine IPC beim hepatischen IR-Schaden.....	59

1 Einleitung

1.1 Hepatischer Ischämie-Reperfusionsschaden

Ischämie beschreibt den Zustand einer unzureichenden Versorgung eines Gewebes mit Sauerstoff und Substraten bei gleichzeitig reduziertem Abtransport anfallender Metaboliten [1]. Das Phänomen, dass das Ausmaß eines Ischämie-bedingten Zellschadens nach Wiederherstellung der Sauerstoffzufuhr weiter zunimmt, wird als Ischämie-Reperfusionsschaden (IR-Schaden) bezeichnet [2].

In Abhängigkeit von der Temperatur, bei welcher die Leber einer Ischämie ausgesetzt ist, wird zwischen einem hypothermen, „kalten“ und einem normothermen, „warmen“ IR-Schaden unterschieden. Diese beiden Entitäten des hepatischen IR-Schadens weisen hinsichtlich der Pathologie und pathogenetischen Mechanismen einerseits zahlreiche Ähnlichkeiten, andererseits jedoch auch deutliche Unterschiede auf. Einer der Gründe hierfür ist die unterschiedliche Vulnerabilität der einzelnen Leberzelltypen gegenüber warmer und kalter Ischämie [2-4].

Eine warme Ischämie-Reperfusion (IR) der Leber induziert vor allem einen hepatozellulären Schaden und manifestiert sich in einer frühen (innerhalb der ersten 2 bis 4 Stunden nach Reperfusion) und einer späten Phase (6 bis 48 Stunden nach Reperfusion) [2-5].

1.1.1 Pathogenese und molekulare Mechanismen

Eine Ischämie von Organen führt durch Sauerstoffmangel in den Zellen zu einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, wodurch ein intrazellulärer ATP-Mangel induziert wird. Daraus resultiert eine Inhibierung der ATP-abhängigen Na^+/K^+ -ATPase, welche primär zur intrazellulären Akkumulation von Na^+ und sekundär zur Störung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase führt. In Folge entwickelt sich ein intrazelluläres Ödem mit Störung der Zellmembranintegrität bis hin zum Zelluntergang [6].

In der frühen Phase des IR-Schadens spielen die Kupffer-Zellen als ortsständige Makrophagen der Leber eine zentrale Rolle. Durch die ischämisch bedingten Nekrosen kommt es nach Einsetzen der Reperfusion zur Freisetzung sogenannter

Damage-associated molecular patterns (DAMPs). Unter dem Begriff DAMPs wird eine Gruppe von Molekülen zusammengefasst, welche eine Immunantwort initiieren und fortführen können. Dazu zählen unter anderem HMGB1, HSPs, sowie DNA- und RNA-Fragmente. Über eine Bindung an verschiedene *Toll-like* Rezeptoren (unter anderem TLR-4 und TLR-9), die zur Gruppe der *Pattern recognition receptors* (PRRs) gehören, aktivieren sie die Kupffer-Zellen [7]. Die Aktivierung der Kupffer-Zellen steigert die Synthese und Ausschüttung von ROS, wodurch oxidativer Stress entsteht. Durch Lipidperoxidation, DNA-Oxidation und Enzymdenaturierung entstehen direkte Zellschäden bis hin zur Nekrose. Darüber hinaus führt die Freisetzung von ROS zur Aktivierung von Caspasen und damit zur Initiierung und Progression der Apoptose [4]. Neben der Ausschüttung von ROS bedingt die Aktivierung der Kupffer-Zellen eine vermehrte Sekretion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere TNF- α , IL-1 und IL-6 [2, 4, 8]. Zusätzlich verstärkt die Expression von IL-12 durch Hepatozyten die inflammatorische Antwort [9]. Als Resultat der Zytokin- und Chemokinausschüttung exprimieren zum einen endotheliale Zellen und Lymphozyten verstärkt Adhäsionsmoleküle, zum anderen erfolgt eine Rekrutierung und Invasion neutrophiler Granulozyten entlang des Chemokingradienten in das Lebergewebe (siehe Abb. 1) [2, 4, 9]. Dadurch wird die späte Phase des IR-Schadens eingeleitet. Diese späte Phase ist charakterisiert durch die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten [4]. Die erhöhte Expression von L- und P-Selectin sowie ICAM-1 und MAC-1 auf endothelialen Zellen beziehungsweise neutrophilen Granulozyten, erleichtert deren Adhäsion und Transmigration. Es resultiert eine verstärkte Extravasation neutrophiler Granulozyten in das hepatische Interstitium [2, 9]. Durch Exozytose ihrer intrazellulären Granula werden Proteasen, ROS und weitere Enzyme, wie beispielsweise Myeloperoxidase oder NADPH-Oxidase, freigesetzt. Diese führen zu einer sukzessiven Zersetzung von Zellmembranen und extrazellulärer Matrix (siehe Abb. 1) [4, 9].

Zusätzlich zu den genannten Mechanismen trägt eine Störung der hepatischen Mikrozirkulation zur Entstehung des IR-Schadens bei [10]. Neben der Obstruktion des sinusoidalen Lumens durch das Ischämie-bedingte Zellödem und die intraluminale Akkumulation von Thrombozyten, spielen vasoaktive Substanzen eine große Rolle [6, 9, 10]. Den größten Einfluss auf die Vasoregulation haben das vasodilatierende Stickstoffmonoxid (NO) und der Vasokonstriktor Endothelin [11].

Beide Substanzen werden von den endothelialen Zellen synthetisiert [4, 6]. In der frühen Phase der Reperfusion steigen die Endothelin-Konzentrationen im Plasma und dem Leberparenchym an, während ein adäquater Anstieg des Stickstoffmonoxids ausbleibt [10]. Aus dem gestörten Gleichgewicht resultiert eine Vasokonstriktion, die den Blutfluss in der Reperusionsphase kompromittiert und den IR-Schaden durch eine zumindest partiell fortbestehende Ischämie aggraviert [6, 11].

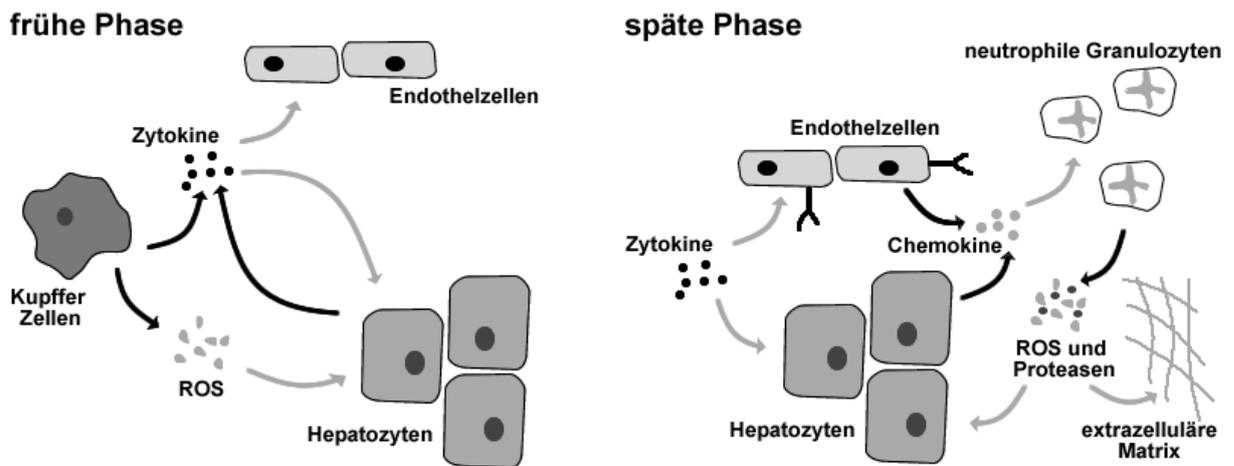


Abb. 1: Inflammatorische Signalwege der frühen und späten Phase eines Ischämie-Reperfusionsschadens (angelehnt an Klune et al., 2010 [4]).

1.1.2 Protektiver Effekt der HO-1

Im Rahmen eines IR-Schadens der Leber treten durch die in Kapitel 1.1.1 geschilderten Mechanismen Schäden an Hepatozyten und nicht-parenchymalen Zellen auf. Daneben werden jedoch auch zytoprotektive Mechanismen aktiviert. In diesem Zusammenhang spielt das Hämoxigenasesystem eine herausragende Rolle [4].

Das mikrosomale Enzym Hämoxigenase (HO), von dem bisher die drei Isoformen HO-1, HO-2 und HO-3 identifiziert wurden, katalysiert die Degradierung von Häm zu Biliverdin, freiem Eisen (Fe^{2+}) und Kohlenmonoxid (CO). Die Isoenzyme HO-2 und HO-3 werden konstitutiv exprimiert, während die HO-1 induzierbar ist [12]. Eine verstärkte Expression der HO-1 tritt im Rahmen verschiedenster mit oxidativem Stress einhergehenden Pathologien auf [13]. Zu diesen zählen u. a. die schwere Sepsis, IR-Ereignisse (z. B. im Rahmen eines Schockgeschehens, bei Leberteileresektionen oder Lebertransplantationen), Arzneimittelintoxikationen und akute Organabstoßungsreaktionen [14-17].

Der HO-1-vermittelte zytoprotektive Effekt ist vielschichtig und beruht auf unterschiedlichen Mechanismen. Ein Hauptmechanismus ist der enzymatische Abbau von freiem Häm [18]. Physiologischerweise kommt Häm weitestgehend gebunden, in Form von Hämproteinen wie Hämoglobin, Myoglobin oder Cytochromen vor und besitzt keine nennenswerten zytotoxischen Effekte [19]. Durch den von Kupfer-Zellen vermittelten oxidativen Stress zu Beginn der Reperfusionphase werden diese Bindungen durch Oxidation jedoch gelöst [18]. Es entsteht freies Häm, das mit seinem zentralen Eisen-Ion die Fenton-Reaktion katalysiert und so die Synthese von ROS fördern kann [12, 15, 18, 19]. Der größte Teil des Häms befindet sich in gebundener Form in den Erythrozyten. Durch ihre hohe Sensibilität gegenüber oxidativem Stress und die konsekutiv auftretende Hämolyse sind sie daher maßgeblich an der Freisetzung von Häm beteiligt [12, 19, 20].

Neben der oben beschriebenen Elimination des toxischen Häms entfaltet die HO-1 ihre Wirkung zusätzlich über die entstehenden Häm-Stoffwechselprodukte. Diese initiieren weitere zytoprotektive Prozesse (siehe Abb. 2) [15, 18, 21].

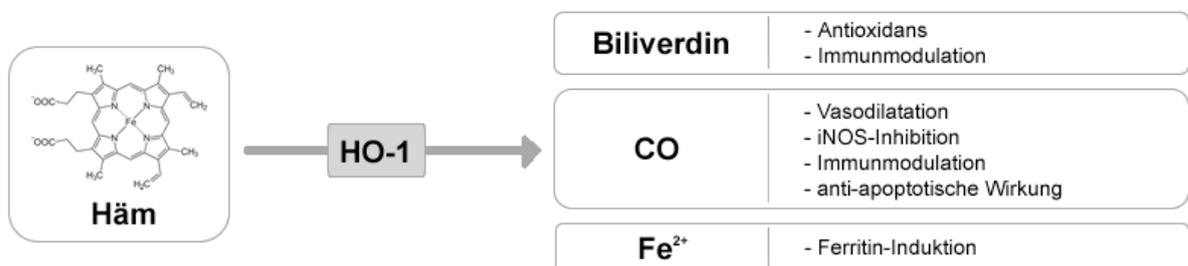


Abb. 2: Übersicht über die protektiven Effekte der HO-1-Metaboliten im Rahmen eines IR-Schadens.

Biliverdin wird unmittelbar nach seiner Entstehung durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert [18, 20]. In mikromolaren Plasmakonzentrationen wirkt Bilirubin als starkes endogenes Antioxidans [18-20, 22]. Das von ROS zu Biliverdin oxidierte Bilirubin wird durch die NADPH-abhängige Biliverdin-Reduktase erneut zu Bilirubin reduziert, welches damit wieder als Antioxidans zur Verfügung steht (siehe Abb. 3).

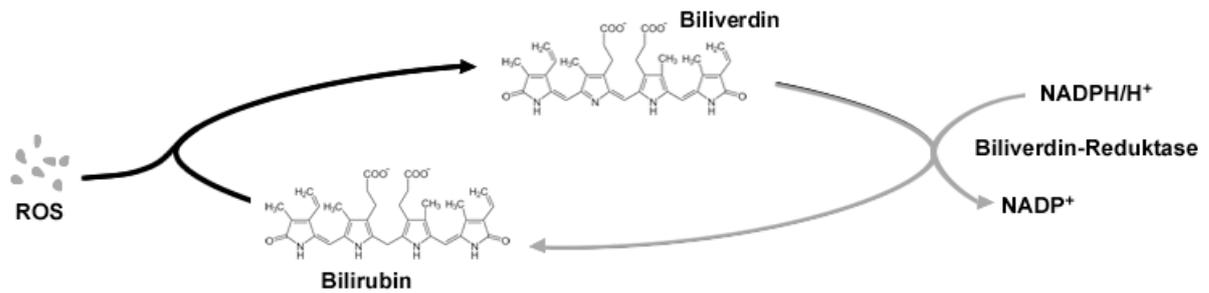


Abb. 3: Regenerationszyklus des Bilirubins.

Dieser Regenerationszyklus amplifiziert den Effekt des Bilirubins und ist für seine außergewöhnliche Kapazität und Effektivität als Antioxidans verantwortlich [18, 22]. Darüber hinaus ist Bilirubin in der Lage, durch veränderte Adhäsionsmolekülexpression und eine Inhibierung des Komplementsystems die Immunantwort zu modulieren [23, 24].

Ein zunächst paradox erscheinender Aspekt der HO-1 ist, dass sie als antioxidatives Enzym zur Produktion von Oxidantien, in diesem Fall Fe^{2+} , beiträgt. Ähnlich wie freies Häm, ist auch Fe^{2+} ein Katalysator der Fenton-Reaktion, durch welche wiederum ROS generiert werden [15, 18-20]. Im Gegensatz zu freiem Häm kann die oxidative Wirkung von Fe^{2+} jedoch durch Bindung an Ferroproteine neutralisiert werden [18, 19]. Eine herausragende Rolle unter den Ferroproteinen kommt dem Ferritin zu, das in Folge einer HO-1-Induktion sowie eines Fe^{2+} -Anstiegs verstärkt synthetisiert wird und mit seinen antioxidativen Eigenschaften die zelluläre Resistenz gegenüber oxidativem Stress erhöht [18, 22, 25, 26].

Das dritte Stoffwechselprodukt der HO-1 ist CO. CO vermittelt mehrere protektive Effekte. Über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) erfolgt ein Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration. Durch die daraus folgende Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur kommt es zur Vasodilatation, die der im Rahmen eines IR-Schadens auftretenden Mikrozirkulationsstörung entgegenwirkt. Die ebenfalls von cGMP vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation wirkt sich zusätzlich günstig auf die mikrozirkulatorische Situation aus [18, 19, 22, 27]. Ein weiterer Aspekt ist der Eingriff von CO in den Stoffwechsel von NO. NO, das von wesentlicher Relevanz für die Mikrozirkulation ist, wird von der NO-Synthetase produziert. Die NO-Synthetase existiert in einer konstitutiven, endothelialen (eNOS) und einer induzierbaren Form (iNOS). Es zeigte sich, dass der Effekt von NO abhängig von seinem Ursprung ist, wobei der eNOS überwiegend protektive und der iNOS eine eher destruktive Rolle zukommt [4]. In diesem Zusammenhang entfaltet CO seine

protektive Wirkung über eine Inhibierung der iNOS [19]. Neben den oben genannten Effekten wirkt CO zusätzlich immunmodulierend, indem es die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β hemmt, während es die Expression des anti-inflammatorischen IL-10 verstärkt. Zusammen mit seiner zumindest zum Teil über den MAPK-Signalweg vermittelten anti-apoptotischen Wirkung besitzt CO so die Fähigkeit, einen IR-Schaden zu vermindern [19, 22, 27].

1.1.3 Klinische Relevanz

Im klinischen Umfeld tritt ein warmer IR-Schaden im Bereich von Leberresektionen und Lebertransplantationen sowie in Folge eines Lebertraumas oder eines hämorrhagischen Schocks auf [4].

Bis heute stellt massiver Blutverlust eine der größten Schwierigkeiten bei Leberteilresektionen dar [1]. Da die Menge des intraoperativ aufgetretenen Blutverlustes neben der Anzahl der resezierten Lebersegmente die wichtigste Determinante der perioperativen Morbidität und Mortalität darstellt, ist die Kontrolle des Blutverlustes im Rahmen eines leberchirurgischen Eingriffs von zentraler Bedeutung [28]. Diese Bedeutung wird zusätzlich dadurch verstärkt, dass mit der Zahl der erforderlichen perioperativen Bluttransfusionen die postoperative Komplikationsrate sowie die Rezidivrate im Falle von Tumorresektionen ansteigt [29, 30].

Aufgrund der hohen Relevanz des intraoperativen Blutverlustes für das Outcome der Patienten wurden verschiedene Verfahren entwickelt, die zum Ziel haben, den Blutverlust zu reduzieren. Neben neuen, sich an den Lebersegmenten orientierenden Operationsverfahren, zeigte sich, dass der intraoperative Blutverlust auch durch einen verminderten zentralvenösen Druck und einen möglichst geringen PEEP während der Narkose reduziert werden kann [31-34]. Darüber hinaus kommen zur Blutungskontrolle verschiedene gefäßokkludierende Verfahren zur Anwendung. Das Älteste dieser Verfahren ist das Pringle-Manöver [35]. Bei diesem wird der gesamte Blutzuffluss der Leber durch Okklusion der *Arteria hepatica propria* und *Vena porta* im *Ligamentum hepatoduodenale* unterbrochen. Vom Pringle-Manöver leiten sich weitere Verfahren ab, darunter das ebenfalls den Blutzuffluss unterbindende *Hemihepatic vascular clamping* (HHVC). Zusätzlich existieren mit der *total Hepatic vascular exclusion* (THVE) und der *Selective hepatic vascular exclusion* (SHVE)

Techniken, bei denen sowohl der Blutzufuss, als auch der Blutabfluss der Leber unterbrochen wird (siehe Abb. 4) [36, 37].

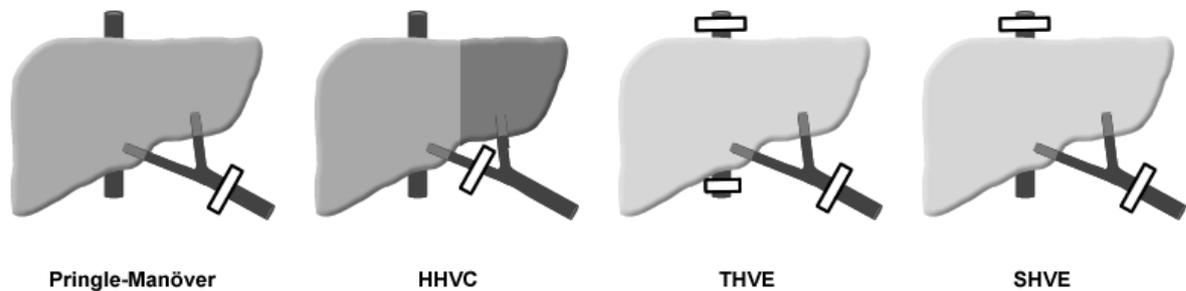


Abb. 4: Vasookkludierende Verfahren zur intraoperativen Blutungskontrolle bei Leberteilresektionen (angelehnt an Bahde et al., 2010 [1]).

HHVC: *Hemihepatic vascular clamping*; THVE: *Total hepatic vascular exclusion*; SHVE: *Selective hepatic vascular exclusion*.

Auf segmentaler Ebene ist eine Blutungskontrolle durch selektive Okklusion des versorgenden Pfortaderastes, einhergehend mit Okklusion der entsprechenden Segmentarterie, über ultraschallgesteuertes Einbringen eines Ballonkatheters möglich [38]. Gefäßokkludierende Verfahren bieten einerseits den großen Vorteil, den intraoperativ auftretenden Blutverlust effektiv senken zu können und den Transfusionsbedarf gering zu halten [39-41]. Andererseits induzieren sie durch die nicht vermeidbare Ischämie einen Parenchymschaden, welcher in der nachfolgenden Reperfusionphase exazerbiert und zu einem IR-Schaden führt [3]. Das Ausmaß eines solchen IR-Schadens reicht von einem Anstieg der Serumtransaminasen AST und ALT bis hin zur Posthepatektomie-Leberinsuffizienz und wird durch vorbestehende Leberparenchymveränderungen wie Zirrhose oder Steatose zusätzlich verstärkt [42-44]. Die Folgen sind eine signifikante Erhöhung der postoperativen Mortalität und Morbidität [3].

Ebenfalls eine substantielle Rolle spielt die Blutungskontrolle in der operativen Versorgung von traumatischen Leberverletzungen. Diese treten vor allem nach stumpfer Gewalteinwirkung auf das Abdomen auf und sind häufig mit einem hohen Blutverlust assoziiert [45]. Zwar liegt die Leber geschützt hinter dem rechten Rippenbogen, jedoch ist sie aufgrund ihres relativ fragilen Parenchyms anfällig für Traumen. Daher ist sie das am häufigsten in Folge eines Abdominaltraumas betroffene Organ [45, 46]. Darüber hinaus stellen Leberverletzungen die Haupttodesursache nach stattgehabtem schwerem Abdominaltrauma dar [47].

In den letzten zwanzig Jahren vollzog sich im Management des Lebertraumas ein deutlicher Paradigmenwechsel. Die operative Behandlung ist zugunsten eines konservativen Behandlungsansatzes in den Hintergrund getreten [45, 48, 49]. Demnach hat sich die nicht-operative Behandlung als Standard bei hämodynamisch stabilen Patienten etabliert und wird in 70-80% der Fälle erfolgreich angewandt. In den restlichen Fällen allerdings, in denen wegen hochgradigen Verletzungen oder hämodynamischer Instabilität eine unmittelbare Blutungskontrolle erforderlich ist, bleibt die operative Therapie das Mittel der Wahl [45, 49, 50]. In diesem Zusammenhang kommen neben dem operativen Einbringen von Tamponaden (*Perihepatic packing*) auch das Pringle-Manöver sowie in schweren Fällen eine THVE (*Total hepatic vascular exclusion*) zum Einsatz [45, 47, 50, 51]. Durch die beiden letztgenannten Methoden wird die Leber, wie bereits oben beschrieben, einer Ischämie und damit dem Risiko eines IR-Schadens und den sich daraus ergebenden Konsequenzen ausgesetzt.

Aus der starken Assoziation zwischen Lebertrauma und Blutverlust leitet sich mit dem hypovolämischen beziehungsweise hämorrhagischen Schock eine weitere Ursache ab, durch die eine hepatische Ischämie bedingt sein kann. Ein lebensbedrohliches hämorrhagisches Schockgeschehen kann neben einem Trauma der Leber auch durch ausgedehnte leberchirurgische Eingriffe verursacht sein [52, 53]. Eine ausgeprägte Hämorrhagie führt zu einem Absinken des Herzzeitvolumens, infolgedessen der hepatische Blutfluss überproportional stark abfällt und die hepatische Mikrozirkulation eine kritische Grenze unterschreitet. Die somit kompromittierte Sauerstoffversorgung des Gewebes führt zur Ausbildung einer Ischämie, die mit einer Dysfunktion der Leber bis hin zu zentrilobulären Nekrosen einhergeht [52-55].

Eine maßgebliche Bedeutung hat ein hepatischer IR-Schaden auch bei einer Lebertransplantation. Mit dem Zeitpunkt der Organentnahme, der sich die Kühlung und Perfusion des Organs mit einer Konservierungslösung anschließt, ist die Leber einer kalten Ischämie ausgesetzt. Während der Implantation im späteren Verlauf tritt zudem eine kürzere, warme Ischämiephase auf [3]. Eine kalte Ischämiedauer von über 12 Stunden stellt dabei einen signifikanten Risikofaktor für eine initiale Mangelfunktion (*Initial poor function*, IPF) bis hin zur primären Nichtfunktion (*Primary non-function*, PNF) des Transplantats dar [56-58]. Die Notwendigkeit einer erneuten Transplantation im Fall einer PNF sowie die positive Korrelation des Ausmaßes eines

IR-Schadens mit der Inzidenz einer akuten Transplantatabstoßungsreaktion verdeutlichen zusätzlich die Bedeutung eines IR-Schadens im Kontext von Lebertransplantationen [59, 60].

1.2 Protektive Strategien gegen einen Ischämie-Reperfusionsschaden

Wegen seiner klinischen Relevanz ist der IR-Schaden der Leber seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Es wurden sowohl chirurgische als auch nicht-chirurgische protektive Strategien entwickelt, um entweder die Ischämiezeit zu verkürzen oder die Toleranz der Leber gegenüber einem IR-Schaden zu erhöhen.

1.2.1 Chirurgische Strategien

Ischämische Präkonditionierung

Ischämische Präkonditionierung (IPC) beschreibt ein Verfahren, das ein Organ durch eine oder mehrere kurzzeitige, von einer Reperusionsphase gefolgte Ischämiephase(n) vor einer nachfolgenden, lang anhaltenden Ischämiephase schützt [3]. Man unterscheidet grundsätzlich eine frühe Phase der IPC, die innerhalb von Minuten nach Reperfusion einsetzt und in ihrem Effekt für wenige Stunden anhält (*Early/Acute preconditioning*), von einer späten, nach etwa 24 Stunden beginnenden Phase, deren Protektion sich über mehrere Tage hinweg erstreckt (*Late/Delayed preconditioning*) [61-63].

Eine Sonderform der IPC ist die sogenannte Fernpräkonditionierung (*Remote ischaemic preconditioning, RIPC*), bei der ein kurzer ischämischer Stimulus in einem Organ oder Gewebe (z. B. Muskulatur) zu einem protektiven Effekt in einem anderen Organ führt. Dabei kann der Stimulus sowohl durch eine invasive Gefäßokklusion als auch nicht-invasiv in Form eines Tourniquet (z. B. an einer Extremität) gesetzt werden [64-67].

Die IPC induziert über mehrere Mechanismen einen protektiven Effekt. Zunächst folgt aus der Supprimierung der Kupffer-Zell-Aktivität eine reduzierte Freisetzung von ROS und TNF- α [68, 69]. Die Aktivierung, Adhäsion und Transmigration von neutrophilen Granulozyten wird inhibiert, sodass das Ausmaß der Parenchymschädigung verringert wird [70-72]. Auch wird die Mikrozirkulation durch die genannten Vorgänge verbessert [69].

Zusätzlich führt die IPC zu einer Induktion der HO-1, die durch Reduktion des oxidativen Stresses und der erhöhten Expression anti-inflammatorischer Zytokine ihren bereits genannten protektiven Effekt vermittelt [73, 74].

Der Effekt des *Early preconditioning* hängt maßgeblich von schnell wirkenden, endogenen Substanzen ab, in diesem Fall NO und Adenosin [75]. In Folge einer IPC kommt es zur gesteigerten Adenosin-Synthese und Freisetzung. Über Bindung an den A₂-Rezeptor aktiviert Adenosin die eNOS und initiiert so die Synthese von NO [76]. NO vermittelt wiederum protektive Effekte über einen Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration und die Öffnung ATP-abhängiger K⁺-Kanäle [77, 78]. Daneben beeinflusst eine IPC den zellulären Energiestoffwechsel und führt zu einem Anstieg der ATP-Konzentration, dessen Ursache am wahrscheinlichsten in einem verminderten Zellmetabolismus zu sehen ist [79]. Zusätzlich zeigt sich durch IPC eine deutliche Reduktion der Apoptoserate, was unter anderem auf eine verminderte Aktivität der Caspase-3, eine reduzierte Freisetzung des mitochondrialen Cytochrom C und eine Inhibierung der mPTP-Öffnung (*Mitochondrial permeability transition pore*) zurückzuführen ist [80-83]. Des Weiteren erfolgt die Aktivierung weiterer zytoprotektiver Mechanismen über Stimulierung verschiedener Proteinkinasen, die die Genexpression modulieren. Dieser Effekt, der insbesondere im *Late preconditioning* zur Geltung kommt, führt zu einer verstärkten Synthese von antioxidativen Enzymsystemen, Hitzeschockproteinen, HO-1 und eNOS, welche alle einen zytoprotektiven Effekt aufweisen [3, 8].

Im klinischen Bezug zeigt sich, dass durch eine IPC der Parenchymschaden in Folge einer IR reduziert werden kann. Zudem ist es auf diese Weise möglich, die intraoperative Ischämiezeit risikoarm auf bis zu 75 Minuten auszudehnen [84]. Besondere Vorteile besitzt die IPC dabei im Rahmen operativer Eingriffe mit Ischämiezeiten bis 40 Minuten bei Patienten, die jünger als 60 Jahre sind [84, 85].

Intermittent Clamping

Bei diesem Verfahren wird intraoperativ durch Vasookklusion eine Ischämie von kurzen Reperfusionsphasen unterbrochen. Es konnte gezeigt werden, dass *Intermittent clamping* (IC) von der Leber besser toleriert wird als eine kontinuierliche Ischämie [86, 87].

Die protektiven Mechanismen des IC sind bisher nicht vollständig geklärt. IC aktiviert teilweise die gleichen Signalwege wie eine IPC, sodass es Gegenstand der aktuellen Diskussion ist, ob IC nicht einer repetitiven IPC entspricht [82].

Die zytoprotektiven Eigenschaften des IC kommen im klinischen Umfeld vor allem bei Patienten, die älter als 65 Jahre sind, bei vorbestehenden Leberpathologien und bei 40 Minuten überschreitenden Ischämiezeiten zum Tragen [84, 85]. Hinsichtlich einer risikoarmen Ausdehnung der intraoperativen Ischämiedauer scheint das IC der IPC mit 120 gegenüber 75 Minuten überlegen zu sein [88]. Mögliche Nachteile des IC sind der vermehrte, intraoperative Blutverlust und die längeren Dissektionszeiten [84, 85, 89]. Ein Einfluss auf die Mortalität und Morbidität besteht dadurch allerdings wohl nicht [89].

Ischämische Postkonditionierung

Im Gegensatz zur IPC wird die Applikation des konditionierenden Stimulus bei der ischämischen Postkonditionierung (IPost) nicht vor, sondern nach einer Ischämie durchgeführt. Es erfolgt zunächst eine intermittierende Reperfusion, die von kurzen Phasen einer Reokklusion unterbrochen ist. Analog zur IPC kann eine IPost entweder direkt am Erfolgsorgan (*Direct IPost*) oder an einem anderen Organ (*Remote IPost*) erfolgen [65].

Die zur Zytoprotektion führenden Mechanismen ähneln denen der IPC. Unter anderem spielen dabei Adenosin und NO, die Supprimierung pro-inflammatorischer Zytokine, die Aktivierung verschiedener molekularer Signalwege (PKC, ATP-abhängige K⁺-Kanäle) und die Apoptose-Inhibierung eine bedeutende Rolle [65, 90-92].

Der protektive Effekt einer IPost hinsichtlich Leberresektion und Lebertransplantation konnte zwar tierexperimentell nachgewiesen werden, jedoch ist eine Evidenz im klinischen Bereich bisher nicht gegeben [65, 93, 94].

1.2.2 Pharmakologische Strategien

Antioxidantien

Die zentrale Rolle, die oxidativer Stress innerhalb eines IR-Schadens einnimmt, prädestiniert als therapeutischer Ansatzpunkt für Pharmaka, welche die endogenen, antioxidativen Mechanismen unterstützen oder die Entstehung von ROS reduzieren.

Experimentelle Studien weisen für zahlreiche Agenzien einen protektiven Einfluss auf einen IR-Schaden nach. Neben Antioxidantien wie α -Tocopherol, Ascorbinsäure, α -Liponsäure, Glutathion oder N-Acetylcystein zeigte sich auch die Substitution, beziehungsweise Induktion von antioxidativ wirksamen Enzymen, beispielsweise Katalase oder Superoxiddismutase, dafür geeignet [95-102].

Klinische Studien ergaben jedoch weder eine Verbesserung des postoperativen Patienten-Outcomes, noch eine Verlängerung der Überlebenszeit eines Transplantats. Daher erhielt bisher keine dieser Substanzen Eingang in die klinische Routine [1, 8, 65].

Vasodilatoren

Die im Rahmen der Entstehung eines IR-Schadens auftretende Störung der Mikrozirkulation stellt einen weiteren Ansatz für eine pharmakologische Intervention dar.

Für einige vasodilatative Substanzen konnte tierexperimentell eine Protektion gegen einen IR-Schaden nachgewiesen werden. Zu diesen zählen unter anderem Prostaglandin-E1, das die Thromboxan A2-Synthese supprimiert, ACE-Hemmer, NO-Donatoren und CO [103-106].

Trotz dieser vielversprechenden Ansätze ist die klinische Evidenz für vasoaktive Substanzen bisher nur äußerst gering [1].

Anti-inflammatorische Therapie

Für zahlreiche anti-inflammatorische Strategien konnte in experimentellen Untersuchungen eine Reduktion des IR-Schadens nachgewiesen werden. Dazu zählen unter anderem Cyclooxygenase-2-, Protease- und Selektin-Inhibition, Zytokinrezeptor-Blockade, sowie die Applikation von Immunsuppressiva, beispielsweise Steroide oder Calcineurin-Inhibitoren [107-112]. Darüber hinaus

wurde nachgewiesen, dass durch Gabe von rekombinantem Interleukin-10 in einem Mausmodell die Expression von TNF- α supprimiert, die Akkumulation von Granulozyten inhibiert und so der hepatische IR-Schaden signifikant reduziert wird [113].

Im klinischen Kontext konnte gezeigt werden, dass eine einmalige Methylprednisongabe die postoperative Komplikationsrate sowie die Krankenhausverweildauer nach Hepatektomie mit IC senkt [114]. Ein ähnlicher Effekt konnte auch durch Applikation von Gabexate Mesilat, einem Protease-Inhibitor, erzielt werden [115, 116].

Apoptose-Inhibierung

Die Induktion der Apoptose, welche wesentlich zur Entstehung eines IR-Schadens beiträgt, stellt einen weiteren Ansatzpunkt für eine mögliche Intervention dar. Unter tierexperimentellen Bedingungen kann z. B. durch Inhibierung der Caspasen-Aktivierung, Applikation von anti-Fas und anti-Fas-Ligand-Antikörpern, Induktion einer Bcl-2-Überexpression und andere Mechanismen eine Protektion erreicht werden [117-120].

Da jedoch auch die physiologische Apoptose supprimiert wird, ist der therapeutische Wert durch die daraus resultierende Kanzerogenität limitiert [1, 8].

Pharmakologische Präkonditionierung

Protektive Effekte, wie sie durch IPC oder RIPC vermittelt werden, können auch durch pharmakologische Interventionen vor Beginn einer Ischämie erreicht werden. Diese Methode wird als pharmakologische Präkonditionierung bezeichnet. Besondere Relevanz in diesem Kontext besitzen volatile Anästhetika sowie Edelgase, hier insbesondere Helium.

Volatile Anästhetika

Zahlreiche experimentelle und klinische Studien zeigen dosisabhängige, kardioprotektive Eigenschaften für Isofluran und Sevofluran, die sich in einer Größenreduktion des Infarktareals äußern [121-125]. Als Mechanismen dafür werden neben Veränderungen im mitochondrialen Elektronentransport und der Ca^{2+} -

Homöostase auch die Generierung von ROS sowie die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen (PKC, PTK, MAPK) und ATP-abhängiger K⁺-Kanäle diskutiert. Weitere wichtige Rollen scheinen zudem eine Inhibierung der mPTP sowie eine Aktivierung der eNOS zu spielen. Die genauen Mechanismen sind bisher jedoch nicht lückenlos geklärt [126-130].

In Bezug auf einen hepatischen IR-Schaden konnte für Isofluran im Tierversuch ein protektiver Effekt nachgewiesen werden, der über die Induktion von HO-1 vermittelt wird [21, 131]. In der klinischen Anwendung konnte zusätzlich der Nachweis einer Organprotektion für Sevofluran erbracht werden [132].

Edelgase

Auch durch Präkonditionierung mit Edelgasen lassen sich protektive Effekte auf einen IR-Schaden erzielen. So konnte für das anästhetisch wirkende Xenon wie auch für die nicht-anästhetisch wirkenden Edelgase Helium, Neon und Argon gezeigt werden, dass der IR-Schaden im Herz reduziert wird [133, 134].

Für Helium konnte nachgewiesen werden, dass eine dreimalige, 5 Minuten andauernde Präkonditionierung durch Inhalation mit 70 Vol.-% Helium den kardialen IR-Schaden signifikant um 23% vermindert [133]. Dabei kommt der protektive Effekt des Heliums beim IR-Schaden des Herzens nicht nur in der frühen sondern auch in der späten Phase der Präkonditionierung zum Tragen [135]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Helium-Präkonditionierung die Infarktgröße nach einer fokalen, zerebralen Ischämie signifikant reduzieren kann [136]. Ebenfalls konnte durch Helium in einem humanen *in vivo*-Modell sowohl eine frühe, als auch eine späte Präkonditionierung des Endothels induziert werden [137].

Der protektive Effekt des Heliums wird über zahlreiche verschiedene Mechanismen vermittelt [138, 139]. Auch wenn die dafür verantwortlichen Signalkaskaden bisher noch nicht vollständig bekannt sind, konnten für einen myokardialen IR-Schaden bereits Signalwege aufgezeigt werden [138, 139]. Eine wichtige Rolle als Zielstruktur spielt dabei die mPTP. Ein in der Reperfusionphase auftretender, intramitochondrialer Ca²⁺-Overload, die verstärkte Synthese von ROS und der vermehrte Anfall von anorganischem Phosphat aus dem ATP- beziehungsweise ADP-Stoffwechsel führt zur Öffnung der mPTP und infolgedessen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials. Daraus resultiert ein intrazelluläres Ödem, eine Induktion der Apoptose und letztendlich der

Zelluntergang. Eine Helium-Präkonditionierung führt über verschiedene Kaskaden und Mediatoren zu einer Inhibierung der mPTP. Die Aktivierung der PI3K und ERK1/2 führt über Phosphorylierung weiterer nachgeschalteter Kinasen einerseits direkt zur Inhibierung der mPTP, andererseits über Alterationen in der Genexpression zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen, unter anderem Bcl-2 und Bax. Darüber hinaus aktivieren die PI3K und ERK1/2 die mTOR und ihr nachgeschaltetes Zielprotein p70s6K. Letzteres stellt einen Schlüsselinhibitor der GSK-3 β dar, welche über Stimulierung von p53 einen direkten apoptotischen Effekt besitzt und über die p53-vermittelte Translokation von Bax in die innere Mitochondrienmembran indirekt die Öffnung der mPTP initiiert [139].

Ein weiterer essentieller Mediator des protektiven Effekts von Helium ist NO. Die Aktivierung der PI3K stimuliert die eNOS und erhöht so die Synthese von NO. NO wiederum entwickelt seinen kardioprotektiven Effekt über Aktivierung mitochondrialer ATP-abhängiger K⁺-Kanäle und hemmt die Apoptose, indem es verschiedene Caspasen inaktiviert [138, 139].

Im Gegensatz zu der umfangreichen Datenlage für eine kardiale Helium-Präkonditionierung ist über den Effekt einer Helium-Vorbehandlung im Rahmen eines IR-Schadens der Leber wenig bekannt. Fukuda et al. konnten in einem *in vivo*-Modell der Maus zeigen, dass inhalativer Wasserstoff einen protektiven Effekt bei einem hepatischen IR-Schaden besitzt. Für Helium, das als Kontrolle ebenfalls untersucht wurde, konnte dies nicht gezeigt werden. In diesem Modell erfolgte die Applikation des jeweiligen Gases 10 Minuten vor Ende der Ischämie und für eine Gesamtdauer von 190 Minuten. Die Konzentration im Atemgasgemisch betrug dabei für Helium maximal 4% und war damit um ein Vielfaches niedriger als die beschriebenen kardioprotektiven Konzentrationen [140]. Inhalative Konzentrationen von Helium, die bei der kardialen Präkonditionierung häufig eingesetzt werden und deren protektiver Effekt nachgewiesen wurde (z. B. 70 Vol.-%), wurden bisher in *in vivo* IR-Modellen der Leber nicht untersucht.

1.3 Fragestellung

Im klinischen Kontext tritt eine temporäre Ischämie im Rahmen vaso-okkludierender Verfahren auf, die insbesondere bei ausgedehnten Leberteillesektionen zur

intraoperativen Blutungskontrolle Anwendung finden. Vasookkludierende Verfahren kommen zudem bei der operativen Versorgung von schweren, traumatisch bedingten Leberverletzungen zum Einsatz. Ein hämorrhagischer Schock stellt durch die gestörte Mikrozirkulation in Folge des verringerten Herzzeitvolumens eine weitere Ursache für das Auftreten einer hepatischen Ischämie dar. Ebenfalls kommt es bei Lebertransplantationen unweigerlich zu einer vorübergehenden Ischämie. Die klinische Relevanz ergibt sich aus der hohen Morbidität und Mortalität, von der Patienten mit einem hepatischen IR-Schaden bedroht sind.

Im Verlauf der letzten Jahre konnte für verschiedene chirurgische und pharmakologische Methoden gezeigt werden, dass sie das Ausmaß eines IR-Schadens reduzieren können. Mit der IPC und dem IC fanden lediglich zwei chirurgische Methoden klinische Anwendung. Diese besitzen jedoch den Nachteil, die Dauer des operativen Eingriffs zu verlängern und ein zusätzliches (Blutungs-) Risiko für den Patienten darzustellen [8, 132].

Demgegenüber besitzt das nicht-toxische Edelgas Helium einige positive Eigenschaften, welche es für eine pharmakologische Präkonditionierung interessant machen. Aufgrund seiner fehlenden anästhetischen Wirkung kann es relativ einfach und mit wenig Aufwand über eine Gesichtsmaske appliziert werden, ohne dass eine invasive Beatmung und Allgemeinanästhesie notwendig werden. Es kommt demnach auch für klinische Situationen in Frage, in denen eine hepatische Protektion ohne gleichzeitige Anwendung einer Allgemeinanästhesie wünschenswert ist. Zudem profitieren maschinell beatmete Patienten mit chronischen Atemwegserkrankungen vom inhalativen Einsatz von Helium. Zusätzlich ist es in seiner Anwendung deutlich weniger kostenintensiv als Xenon [135, 141].

In Zusammenschau der Vorteile, die Helium für eine Präkonditionierung bietet und vor dem Hintergrund der bereits gezeigten Kardio-, Neuro- und Endothel-Protektion, wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, ob sich durch Helium auch bei einem hepatischen IR-Schaden eine Organprotektion erzielen lässt [27, 133, 136]. Da sich bei bisher fehlender Evidenz die Durchführung einer klinischen Studie verbietet und ein isoliertes Organmodell weder die Rolle der Leber als zentrales Stoffwechselorgan, noch ihre Abhängigkeit von den hämodynamischen Verhältnissen ausreichend abbildet, wurde ein *in vivo*-Modell mit männlichen Wistar-Ratten etabliert. Um den Effekt einer Helium-Vorbehandlung vergleichbar zu machen und mittels eines bereits etablierten protektiven Stimulus die Anwendbarkeit des

Tiermodells im Sinne einer Positivkontrolle zu belegen, wurde in einer Behandlungsgruppe die ischämische Präkonditionierung (IPC) untersucht.

Es war das Ziel der vorliegenden Studie, die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Besitzt die Helium-Vorbehandlung einen präkonditionierenden Effekt auf einen hepatischen IR-Schaden?
2. Induziert eine Vorbehandlung mit Helium die mRNA-Expression von HO-1 als wichtigstes protektives Protein in der Leber?
3. Wird durch eine Vorbehandlung mit Helium der IR-bedingte oxidative Stress reduziert?
4. Welchen Einfluss hat eine Helium-Vorbehandlung auf systemische pro- und anti-inflammatorische Zytokine und die hepatische zelluläre Immunantwort?

Um den hepatischen IR-Schaden zu quantifizieren, wurden die Serumaktivitäten der Transaminasen ALT und AST herangezogen. Darüber hinaus wurde die Genexpression der HO-1 in der Leber untersucht und ein MDA-Assay zur Erfassung und Quantifizierung des oxidativen Stresses durchgeführt. Als Maß für die Akkumulation neutrophiler Granulozyten im Leberparenchym wurde die MPO-Aktivität gemessen. Das Ausmaß einer systemischen Inflammation wurde durch die Bestimmung der Serumkonzentrationen von IL-10 und TNF- α sowie deren Genexpression in der Leber erfasst.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (Aktenzeichen: 8.87-50.10.34.09.017) wurden für die Versuche männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von $300 \pm 30\text{g}$ eingesetzt.

Die Haltung der Tiere erfolgte in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Tiere standen unter regelmäßiger tierärztlicher Kontrolle und wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten. In den spezifisch-pathogen-freien (SPF) Haltungsräumen der Tierversuchsanlage herrschte eine Raumtemperatur von 22 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$. Die Tiere wurden in den Vorgaben des Tierschutzgesetzes entsprechenden Käfigen gehalten, welche mit dem entkeimten und entstaubten Weichholzgranulat Lignocel® 3-4 (J. Rettenmaier und Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, Deutschland) eingestreut waren. Den Ratten stand *ad libitum* Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse (R/M-H V1534-0 10 mm Pellets, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und keimfreies Wasser zur Verfügung, das mit Salzsäure auf einen pH-Wert von 3 angesäuert wurde.

Um eine maximale Vergleichbarkeit der Ergebnisse in den Versuchen zu erreichen und die Nüchternheit der Tiere zu Versuchsbeginn zu gewährleisten, wurde um 16:00 Uhr am Vortag jeden Versuchs das Futter aus den Tierkäfigen entfernt, während die Tiere weiterhin freien Zugang zu Wasser hatten.

2.2 Pharmaka

Injektionsanästhetikum	Pentobarbital (Narcoren® Pentobarbital-Injektionslösung für Tiere, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland)
------------------------	---

Muskelrelaxans	Pancuronium (Pancuronium Inresa Injektionslösung, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland)
----------------	--

Kristalloide Infusionslösung	Ringer-Lösung (Ringer-Lactat-Lösung nach Hartmann, DeltaSelect GmbH, Dreieich, Deutschland)
Druckluft	Druckluft DIN EN 12021, Linde Gas AG, Höllriegelskreuth, Deutschland
Medizinischer Sauerstoff	Conoxia® Sauerstoff verdichtet, Linde Gas Therapeutics GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Helium-Gasgemisch	70 Vol.-% He, 30 Vol.-% O ₂ -Gasgemisch, Linde Gas AG, Höllriegelskreuth, Deutschland

2.3 Geräte

Beatmungsgerät	7025 Rodent Ventilator, Ugo Basile, Comerio VA, Italien
Atemgasmonitor	Capnomac Ultima, Datex Engstrom Division Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland
Druckaufnehmer für die arterielle Blutdruckmessung	Statham P23XL, Spectramed Inc., Oxnard CA, USA
Signalwandler	PowerLab 8/30 ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia
Druckeichgerät	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland
BGA-Messgerät	Rapidlab 800/860, Bayer Diagnostics Mfg Ltd., Sudbury, UK

Glaskapillare für die BGA	AVL Capillary Tubes (heparinized: 6 IE Na-Heparin, 9 IE Li-Heparin per 100 microliter tube volume), AVL Scientific Corporation, Roswell, Georgia, USA
Thermometer zur rektalen Temperaturmessung	GTH 1160, Greisinger electronic GmbH, Regenstauf, Deutschland
Wärmeplatte	Julabo 6, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spritzenpumpe	Perfusor® segura, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
50 ml-Spritze	Original-Perfusor®-Spritze OPS 50 ml Luer Lock, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Infusionsleitung	Original Perfusor®-Leitung PE (150cm), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Drei-Wege-Hahn	Discofix®C-3, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Verbindungsleitung	Verbindungsleitung für Infusionsregime (1x2x150 mm), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Kanüle zur intraperitonealen Injektion	BD Microlance™ 3 27G (0,4x19 mm), BD, Drogheda, Irland
Endotrachealtubus	Vasofix® Safety 16G (1,7x50 mm), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Gefäßkatheter für arterielle und venöse Zugänge	Vasofix® Safety 24G (0,7x19 mm), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Tuberkulinspritze	Omnifix®-F Tuberkulin (1 ml), B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Probengefäß zur Zentrifugation der Blutproben	Safe-Lock Reaktionsgefäße 2,0 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Probengefäß zur Lagerung der Blutproben bei -80 °C	Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Probengefäß zur Lagerung der Gewebeproben bei -80 °C	PP-Schraubverschluss-Röhrchen (15 ml, PP, konischer Boden, 17,0 X 120 mm), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
Skalpell	Skalpellklinge BB521, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Chirurgischer Faden	Ethicon® PDS™II (5-0), Johnson-Johnson Intl., New Brunswick NJ, USA
Gefäßclip	Gefäßclip nach Biemer (Maulöffnung 5mm, Maullänge 9 mm, Schließkraft 30G-40G), Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
Photometer	Synergy 2, BioTek Instruments Inc., Winooski VT, USA
Schüttelplatte	Vibrax VXR, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland

Thermocycler	7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems™ by Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA
Mikrotiterplatte	96 Well Mikrotiterplatte aus Polystyrol mit Rundboden, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Elektrophoresekammer	Mini PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules CA, USA
Ultraschallbad	Sonorex RK 255 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland

2.4 Software

Aufzeichnungssoftware	Chart™5 Pro v.5.4.2, ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia
Statistikprogramme	GraphPad Prism® 5 for Mac OS X, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA The Relative Expression Software Tool (REST) 2.0.13, Michael W. Pfaffl, Technische Universität München, München, Deutschland und QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland

2.5 Reagentien

2.5.1 Real Time Quantitative PCR

DEPC-Wasser (0,1%)	1 ml Diethylpyrocarbonat ad 1000 ml Aqua dest., autoklaviert
--------------------	---

Ethidiumbromidlösung in autoklaviertem H ₂ O gelöst	5 mg/ml Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix	High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix, Applied Biosystems™ by Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA
TaqMan® Gene Expression Assay 20x	TaqMan® Gene Expression Assay 20x (HO-1), Applied Biosystems™ by Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA
TaqMan® Gene Expression Master Mix	TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems™ by Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA
TRizol®	TRizol® Reagent, Invitrogen™ by Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA

2.5.2 ELISA

<i>Assay diluent</i>	PBS + 10% FBS, pH 7,0
BD OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>Stop solution</i>	2 N H ₂ SO ₄

2.5.3 Protein-Isolation und Quantifizierung

Lösungen zur Protein-Bestimmung nach Lowry	Lösung 1	20 ml Reagenz A 200 µl Reagenz B 200 µl Reagenz C
	Lösung 2	5 ml Folins-Reagenz ad 5 ml Aqua dest.

Reagenz A	10 g Natriumcarbonat ad 500 ml 0,1 M Natriumhydroxid
Reagenz B	2 g Kalium-Natrium-Tartrat ad 100 ml Aqua dest.
Reagenz C	1 g Kupfersulfat ad 100 ml Aqua dest.
Folins-Reagenz	Folin & Ciocalteu's phenol reagent, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
NP-40	Tergitol® Type NP-40, The Dow Chemical Company, Midland MI, USA
Proteaseinhibitor	Complete™, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

2.5.4 MPO-Assay

TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
DMSO	Dimethylsulfoxid Sigma-Aldrich, Corporation, St. Louis MO, USA
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA

2.6 Pufferlösungen

2.6.1 Real Time Quantitative PCR

10x FA <i>Gel buffer</i> (pH 7,0)	200 mM 3-N-Morpholino-Propansulfonsäure 50 mM Natriumacetat
-----------------------------------	--

	10 mM Ethylendiamintetraacetat ad 1000 ml DEPC-Wasser (0,1 %)
1x FA <i>Gel running buffer</i>	100 ml 10x FA Gel Puffer 20 ml Formaldehyd (37%) ad 880 ml DEPC Wasser
<i>Loading buffer</i>	1 ml Promega LB 72 µl 37%iges Formaldehyd

2.6.2 ELISA

<i>Coating buffer</i> für IL-10 ELISA	0,2 M Sodium Phosphate, pH 6,5 11,80 g Na ₂ HPO ₄ 16,10 g NaH ₂ PO ₄ ad 1000 ml Aqua dest.
<i>Coating buffer</i> für TNF ELISA	0,1 M Sodium Carbonate, pH 9,5 8,40 g NaHCO ₃ 3,56 g Na ₂ CO ₃ ad 1000 ml Aqua dest.
<i>Wash buffer</i>	PBS + 0,05% Polysorbat 20

2.6.3 Protein-Isolation und Quantifizierung

Lysepuffer (100 ml)	10 mM TRIS-Puffer pH 8,0 1 mM Ethylendiamintetraacetat 400 mM Natriumchlorid 1 mM Dithiothreitol 10 ml Glycerol 0,5 ml NP-40 40 µl/ml Complete™
---------------------	---

2.7 ELISA Sets

BD OptEIA™ Rat IL-10 ELISA Set BD Biosciences, San Diego CA, USA

BD OptEIA™ Rat TNF ELISA Set BD Biosciences, San Diego CA, USA

2.8 Versuchsgruppen

Männliche Wistar-Ratten wurden insgesamt 6 Versuchsgruppen (SHAM, IPC, HePC, IR, IPC-IR, HePC-IR) randomisiert zugeteilt. Jeweils 8 Tiere bildeten dabei eine Gruppe. Die Dauer der Versuche, vom Abschluss der Narkoseeinleitung und Instrumentierung bis zur Euthanasie, betrug unabhängig von der Intervention für alle Gruppen 315 Minuten. Die einzelnen Versuchsgruppen sind im Folgenden beschrieben und in Abb. 5 graphisch dargestellt. Die Tiere der SHAM-Gruppe wurden lediglich einer Schein-Operation unterzogen mit Darstellung der Lebergefäße nach Laparotomie ohne nachfolgende pharmakologische oder chirurgische Intervention. In der IPC-Gruppe wurden die Tiere ischämisch präkonditioniert. Dazu wurde zu Versuchsbeginn eine 10-minütige partielle Leberischämie induziert, der sich eine ebenfalls 10-minütige Reperfusion anschloss. Im Versuchsverlauf erfolgte keine weitere Intervention. Bei den Tieren der HePC-Gruppe wurde eine Vorbehandlung mit Helium durchgeführt. In 3 Zyklen wurden die Tiere für jeweils 5 Minuten mit 70 Vol.-% Helium beatmet gefolgt von einer 5-minütigen Auswaschphase. Die FiO_2 betrug zu jeder Zeit 30%. Eine weitere Intervention erfolgte nicht. In der IR-Gruppe wurde zu Versuchsbeginn eine 45-minütige Leberischämie induziert, der sich eine Reperfusionsphase von 240 Minuten anschloss. Eine ischämische oder pharmakologische Vorbehandlung erfolgte nicht.

Die Tiere in der IPC-I/R-Gruppe wurden zunächst für 10 Minuten ischämisch präkonditioniert. Nach einer 10-minütigen Reperfusion wurde erneut eine Leberischämie induziert, jedoch von 45 Minuten Dauer. Anschließend folgte die 240 Minuten dauernde Reperfusion.

In der HepC-IR-Gruppe erfolgte zunächst die oben beschriebene Vorbehandlung mit Helium. Nach der letzten Auswaschphase erfolgte die Induktion einer 45 Minuten dauernden Leberischämie, welcher sich eine 240-minütige Reperfusionsphase anschloss.

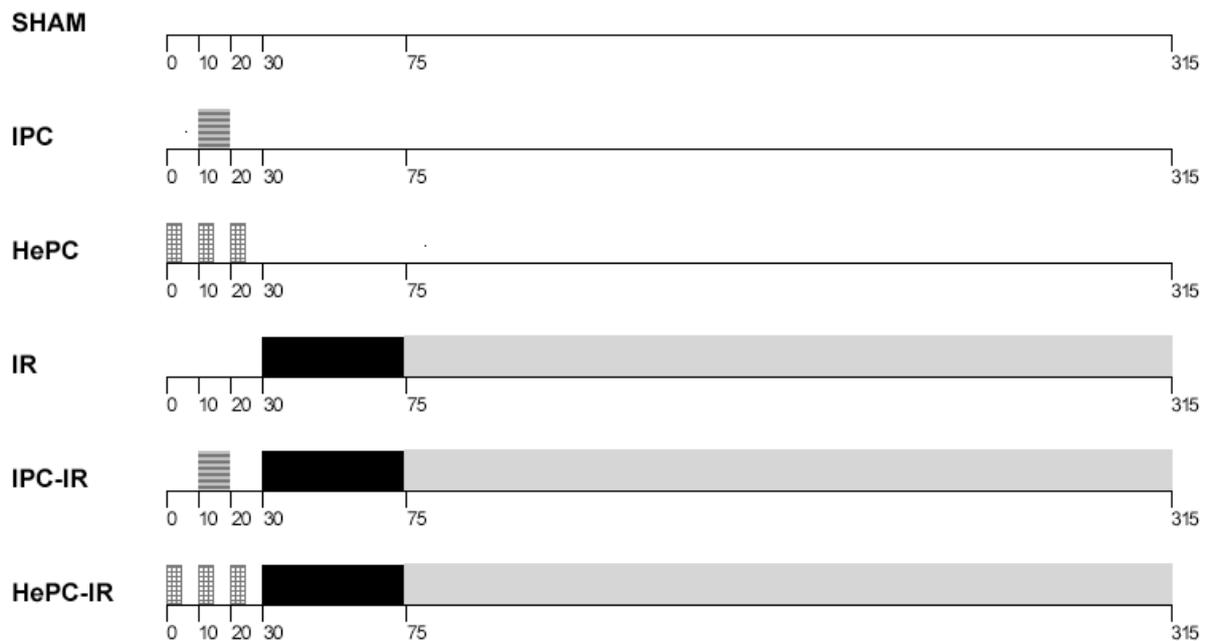


Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs in den einzelnen Versuchsgruppen.

▨ : Ischämische Präkonditionierung; ▩ : Helium-Präkonditionierung; ■ : Ischämie; □ : Reperfusion; Die Versuchszeit in Minuten ist jeweils auf der x-Achse dargestellt.

2.9 Versuchsablauf

Der gesamte Versuchsablauf lässt sich in einen allgemeinen und einen speziellen Teil unterteilen.

Der allgemeine Teil beinhaltete die Narkoseeinleitung, Instrumentierung und Präparation der Tiere zu Beginn des Versuchs sowie die Euthanasie und Probenentnahme am Versuchsende. Sämtliche in diesem Teil enthaltene Arbeitsschritte waren für alle Versuchsgruppen identisch und wurden stets in der gleichen Reihenfolge durchgeführt, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse zu schaffen.

Der spezielle, für die einzelnen Versuchsgruppen unterschiedliche Teil des Versuchs, begann nach erfolgter Instrumentierung und Präparation der Tiere und endete mit dem Beginn der Probenentnahme.

Die einzelnen Arbeitsschritte des Versuchs, dabei verwendete Materialien und angewandte Methoden werden im Folgenden detailliert dargestellt.

2.9.1 Einleitung der Anästhesie

Zur Einleitung der Narkose wurde den Tieren 60 mg/kg KG Pentobarbital als Bolus über eine intraperitoneal platzierte Kanüle injiziert. Die Narkosetiefe wurde klinisch anhand des erloschenen Korneal-Reflexes und fehlender Reaktionen auf einen Schmerzreiz überprüft. Unmittelbar nach Wirkungseintritt erfolgte die endotracheale Intubation mit einer Venenverweilkanüle (16 G), aus der zuvor der Stahlmandrin entfernt wurde. Nach erfolgreicher Intubation wurden die Tiere auf eine Wärmeplatte umgelagert und in Rückenlage volumenkontrolliert mit einem PEEP von 3 cm H₂O maschinell beatmet. Die initiale Atemfrequenz betrug 45/min bei einem Tidalvolumen von 3 ml. Die Tiere wurden mit Druckluft beatmet, der zusätzlich medizinischer Sauerstoff beigemischt wurde, so dass die FiO₂ 30% betrug. Die Überwachung der FiO₂ erfolgte über einen Atemgasmonitor.

Im weiteren Verlauf wurden die Beatmungsparameter nach Anlage der Gefäßzugänge unter Kontrolle des pCO₂ in der arteriellen BGA so modifiziert, dass sich der pCO₂ im Zielbereich von 35-45 mmHg befand.

Nach oben beschriebener Lagerung der Tiere auf die Wärmeplatte und Beginn der maschinellen Beatmung wurde der Endotrachealtubus an der Trachea fixiert. Dazu wurde zunächst die ventrale Halshaut auf einer Länge von 2 cm eröffnet. Die nun frei liegende Halsfaszie wurde stumpf eröffnet. Anschließend erfolgten die beidseitige Darstellung der *Glandula parotis* und Abdrängung dieser nach lateral. Im nächsten Schritt wurde die prätracheale Muskulatur mit einer Präparierschere bis zur Freilegung der Trachea stumpf durchtrennt. Danach wurde die Trachea mobilisiert und mit einem Nylonfaden ligiert. Die beiden Enden des Nylonfadens wurden durch die vorhandenen Löcher des als Endotrachealtubus verwendeten Gefäßkatheters geführt und dort mit einem chirurgischen Knoten fixiert.

2.9.2 Anlage der Gefäßzugänge

Zur Anlage eines zentral-venösen Zugangs wurde über den bereits aus der Fixation des Endotrachealtubus vorhandenen zervikalen Zugang die rechte *Vena jugularis interna* aufgesucht und auf einer Strecke von 1,5 cm stumpf mobilisiert. Auf dieser freipräparierten Strecke der *Vena jugularis interna* erfolgte möglichst weit kranial eine Gefäßligatur mittels Nylonfaden. Kaudal wurde eine zweite Ligatur locker vorgelegt, welche das Gefäßlumen nicht beeinträchtigte. Nun erfolgte die Gefäßpunktion und

das Einbringen eines Gefäßkatheters. Durch Zuziehen der vorgelegten kaudalen Ligatur wurde er in seiner Lage fixiert. Zudem wurden die beiden freien Enden des Nylonfadens durch die vorhandenen Löcher am extravasal gelegenen Teil des Gefäßkatheters geführt und dort mit einem chirurgischen Knoten befestigt.

Um einen arteriellen Gefäßzugang zu schaffen, wurde die *Arteria carotis interna* durch stumpfe Präparation links paratracheal freigelegt und ebenfalls auf einer 1-2 cm langen Strecke mobilisiert. Am kranialen Ende des mobilisierten Gefäßabschnitts wurde dieser mit einem Nylonfaden ligiert. Darüber hinaus wurde möglichst weit kaudal eine zweite Ligatur locker und ohne das Gefäßlumen zu verengen vorgelegt. Um im Falle einer Fehlpunktion einen Schaden des Tieres durch hohen Blutverlust zu vermeiden wurde oberhalb der kaudalen Ligatur ein Gefäßclip als Blutsperre angebracht. Nach erfolgreicher Punktion der *Arteria carotis interna* wurde der Gefäßclip wieder entfernt und der Gefäßkatheter intraluminal positioniert. In gleicher Weise wie beim zentral-venösen Zugang erfolgte anschließend die Fixation des Gefäßkatheters, einerseits durch das Zuziehen der kaudalen Ligatur, andererseits durch Verknotung der freien Enden des Nylonfadens an den dafür vorgesehenen Löchern des Gefäßkatheters.

2.9.3 Aufrechterhaltung der Anästhesie und Relaxierung

Nach Anlage der Gefäßzugänge wurde die mit einer intraperitonealen Bolusinjektion von Pentobarbital begonnene Anästhesie intravenös fortgeführt. Dazu wurden 40 mg Pentobarbital/kg KG/Stunde infundiert. Die Steuerung der Infusion erfolgte über eine Spritzenpumpe. In diese wurde die in einer 50 ml-Spritze befindliche Pentobarbitallösung eingespannt und über eine Infusionsleitung mit dem zentral-venösen Zugang konnektiert. Zur Beurteilung der Narkosetiefe wurden während des gesamten Versuchs die physiologischen Parameter Herzfrequenz und Blutdruck herangezogen.

Die Relaxierung der Tiere mit Pancuronium erfolgte ebenfalls intravenös. Zur Relaxierung wurden 1,0 mg Pancuronium/kg KG als Bolus über den zentral-venösen Zugang verabreicht.

Über eine zweite Spritzenpumpe erfolgte, wiederum aus einer 50 ml-Spritze, die Infusion von Ringer-Lösung, einerseits zur Volumensubstitution, andererseits um die Durchgängigkeit des arteriellen Zugangs im weiteren Verlauf sicherzustellen. Der

Anschluss an den arteriellen Zugang wurde über eine Infusionsleitung und über eine, am distalen Ende dieser Leitung angebrachten Drei-Wege-Hahn hergestellt. Die Infusionsmenge betrug 9,0 ml Ringer-Lösung/kg KG/Stunde. Insgesamt wurden 20 ml/kg/h kristalloider Lösung infundiert.

2.9.4 Invasive Blutdruckmessung

Die invasive Blutdruckmessung erfolgte über den freien, nicht von der Infusion belegten Schenkel des am arteriellen Zugang installierten Drei-Wege-Hahns. Dafür wurde der Druckaufnehmer über eine Verbindungsleitung an den Drei-Wege-Hahn angeschlossen. Das von dem Druckaufnehmer gelieferte Signal wurde mit PowerLab 8/30 verarbeitet und mit Hilfe von Chart™5 Pro graphisch dargestellt.

Als Zielbereich für den invasiv gemessenen Blutdruck wurde ein Normotonus mit systolischen Werten zwischen 120 mmHg und 140 mmHg angestrebt. Bei Blutdruckwerten unter 120 mmHg erfolgte eine bolusweise Volumengabe. Lag der Blutdruck über 140 mmHg wurde die Narkose vertieft.

Zur Vermeidung von Messfehlern beziehungsweise Reduktion von Messungenauigkeiten wurde der Druckaufnehmer zu Beginn jedes Versuchs geeicht.

2.9.5 Arterielle Blutgasanalyse

Zur Sicherstellung einer Normoventilation der Tiere wurde zu Beginn des Versuchs und bei Einsetzen der Reperfusion eine BGA aus arteriellem Blut durchgeführt und der pCO₂ bei Bedarf über die Atemfrequenz korrigiert.

Die Blutentnahme erfolgte am Drei-Wege-Hahn des arteriellen Zugangs. Zunächst wurde dort die Infusionsleitung der Ringer-Lösung diskonnektiert, anschließend mit einer Tuberkulinspritze 1 ml Blut aspiriert und dann weitere 0,4 ml Blut entnommen. Das Blut wurde aus der Tuberkulinspritze in eine Glaskapillare überführt und unmittelbar danach maschinell analysiert.

Das zu Beginn entnommene Blut wurde darauffolgend retransfundiert, sodass ein relevanter Abfall der Hämoglobinkonzentration im Blut durch die Blutentnahme vermieden werden konnte.

Zum Abschluss erfolgten die Spülung des arteriellen Zugangs mit Ringer-Lösung und der Wiederanschluss der Infusionsleitung an den Drei-Wege-Hahn.

2.9.6 Temperaturmessung

Um ein Auskühlen der Tiere im Zeitverlauf des Versuchs zu verhindern, erfolgte in Intervallen von 15 Minuten eine rektale Messung der Körperkerntemperatur. Gegebenenfalls wurde die Wärmeplattentemperatur entsprechend adaptiert, um die Körperkerntemperatur im Zielbereich zwischen 36,5°C und 37,5°C konstant zu halten. Des Weiteren wurden die Tiere bei Bedarf von den Vorderläufen an abwärts mit handelsüblicher Klarsichtfolie zur Wärmeisolation bedeckt.

2.9.7 Präparation der Leberpforte und Ischämie-Induktion

Im Vergleich zur menschlichen Leber weist die anatomische Struktur der Rattenleber einige Unterschiede auf (siehe Abb. 6). Insgesamt besteht sie aus vier Leberlappen. Rechts kranial, unterhalb des Zwerchfells befindet sich der mittlere Lappen (ML), welcher das größte Volumen aufweist und sich wiederum in einen rechten (RML) und linken mittleren Lappen (LML) gliedert. Der ML steht linksseitig mit dem linken, lateralen Leberlappen (LLL) in Verbindung. Kaudal des ML liegt, rechts von der *Vena cava inferior*, der rechte Leberlappen (RL). Er wird fast vollständig vom ML überdeckt und ist in einen superioren (SRL) und einen inferioren Lappen (IRL) unterteilt. Der kaudale Leberlappen (CL) schließlich liegt dorsokaudal des LLL und links von der *Vena cava inferior*. Der CL ist unterteilt in einen anterioren (ACL) und posterioren Lappen (PCL), sowie den kaudalen Fortsatz (CP). Letzterer umgibt die *Vena cava inferior* und verbindet den CL mit dem RL [142]. Die Anteile der einzelnen Leberlappen am Gesamtvolumen der Leber stellt Tabelle 1 dar.

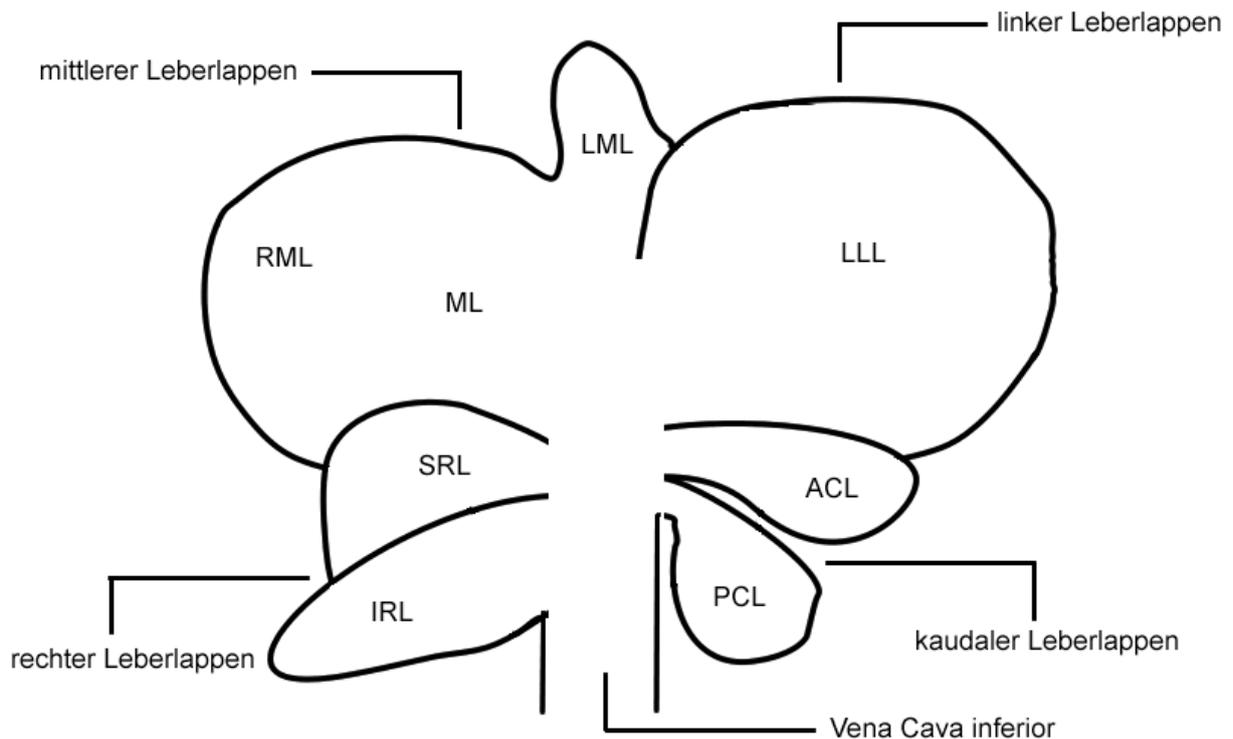


Abb. 6: Anatomische Struktur der Rattenleber (angelehnt an Martins et al., 2007 [142]).

ML: mittlerer Leberlappen; RML: rechter mittlerer Leberlappen; LML: linker mittlerer Leberlappen; LLL: linker lateraler Leberlappen; SRL: superiorer rechter Leberlappen; IRL: inferiorer rechter Leberlappen; ACL: anteriorer kaudaler Leberlappen; PCL: posteriorer kaudaler Leberlappen.

Tabelle 1: Anteile der einzelnen Leberlappen am gesamten Lebervolumen [142].

Leberlappen	Anteil am gesamten Lebervolumen
Mittlerer Lappen (ML)	38%
Linker, lateraler Lappen (LLL)	30%
Rechter Lappen (RL)	22%
Kaudaler Lappen (CL)	10%

Um eine 70%ige Ischämie der Leber induzieren zu können, war es erforderlich, die Perfusion des mittleren und des links-lateralen Leberlappens zu unterbinden.

Der operative Zugang zur Leber wurde über eine 3,5 cm lange mediane Laparotomie geschaffen. Zur Verbesserung der Einsicht in das Operationsfeld wurde der Rücken der Tiere auf Höhe der Leber durch Unterlage einer Rolle unterpolstert. Des Weiteren wurden die beiden Wundränder mit einer Klemme und einem daran befindlichen Nylonfaden kraneo-lateral gespreizt und in dieser Stellung fixiert.

Bei nun freiem Blick auf die Leber erfolgte zunächst eine kraniale Verlagerung des mittleren Lappens (ML) und des links-lateralen Lappens (LLL). Das dadurch freigelegte *Ligamentum hepatoduodenale* wurde mit einer Pinzette von seiner

dorsalen Fixation gelöst und mobilisiert. Zur Markierung wurde ein Nylonfaden um das *Ligamentum hepatoduodenale* gelegt.

Zur Induktion der Leberischämie bei Tieren der entsprechenden Gruppen wurde das *Ligamentum hepatoduodenale* zunächst mit einer Pinzette ein Stück weit anterior verlagert. Anschließend wurde ein Gefäßclip kranial des rechten Leberlappens (RL) und des kaudalen Leberlappens (CL) positioniert, sodass die entsprechenden Äste der *Vena porta*, *Arteria hepatica propria* und des *Ductus choledochus* vollständig komprimiert wurden. Die erfolgreiche Induktion der Ischämie wurde anhand der sich einstellenden dunkel-lividen Verfärbung der betroffenen Leberareale beurteilt.

Nach Beginn der Reperfusionphase wurde die Laparotomie mit Einzelknopfnähten verschlossen.

2.9.8 Entnahme des Probenmaterials

Am Versuchsende wurde die Probenentnahme in stets identischer Reihenfolge durchgeführt. Zunächst wurden 4 bis 5 ml Blut über den arteriellen Zugang entnommen. Dieses wurde umgehend auf vier Probengefäße verteilt.

Zur Entnahme der Leber wurden die Tiere in die gleiche Lagerung wie zur Präparation der Leberpforte verbracht. Anschließend wurden die zum Verschluss der Bauchwand dienenden Einzelknopfnähte entfernt und die einzelnen Leberlappen, gegebenenfalls nach ischämischen und nicht ischämischen Leberlappen getrennt, nacheinander entnommen. Im Anschluss wurden die einzelnen Leberlappen mit einem Skalpell in mehrere Stücke geschnitten und auf entsprechende Probenbehältnisse verteilt, wobei für ischämische und nicht-ischämische Leberlappen jeweils separate Gefäße verwendet wurden. Unmittelbar danach wurden die Lebergewebsproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Durch das oben beschriebene Entbluten in Narkose und einer zusätzlichen intravenösen Gabe von Pentobarbital in letaler Dosis, wurden die Tiere tierschutzgesetzkonform euthanasiert.

2.10 Bestimmung der Serumaktivität von AST und ALT

Die Aktivitäten der Lebertransaminasen AST und ALT im Serum der entnommenen Blutproben wurden im Zentralinstitut für klinische Chemie und

Laboratoriumsdiagnostik am Universitätsklinikum Düsseldorf (Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf) durch Frau Dr. med. Barthuber bestimmt.

2.10.1 Aufbereitung der Proben

Nach der Entnahme und Verteilung des Bluts auf die vier Probengefäße wurde 30 Minuten lang die Gerinnung des Blutes bei Raumtemperatur abgewartet. Daraufhin erfolgte die erste Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10600 x g für eine Dauer von 5 Minuten. Im Anschluss wurde das Serum abpipettiert und in zwei weitere Probengefäße überführt. Das Sediment wurde verworfen. Dem schloss sich eine zweite Zentrifugation über 5 Minuten an, ebenfalls bei Raumtemperatur und 10600 x g. Erneut wurde die flüssige Phase in zwei kleinere Probengefäße pipettiert und das Sediment verworfen. Anschließend wurden die Serumproben eingefroren und bei -80°C gelagert.

Beim späteren Transport ins Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik wurde die Aufrechterhaltung der Probenkühlung strikt sichergestellt, sodass die Kühlkette zu keinem Zeitpunkt unterbrochen wurde.

2.10.2 Messmethode

Die Bestimmung der AST- beziehungsweise ALT-Aktivität im Serum der Versuchstiere erfolgte nach der von der *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) 2002 empfohlenen Standardmethode mit Pyridoxalphosphataktivierung bei einer Messtemperatur von 37,0 °C. Alle dafür benötigten Reagenzien wurden als gebrauchsfertige, mit Konservierungsmitteln versetzte Lösungen von der Firma Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bezogen.

Zur Messung der AST-Aktivität wurden der Serumprobe ein TRIS-Puffer (100 mmol/l, pH 7,8), L-Aspartat (300 mmol/l), NADH (0,23 mmol/l, aus Hefe), MDH ($\geq 0,53$ U/ml, aus Schweineherz), LDH ($\geq 0,75$ U/ml, aus Mikroorganismen), PALP (≥ 120 μ mol/l) und α -Ketoglutarat (75 mmol/l) zugesetzt. Die von der AST katalysierte, in Abb. 7 dargestellte Gleichgewichtsreaktion wurde auf diese Weise gestartet. Dabei dient PALP als Coenzym für den Transfer der Aminogruppe und garantiert eine maximale katalytische Enzymaktivität. Die Zunahme der Oxalacetatkonzentration wird in einer von der MDH katalysierten Indikatorreaktion bestimmt (siehe Abb. 8). Die durch

Oxidation bedingte Abnahme der NADH-Konzentration wird in ihrer Geschwindigkeit photometrisch erfasst und ist direkt proportional zur AST-Aktivität.

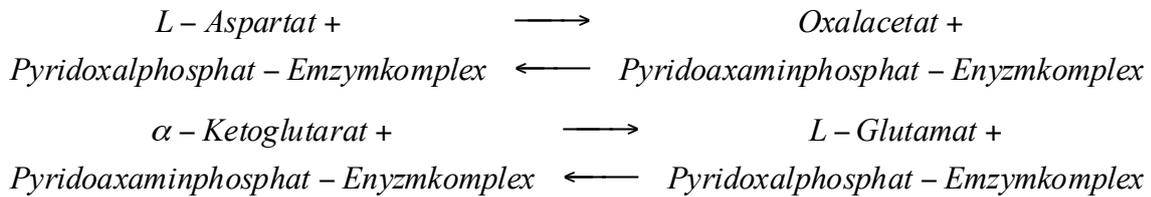


Abb. 7: AST-katalysierte Reaktion mit PALP als Coenzym.

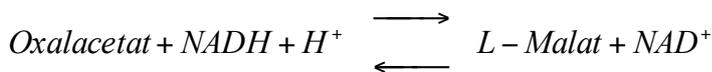


Abb. 8: Indikatorreaktion zur Messung der abnehmenden NADH-Konzentration.

Mit einem ähnlichen Testprinzip wurde die Aktivität der ALT gemessen. Der Serumprobe wurde TRIS-Puffer (125 mmol/l, pH 7,3), L-Alanin (625 mmol/l), NADH (0,23 mmol/l, aus Hefe), LDH ($\geq 1,5$ U/ml, aus Mikroorganismen), PALP (≥ 120 $\mu\text{mol/l}$) und α -Ketoglutarat (94 mmol/l) zugegeben und dadurch die von der ALT katalysierte Gleichgewichtsreaktion (siehe Abb. 9) gestartet, in der PALP als Coenzym dient und eine maximale Enzymaktivität gewährleistet. Durch eine zweite von der LDH katalysierten Indikatorreaktion wird die Zunahme der Pyruvatkonzentration bestimmt (siehe Abb. 10). Aufgrund der Oxidation von NADH geht diese Reaktion einher mit einer Abnahme der NADH-Konzentration. Somit ist die Geschwindigkeit der NADH-Konzentrationsabnahme, die photometrisch gemessen wird, direkt proportional zur ALT-Aktivität.

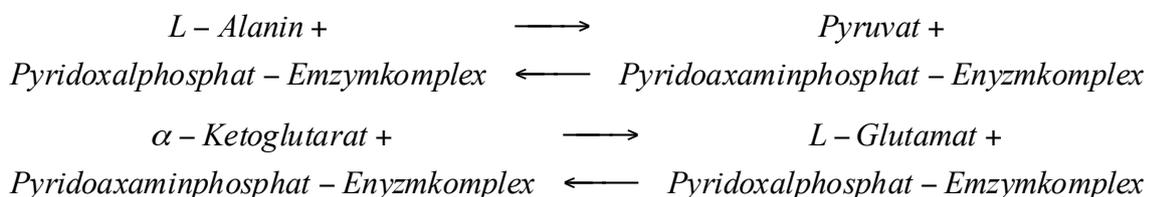


Abb. 9: ALT-katalysierte Reaktion mit PALP als Coenzym.

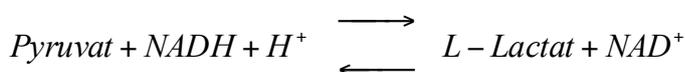


Abb. 10: Indikatorreaktion zur Messung der abnehmenden NADH-Konzentration.

2.11 Real Time Quantitative PCR

Als frühes Korrelat einer HO-1-Induktion beziehungsweise einer inflammatorischen Zytokinantwort wurde die Genexpression der HO-1 und der Zytokine IL-10 und TNF- α gemessen.

Nach Isolierung der mRNA aus dem ischämischen Lebergewebe erfolgte zunächst die reverse Transkription der mRNA in cDNA und anschließend die quantitative Analyse durch eine Real Time PCR. Die Messung der Genexpression wurde durch Quantifizierung der Fluoreszenz nach Markierung der cDNA mit spezifischen TaqMan®-Sonden ermöglicht (siehe Tabelle 2). Die gemessenen Werte wurden als relative Expression nach Normierung gegen die Expression des Referenzgens GAPDH als nicht-reguliertes *Housekeeping gene* mit der $\Delta\Delta$ -C_t-Methode dargestellt [143].

2.11.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Lebergewebe erfolgte mit TRIzol®, basierend auf der *single step*-Methode nach Chomczynski und Sacchi [144].

Zunächst wurde das gefrorene Gewebe mit einem Potter pulverisiert. Anschließend wurden 100 mg Gewebe in 1 ml TRIzol® suspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur homogenisiert. Zur Phasentrennung wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben. Die so erhaltene Lösung wurde für 15 Sekunden handgeschüttelt und für weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben 15 Minuten lang bei 4 °C mit 12000 x g zentrifugiert. Hierbei bildeten sich drei Phasen aus: Eine obere, wässrige Phase, in der die RNA gelöst war, eine mittlere, weißliche, proteinhaltige Phase und eine untere, rötliche Phase, welche die DNA enthielt. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und in ein neues Probengefäß überführt, während die beiden anderen Phasen verworfen wurden. Im Anschluss wurden die Proben mit 0,5 ml Isopropylalkohol versetzt, gevortext und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Bedingt durch den Isopropylalkohol präzipitierte die RNA und bildete nach 30-minütiger Zentrifugation bei 12000 x g ein festes, weißliches RNA-Pellet. Der Überstand wurde verworfen und die RNA mit 1 ml 75%igem, unvergälltem Ethanol gewaschen, gevortext und anschließend mit 7500 x g bei 4 °C für 5 Minuten erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert und das neu erhaltene RNA-Pellet im offenen Probengefäß bei Raumtemperatur

getrocknet. Daraufhin wurde die RNA mit 100 µl destilliertem, RNase-freiem Wasser resuspendiert und die Probe auf 60 °C erhitzt. Nach Erreichen der Zieltemperatur wurden die Proben auf Eis gelagert.

2.11.2 Kontrolle der RNA-Reinheit und -Integrität

Zur Prüfung des Reinheitsgehalts der RNA und ihrer Konzentration sowie zum Ausschluss möglicher Verunreinigungen oder Denaturierungen wurde die optische Dichte der RNA-Proben bestimmt. Dazu wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Ein Quotient der Extinktionen von 1,9 bis 2,0 galt als Maß für eine ausreichende Reinheit. Zur Kontrolle der RNA-Integrität wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Zur Herstellung des Gels wurden 1,2 g Agarose, 10 ml 10x FA *Gel buffer* und 90 ml DEPC-Wasser (0,1%) in Lösung gebracht und für 3 Minuten aufgeköcht. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,8 ml 37%-igem Formaldehyd, sowie von 2 µl Ethidiumbromidlösung als Fluoreszenzfarbstoff. Nach Einfüllung in die Gelform und Einsetzen eines Kamms härtete das Gel bei Raumtemperatur aus. Zeitgleich erfolgte die Vorbereitung der Proben. 2,5 µg RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl verdünnt. Nach Zugabe von 3 µl *Loading buffer* wurde die Lösung für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Im nächsten Schritt wurde das ausgehärtete Gel in die Elektrophoresekammer eingebracht und diese mit 1xFA *Gel running buffer* gefüllt. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert und für eine Stunde eine Spannung von 100 V an die Elektrophoresekammer angelegt.

Der Nachweis der RNA-Integrität erfolgte durch Visualisierung von deutlichen 28S- und 18S-rRNA-Banden auf dem Gel mit einem Fluoreszenzintensitätsverhältnis von ungefähr 2:1.

2.11.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Um die aus dem Lebergewebe isolierte RNA in cDNA zu transformieren, wurden die RNA-Proben zunächst auf ein Gesamtvolumen von 16 µl mit einer Konzentration von 0,0625 µg/µl verdünnt. Danach wurden 16 µl RNA-Lösung mit 4 µl *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* gemischt und kurzzeitig zentrifugiert. Dieser Reaktionsansatz wurde anschließend im Thermocycler 5 Minuten auf 25 °C, 30

Minuten auf 42 °C und 5 Minuten auf 85 °C erhitzt und zum Schluss auf 12 °C gekühlt. Die cDNA wurde dann im nächsten Schritt amplifiziert.

2.11.4 Amplifikation der cDNA

Für die Amplifikation der cDNA wurden die Proben auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. In Abhängigkeit vom untersuchten Gen (HO-1, IL-10, TNF- α) wurde zunächst in jede Vertiefung 1 μ l des entsprechendem *TaqMan® Gene Expression Assay 20x* (siehe Tabelle 2), sowie 10 μ l *TaqMan® 2x Gene Expression Master Mix* pipettiert. Im Anschluss wurden 9 μ l der jeweiligen 1:50 verdünnten cDNA-Proben hinzugegeben. Das Auftragen der Proben erfolgte dabei im Doppelansatz. Für die Negativkontrollen wurden statt der cDNA-Probe 9 μ l Aqua dest. in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte mit Folie versiegelt und kurzzeitig zentrifugiert.

Die Amplifikation und Fluoreszenzmessung erfolgte im Thermocycler. In diesem wurden die Proben zunächst für 2 Minuten auf 50 °C und danach für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend folgten 40 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte dabei in der einminütigen Phase bei 60 °C.

Tabelle 2: TaqMan® Expression Assays (Real Time Quantitative PCR).

Gene	Applied Biosystem™ Assay ID	NCBI Reference Sequence
HO-1	Rn01536933_m1	NM_012580.2
IL-10	Rn00563409_m1	NM_012854.2
TNF- α	Rn01525859_g1	NM_012675.3
GAPDH	Rn01775763_g1	NM_017008.3

2.11.5 Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte als relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta$ -C_t-Methode (siehe Abb. 11). Dieser Methode liegt der C_t-Wert (*Cycle of threshold*) zugrunde, welcher den PCR-Zyklus angibt, in dem das Fluoreszenzsignal erstmalig signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Um methodische Störfaktoren wie beispielsweise unterschiedliche RNA-Mengen in den Proben zu vermeiden, werden die C_t-Werte der Zielgene (HO-1, IL-10 und TNF- α) auf die C_t-Werte des Referenzgens (GAPDH) bezogen und auf diese Weise normiert. Aus den daraus

resultierenden ΔC_t -Werten errechnen sich die $\Delta\Delta C_t$ -Werte als Differenz aus dem ΔC_t -Wert einer Interventionsgruppe (IPC, IPC-IR, IR, HePC oder HePC-IR) und dem ΔC_t -Wert der Kontrollgruppe (SHAM). Die anschließend berechnete Ratio gibt die Expression eines Gens in einer Interventionsgruppe in Relation zur Expression des gleichen Gens in der Kontrollgruppe an [143].

$$(I) \quad \Delta C_t = C_{t\text{Zielgen}} - C_{t\text{Referenzgen}}$$

$$(II) \quad \Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{Zielgen(Interventionsgruppe)}} - \Delta C_{t\text{Zielgen(Kontrollgruppegruppe)}}$$

$$(III) \quad \text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Abb. 11: Relative Quantifizierung der Real Time PCR-Ergebnisse nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

2.12 ELISA zur quantitativen Bestimmung von Zytokinen

Im Rahmen eines IR-Schadens tritt eine systemische, inflammatorische Immunantwort auf. Um diese zu erfassen und zu quantifizieren, wurden die Zytokine IL-10 und TNF- α quantitativ mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) im Serum der Versuchstiere bestimmt.

Bei einem ELISA wird in einem ersten Schritt das Zielantigen an einen *Capture antibody* gebunden, mit dem eine Mikrotiterplatte zuvor beschichtet wurde. In einem zweiten Schritt wird ein weiterer, Enzym-gekoppelter *Detection antibody* hinzugegeben. Dieser bindet ebenfalls am Zielantigen, allerdings an einem anderen Epitop. Durch Zugabe eines enzyspezifischen, chromogenen Substrats zeigt sich im Falle einer Antigen-Antikörper-Bindung ein Farbumschlag. Die Intensität des Farbumschlags wird anschließend photometrisch erfasst. In Relation zu einer parallel erstellten Standardkurve, welche auf der Absorption einer definierten Verdünnungsreihe des Zielantigens beruht, lässt sich so neben einer qualitativen auch eine quantitative Aussage über das Zielantigen treffen.

Für die einzelnen im Folgenden beschriebenen ELISAs wurden jeweils spezifische kommerzielle Sets verwendet, deren Anwendung nach den Vorgaben des Herstellers erfolgte.

Interleukin-10

Um die Serumkonzentration von IL-10 quantitativ zu bestimmen wurde zunächst eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit dem auf 1:250 in *Coating buffer* verdünnten

monoklonalen anti-rat IL-10 Antikörper als *Capture antibody* beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach fünf anschließenden Waschschritten mit jeweils 300 µl *Wash buffer* pro Well wurde die Platte zur Vermeidung unspezifischer Bindungen mit 200 µl *Assay diluent* pro Well geblockt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes, fünfmaliges Waschen und die Titration der Proben, beziehungsweise des Standards, mit 100 µl pro Well. Der Probenüberstand wurde nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur durch fünfmaliges Waschen mit *Wash buffer* entfernt und 100 µl *Working detector* in die einzelnen Wells titriert. Der *Working detector* enthielt den als *Detection antibody* dienenden, 1:250 in *Assay diluent* verdünnten, monoklonalen anti-rat IL-10 Antikörper in biotinylierter Form und das 1:250 in der *Detection antibody*-Lösung verdünnte *Enzyme reagent*. Letzteres enthielt die Streptavidin-Meerrettichperoxidase. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut mit 300 µl *Wash buffer* pro Well gewaschen (7x) und anschließend 100 µl *TMB Substrate solution* pro Well zugegeben. Um die Bindung des Streptavidins an das Biotin zu gewährleisten, wurde die Platte danach für 30 Minuten in dunkler Umgebung inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl *Stop solution* pro Well gestoppt. Dem schloss sich die Messung der Extinktion bei 450 nm und 570 nm im Photometer an.

Tumornekrosefaktor-α

Die zur Bestimmung der Serumkonzentration von TNF-α verwendete 96-Well-Mikrotiterplatte wurde zunächst mit 1:250 in *Coating buffer* verdünntem, aufgereinigtem anti-rat TNF *Capture antibody* beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dem schloss sich das fünfmalige Waschen der Mikrotiterplatte mit 300 µl *Wash buffer* pro Well an. Durch die Titration von 200 µl *Assay diluent* pro Well wurde die Platte zur Verhinderung unspezifischer Bindungen geblockt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte erneut fünf Mal gewaschen. Im Anschluss wurden die Proben, beziehungsweise der Standard, mit 100 µl pro Well titriert, der Probenüberstand nach zweistündiger Inkubationsphase bei Raumtemperatur durch fünfmaliges Waschen mit *Wash buffer* entfernt und pro Well 100 µl 1:250 in *Assay diluent* verdünnter, biotinylierter anti-rat TNF *Detection antibody* hinzugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und fünfmaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl Streptavidin-

Meerrettichperoxidase-haltigem *Enzyme reagent* pro Well. Im Anschluss wurde die Platte für 30 Minuten inkubiert und im nächsten Schritt sieben Mal mit 300 µl *Wash buffer* pro Well gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl *TMB Substrate solution* in jedes Well erfolgte für 30 Minuten eine weitere Inkubation in dunkler Umgebung. Darauf folgend wurde die enzymatische Reaktion der Streptavidin-Meerrettichperoxidase durch Zugabe von 50 µl *Stop solution* pro Well gestoppt und die Extinktion anschließend photometrisch bei 450 nm und 570 nm gemessen.

2.13 Protein-Isolierung und Quantifizierung

Für die Isolierung der Proteine wurde das schockgefrorene Lebergewebe zunächst pulverisiert. Anschließend wurden jeweils 100 mg Lebergewebe mit 1 ml Lysepuffer homogenisiert. Durch das im Lysepuffer enthaltene NP-40 wurde die zytoplasmatische Membran lysiert. Die freigesetzten Proteine wurden in ihrer funktionellen Form durch Dithiothreitol konserviert. Um eine *in vitro*-Spaltung der Proteine zu verhindern, enthielt der Lysepuffer zudem Proteaseinhibitoren (Complete™).

Die homogenisierte Lösung wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und im nächsten Schritt bei 4 °C für 5 Minuten mit 16060 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation demarkierte sich eine obere, flüssige, proteinhaltige Phase. Diese wurde abpipettiert und in ein neues Probengefäß überführt, während das zurückbleibende Pellet verworfen wurde.

Die nun durchgeführte Quantifizierung der Proteine erfolgte anhand der Proteinbestimmung nach Lowry [145, 146]. Diese beruht in einer ersten Reaktion der Bildung von Komplexen zwischen Peptidbindungen und Cu(II)-Ionen. In einer zweiten Reaktion erfolgt dann die Reduktion von Cu(II) Ionen zu Cu(I)-Ionen. Durch die Cu(I)-Ionen wird wiederum das Mo(VI)- und W(VI)-Heteropolysäurehaltige Folin-Ciocalteu Reagenz zu Molybdänblau reduziert, das die Lösung blau färbt. Nach photometrischer Messung der Extinktion einer Standardverdünnungsreihe mit definierten Proteinkonzentrationen ist es möglich, die gemessene Extinktion als Funktion der Proteinkonzentration in einer Standardkurve darzustellen und den molaren Extinktionskoeffizienten zu berechnen. Unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes lässt sich somit die Konzentration einer beliebigen Proteinprobe berechnen.

Für die Standardverdünnungsreihe wurde bovines Serumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 200 µg/ml als Proteinstandard verwendet und wie in Tabelle 3 dargestellt verdünnt.

Tabelle 3: Standardverdünnungsreihe zur Proteinbestimmung nach Lowry.

Probenkonzentration (µg/ml)	Proteinstandard (µl)	Aqua dest. (µl)
0	0	500,0
12,5	31,2	468,7
25,0	62,5	437,5
50,0	125,0	375,0
100,0	250,0	250,0
150,0	375,0	125,0
200,0	500,0	0

Die Proben wurden zunächst mit Aqua dest. 1:100 verdünnt. Anschließend wurden 100 µl jeder Probe und jedes Proteinstandards in neue Probengefäße überführt, 500 µl Lösung 1 hinzugegeben und gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde 50 µl Lösung 2 in alle Probengefäße pipettiert und erneut gevortext. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden sowohl die einzelnen Proben, als auch die jeweiligen Proteinstandards im Doppelansatz auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 750 nm im Photometer gemessen.

2.14 MDA-Assay

Die im Rahmen eines IR-Schadens vermehrt auftretende Freisetzung von ROS löst im betroffenen Gewebe oxidativen Stress aus. Dieser führt unter anderem durch Lipidperoxidation zur Degradation von Zellmembranen und damit zum Zelltod [2, 4, 96, 147]. Als Indikator für diese Reaktion kann die Konzentration von MDA herangezogen werden, welche als Produkt bei der Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entsteht [96, 147, 148].

Die Bestimmung der MDA-Konzentration erfolgte nach der Methode von Mihara und Uchiyama, bei der MDA in einer endogenen Reaktion im sauren Milieu Farbkomplexe mit Thiobarbitursäure (TBA) bildet (siehe Abb. 12), deren Absorption photometrisch gemessen werden kann [149].

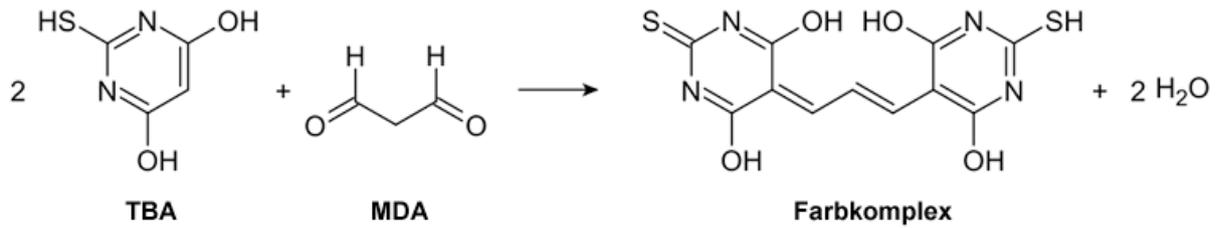


Abb. 12: Reaktion von MDA mit zwei Molekülen TBA zu einem Farbkomplex.

In einem ersten Schritt wurde aus 50 mg der jeweiligen Gewebeprobe und 500 μ l 1,15%iger Salzsäure ein Homogenisat hergestellt. Anschließend wurden 0,25 ml dieses Homogenisats mit 1,5 ml 1%iger Phosphorsäure und 0,5 ml 0,6%iger TBA gevortext und für 45 Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis und Zugabe von 2 ml n-Butanol wurden die Proben mit 1300 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abpipettiert und dessen Absorption bei Wellenlängen von 535 nm und 520 nm im Photometer gemessen. Zur Quantifizierung des MDA wurde die Differenz aus der Absorption beider Wellenlängen herangezogen.

Im letzten Schritt wurde die gemessene Menge MDA zur Normierung auf die in der Probe enthaltene Menge Protein bezogen. Die Proteinbestimmung hierzu wurde nach der Methode von Lowry durchgeführt [145, 146].

Der MDA-Standard wurde aus Malonaldehydbisdimethylacetal (1,1,3,3-Tetramethoxypropan) durch Hydrolyse mit Salzsäure hergestellt. Aus diesem Standard wurde eine Standardreihe mit den Konzentrationen 2,5, 5, 10 und 20 nmol/ml durch Verdünnung mit *Aqua dest.* pipettiert und auf dieser Grundlage die Standardkurve erstellt.

2.15 MPO-Assay

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein in den Granula von neutrophilen Granulozyten enthaltenes Enzym. Nach Aktivierung der Granulozyten wird es durch Exozytose in das umliegende Gewebe freigesetzt. Dort katalysiert es die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chloridionen zu Hypochlorsäure, welches wiederum ein potentes Oxidans darstellt und zum hepatozellulären Schaden vor allem in der späten Reperfusionphase beiträgt [9].

Darüber hinaus konnte eine direkte Proportionalität zwischen der Gewebskonzentration der MPO und der Anzahl der im Gewebe befindlichen neutrophilen Granulozyten gezeigt werden, weshalb sie in dieser Arbeit als

quantitatives Maß für die Akkumulation neutrophiler Granulozyten herangezogen wurde [150, 151].

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Bestimmung der MPO-Aktivität beruht auf der H_2O_2 -abhängigen Oxidation von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Im oxidierten Zustand besitzt das ursprünglich farblose TMB eine bläuliche Farbe, sodass der auftretende Farbumschlag photometrisch gemessen werden kann [151].

Den ersten Schritt stellt die Zellyse und Extraktion der MPO dar. Hierfür wurden 50 mg einer Gewebsprobe der Leber in 500 μl 50 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 6,0) homogenisiert. Zusätzlich enthielt der Puffer 0,5% Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB). Daraufhin wurden die Proben für 30 Sekunden in einem Ultraschallbad sonifiziert und anschließend dreimalig in flüssigem Stickstoff gefroren und wieder aufgetaut. Die Proben wurden dann erneut für 30 Sekunden sonifiziert.

Zur Elimination endogener MPO-Inhibitoren und zur Vermeidung von Interferenzen wurden die Proben nachfolgend für eine Dauer von 2 Stunden bei 60 °C inkubiert [151]. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation mit 4000 x g bei 4 °C für 12 Minuten. Vom entstandenen Überstand wurden 20 μl der einzelnen Proben auf eine Mikrotiterplatte pipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 μl 1,6 mM in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöstem TMB, sowie 70 μl 3,0 mM H_2O_2 , welches in 80 mM Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer (pH 5,4) verdünnt wurde. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Extinktion im Photometer bei einer Wellenlänge von 655 nm.

2.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit der Software GraphPad Prism® V5.0. Zur Prüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der Kolmogorow-Smirnow Test angewendet. In Abhängigkeit von der vorliegenden Verteilung wurde für normalverteilte Daten eine einfaktorische ANOVA gefolgt von einem Bonferroni Post-hoc-Test durchgeführt. Nicht-normalverteilte Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und anschließendem Dunn's Post-hoc-Test analysiert.

Die Ermittlung eines statistischen Unterschieds zwischen einer Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe (SHAM) bei den Real Time PCR-Messwerten erfolgte mittels des Programms REST (*Relative expression software tool*) in der Version 2.0.13.

Normalverteilte Daten sind als Mittelwert \pm SD, nicht-normalverteilte Daten als Median mit der 25./75. und der 10./90. Perzentile angegeben, beziehungsweise graphisch dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Serumaktivität von AST und ALT

Die Serumaktivität der Transaminasen AST und ALT zeigte sich in den drei Gruppen, in welchen die Tiere einer Ischämie ausgesetzt waren (IR, IPC-IR und HePC-IR), im Vergleich zur Kontrollgruppe (SHAM) signifikant erhöht. Eine ischämische Präkonditionierung (IPC-IR) führte zu einer signifikant niedrigeren Aktivität der AST und ALT verglichen mit IR. Eine Vorbehandlung mit Helium (HePC-IR) wies hingegen keine signifikante Veränderung der Transaminasenaktivität im Vergleich mit IR auf. Die Serumaktivität der Transaminasen zeigte nach alleiniger ischämischer Präkonditionierung (IPC) bzw. Helium-Vorbehandlung (HePC) keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe (siehe Abb. 13 und Abb. 14). Die Ergebnisse für die einzelnen Versuchsgruppen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

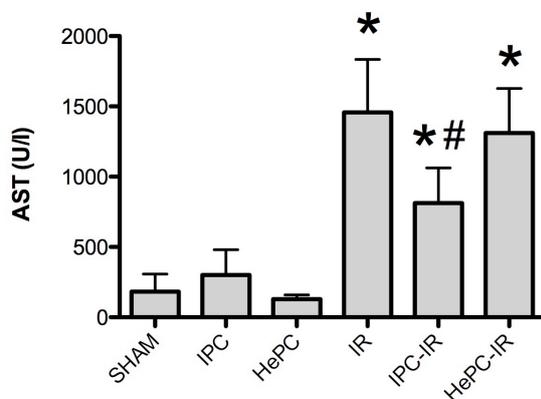


Abb. 13: Serumaktivität der AST in den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

* $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. IR; $n=8$.

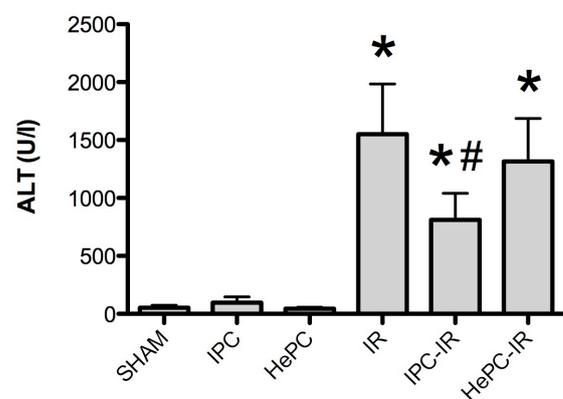


Abb. 14: Serumaktivität der ALT in den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

* $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. IR; $n=8$.

Tabelle 4: Serumaktivität von AST und ALT.

Versuchsgruppe	n	AST (U/l)	ALT (U/l)
SHAM	8	183,3 \pm 43,9	51,9 \pm 6,8
IPC	8	301,6 \pm 63,4	96,1 \pm 18,1
HePC	8	128,5 \pm 11,1	45,0 \pm 4,5

IR	8	1456,8 ± 133,7 *	1550,4 ± 153,4 *
IPC-IR	8	812,6 ± 88,1 * #	810,7 ± 80,9 * #
HePC-IR	8	1310,0 ± 112,4 *	1316,4 ± 130,5 *

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD. *p < 0,05 vs. SHAM; #p < 0,05 vs. IR.

3.2 Genexpression der HO-1

Die relative Genexpression der HO-1 zeigte in allen Versuchsgruppen außer in der HePC-Gruppe eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle (SHAM). Die Genexpression nach einer der Ischämie vorangehenden ischämischen Präkonditionierung (IPC-IR), sowie einer Helium-Vorbehandlung (HePC-IR) unterschied sich gegenüber einer alleinigen Ischämie (IR) nicht signifikant. Die HO-1-Genexpression war nach IR und HePC-IR gegenüber HePC erhöht, nach IR zusätzlich auch gegenüber IPC. Die IPC-IR-Gruppe war hinsichtlich der Genexpression nicht signifikant unterschiedlich verglichen mit den Gruppen IPC und HePC. Während eine alleinige IPC zu einer HO-1-Induktion führte, zeigte sich nach isolierter Helium-Vorbehandlung (HePC) kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur SHAM-Gruppe (siehe Abb. 15). Die Ergebnisse in den einzelnen Versuchsgruppen zeigt Tabelle 5.

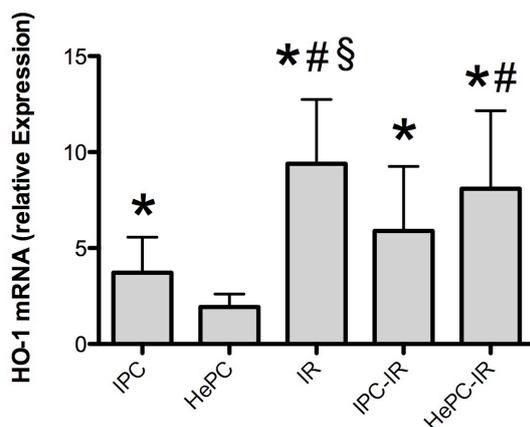


Abb. 15: Relative Genexpression der HO-1 in den einzelnen Versuchsgruppen.

Dargestellt ist die relative Expression vs. SHAM als Mittelwert ± SD. *p < 0,05 vs. SHAM, #p < 0,05 vs. HePC; §p < 0,05 vs. IPC; n= 6.

Tabelle 5: Relative Genexpression der HO-1.

Versuchsgruppe	n	HO-1 (relative Genexpression)
IPC	6	3,7 ± 0,8 *
HePC	6	1,9 ± 0,3
IR	6	9,4 ± 1,4 * #§
IPC-IR	6	5,9 ± 1,4 *
HePC-IR	6	8,1 ± 1,7 * #

Die Daten geben die relative Expression vs. SHAM als Mittelwert ± SD an. *p < 0,05 vs. SHAM, #p < 0,05 vs. HePC; §p < 0,05 vs. IPC.

3.3 Serumkonzentration und Genexpression von Interleukin-10

Die Serumkonzentration von IL-10 war weder zwischen den Behandlungs- und der SHAM-Gruppe, noch zwischen den Behandlungsgruppen untereinander signifikant verschieden (siehe Abb. 16).

Die relative Genexpression von IL-10 in der Leber war nur nach alleiniger Helium-Vorbehandlung (HePC) gegenüber SHAM signifikant erhöht (siehe Abb. 17).

Die Messwerte der einzelnen Versuchsgruppen für die Serumkonzentration und relative Genexpression von IL-10 sind in Tabelle 6 dargestellt.

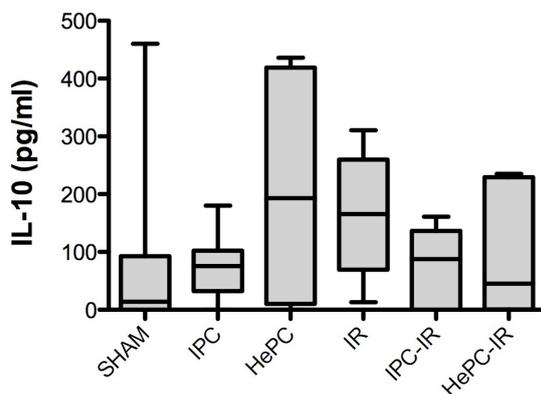


Abb. 16: Serumkonzentration von IL-10 in den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Daten sind angegeben als Median mit der 25./75. Perzentile (Box) und der 10./90. Perzentile (Whiskers). n=6.

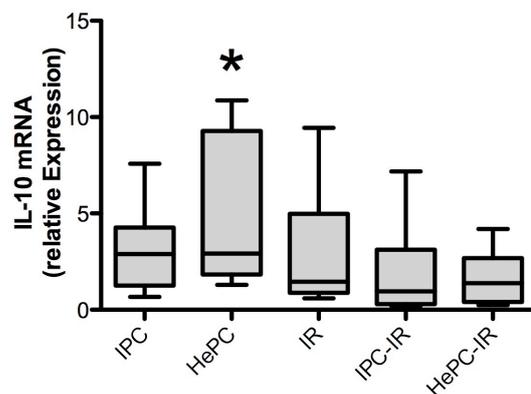


Abb. 17: Relative Genexpression von IL-10 in den einzelnen Versuchsgruppen.

Dargestellt ist die relative Expression vs. SHAM als Median mit der 25./75. Perzentile (Box) und der 10./90. Perzentile (Whiskers). *p < 0,05 vs. SHAM; n=6.

Tabelle 6: Serumkonzentration und relative Genexpression von IL-10.

Versuchsgruppe	n	IL-10 (pg/ml)	IL-10 (relative Genexpression)
SHAM	6	13,9 (0,0 – 0,0 – 92,6 – 460,0)	
IPC	6	75,5 (0,0 – 32,1 – 102,0 – 180,0)	2,9 (0,7 – 1,3 – 4,3 – 7,6)
HePC	6	193,0 (0,0 – 10,0 – 419,0 – 436,0)	2,9 (1,3 – 1,8 – 9,3 – 11,0) *
IR	6	165,0 (13,2 – 69,6 – 260,0 – 311,0)	1,5 (0,6 – 0,9 – 5,0 – 9,4)
IPC-IR	6	87,6 (0,0 – 0,0 – 137,0 – 161,0)	1,0 (0,2 – 0,3 – 3,1 – 7,2)
HePC-IR	6	45,4 (0,0 – 0,6 – 229,0 – 235,0)	1,4 (0,2 – 0,4 – 2,7 – 4,2)

Die Daten sind angegeben als Median (10., 25., 75., 90. Perzentile), bzw. als Median (10., 25., 75., 90. Perzentile) der relativen Expression vs. SHAM. *p < 0,05 vs. SHAM.

3.4 Serumkonzentration und Genexpression von Tumornekrosefaktor- α

Eine alleinige 45-minütige Ischämie (IR) führte gegenüber der Kontrollgruppe (SHAM) zu einer signifikanten Erhöhung der Serumspiegel von TNF- α . In allen weiteren Versuchsgruppen bestand keine signifikante Erhöhung gegenüber SHAM (siehe Abb. 18).

Die relative Genexpression von TNF- α in der Leber war in allen Versuchsgruppen mit Ausnahme von IPC-IR signifikant erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen, in welchen die Tiere einer Ischämie ausgesetzt waren (IR, IPC-IR und HePC-IR), bestand jedoch nicht (siehe Abb. 19).

Tabelle 7 zeigt die jeweiligen Ergebnisse der Serumkonzentration und relativen Genexpression von TNF- α in den einzelnen Versuchsgruppen.

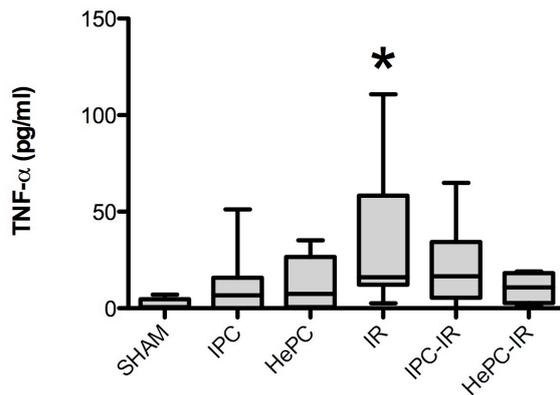


Abb. 18: Serumkonzentration von TNF- α in den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Daten sind angegeben als Median mit der 25./75. Perzentile (Box) und der 10./90. Perzentile (Whiskers). *p < 0,05 vs. SHAM; n=5-8.

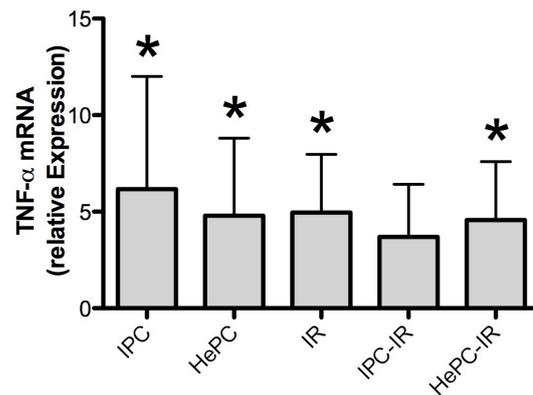


Abb. 19: Relative Genexpression von TNF- α in den einzelnen Versuchsgruppen.

Dargestellt ist die relative Expression vs. SHAM als Mittelwert \pm SD. *p < 0,05 vs. SHAM; n=5-6.

Tabelle 7: Serumkonzentration und relative Genexpression von TNF- α .

Versuchsgruppe	n	TNF- α (pg/ml)	n	TNF- α (relative Genexpression)
SHAM	5	0,6 (0,0 – 0,0 – 4,7 – 7,1)		
IPC	5	6,7 (0,0 – 0,0 – 15,9 – 51,2)	5	6,2 \pm 2,6 *
HePC	7	7,5 (0,0 – 0,5 – 26,6 – 35,2)	6	4,8 \pm 1,6 *
IR	8	16,0 (2,6 – 12,1 – 58,4 – 111,0) *	6	5,0 \pm 1,2 *
IPC-IR	7	16,6 (0,0 – 5,4 – 34,3 – 64,9)	6	3,7 \pm 1,1
HePC-IR	8	10,8 (1,1 – 2,7 – 18,2 – 19,1)	6	4,6 \pm 1,2 *

Die Daten sind angegeben als Median (10., 25., 75., 90. Perzentile), bzw. als Mittelwert \pm SD der relativen Expression vs. SHAM. *p < 0,05 vs. SHAM.

3.5 MDA-Konzentration im Leberparenchym

Die MDA-Konzentration im Leberparenchym wies in keiner der Versuchsgruppen gegenüber der Kontrolle (SHAM) eine signifikante Erhöhung auf (siehe Abb. 20, Tabelle 8). Auch zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied.

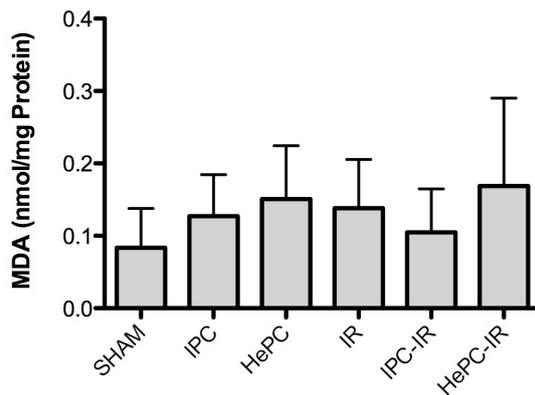


Abb. 20: Konzentration von MDA im Leberparenchym in den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

n=6-8.

Tabelle 8: MDA Konzentration im Leberparenchym.

Versuchsgruppe	n	MDA (nmol/mg Protein)
SHAM	8	0,083 \pm 0,019
IPC	6	0,127 \pm 0,023
HePC	6	0,150 \pm 0,030
IR	8	0,138 \pm 0,024
IPC-IR	8	0,105 \pm 0,021
HePC-IR	8	0,169 \pm 0,043

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

3.6 MPO-Konzentration im Leberparenchym

In den Versuchsgruppen, in denen eine Leberischämie induziert wurde (IR, IPC-IR und HePC-IR), war die MPO-Konzentration im Leberparenchym nur bei IR im Vergleich zu SHAM erhöht (siehe Abb. 21). Ein signifikanter Unterschied gegenüber IPC-IR und He-PC-IR zeigte sich jedoch nicht. Eine alleinige ischämische Präkonditionierung (IPC) bzw. Helium-Vorbehandlung (HePC) führte, verglichen mit der SHAM-Gruppe, ebenfalls nicht zu signifikanten Unterschieden der MPO-Konzentration. Für die einzelnen Versuchsgruppen sind die Ergebnisse in Tabelle 9 aufgeführt.

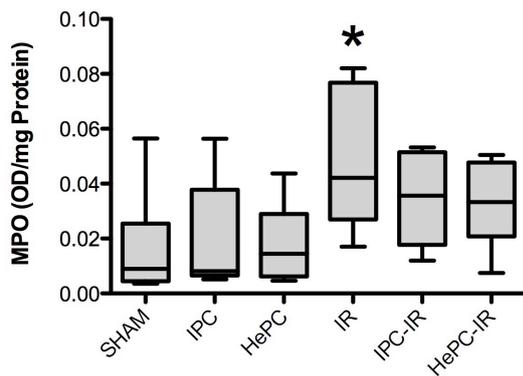


Abb. 21: Konzentration der MPO im Leberparenchym in den einzelnen Versuchsgruppen.

Die Daten sind angegeben als Median mit der 25./75. Perzentile (Box) und der 10./90. Perzentile (Whiskers). *p < 0,05 vs. SHAM; n=6-8.

Tabelle 9: MPO Konzentration im Leberparenchym.

Versuchsgruppe	n	MPO (OD/mg Protein)
SHAM	8	0,009 (0,003 – 0,004 – 0,026 – 0,057)
IPC	6	0,008 (0,005 – 0,007 – 0,038 – 0,056)
HePC	6	0,015 (0,005 – 0,006 – 0,029 – 0,043)
IR	7	0,042 (0,017 – 0,027 – 0,077 – 0,082) *
IPC-IR	8	0,036 (0,012 – 0,018 – 0,052 – 0,053)
HePC-IR	8	0,033 (0,007 – 0,021 – 0,048 – 0,050)

Die Daten sind angegeben als Median (10., 25., 75., 90. Perzentile). *p < 0,05 vs. SHAM.

3.7 Physiologische Daten

Blutdruck

Für den Blutdruck der Versuchstiere wurde ein Normotonus mit systolischen Werten zwischen 120 mmHg und 140 mmHg als Zielbereich angestrebt. Unterschritt der Blutdruck 120 mmHg wurde er durch eine bolusweise Volumengabe angehoben. Bei Messwerten über 140 mmHg wurde zur Blutdrucksenkung die Narkose vertieft. Durch die prompte Reaktion auf Messwerte außerhalb des Zielbereichs traten keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren auf.

Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Tiere lag über die gesamte Versuchsdauer in allen Versuchsgruppen im definierten Normbereich von 36,5–37,5 °C (siehe Tabelle 10). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Tabelle 10: Körpertemperatur der Versuchstiere.

Versuchsgruppe	Körpertemperatur (°C)
SHAM	37,3 ± 0,6
IPC	36,9 ± 0,5
HePC	37,2 ± 0,6
IR	37,1 ± 0,3
IPC-IR	36,9 ± 0,4
HePC-IR	37,2 ± 0,4

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD der gesamten während des Versuchs durchgeführten Messungen.

Arterielle Blutgasanalyse

Der Blut-pH-Wert der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen befand sich im Mittelwert zu beiden Messzeitpunkten (nach Abschluss der Präparation und zu Beginn der Reperfusion) im Normbereich von 7,35-7,45. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bestanden nicht. Ebenfalls zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den Parametern pCO₂ und pO₂, sowie beim HCO₃⁻. Die verschiedenen Messwerte sind detailliert in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Messwerte der arteriellen BGA der Versuchstiere.

Versuchsgruppe	pH(T ₁)	pH(T ₂)	pCO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	pO ₂ (mmHg)
SHAM	7,43 ± 0,07	7,37 ± 0,07	34,6 ± 8,2	23,1 ± 2,9	149,3 ± 36,7
IPC	7,44 ± 0,06	7,36 ± 0,04	28,9 ± 4,4	22,2 ± 2,3	139 ± 20,7
HePC	7,41 ± 0,06	7,35 ± 0,05	37,4 ± 7,9	23,3 ± 1,9	133,4 ± 47,3
IR	7,41 ± 0,04	7,38 ± 0,03	36,6 ± 6,6	23,1 ± 1,5	142,7 ± 50,8
IPC-IR	7,40 ± 0,04	7,37 ± 0,05	36,2 ± 7,2	23,6 ± 1,2	133,2 ± 40,8
HePC-IR	7,41 ± 0,02	7,39 ± 0,03	36,8 ± 6,6	22,7 ± 1,4	129,5 ± 20,0

pH(T₁): pH-Wert nach Abschluss der Präparation; pH(T₂): pH-Wert zu Beginn der Reperfusion. Alle Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD.

4 Diskussion

Ein IR-Schaden der Leber stellt nach wie vor eine große klinische Herausforderung nach Leberteilektresektionen, Lebertransplantationen und einem hämorrhagischen Schock dar [4]. Aufgrund der Relevanz des IR-Schadens für die Morbidität und Mortalität der Patienten wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche protektive chirurgische und pharmakologische Strategien entwickelt, um die Ischämie-Toleranz der Leber zu erhöhen [3, 20, 50, 61, 65, 152]. Pharmakologische, insbesondere präkonditionierende Therapien fanden im Gegensatz zur IPC bisher keinen Eingang in die klinische Routine.

Für eine Helium-Präkonditionierung des Herzens konnten Pagel et al. zeigen, dass durch eine dreimalige Applikation von 70 Vol.-%-Helium für jeweils 5 Minuten, gefolgt von einer ebenfalls 5-minütigen Auswaschphase, das myokardiale Infarktareal von $45 \pm 5\%$ auf $23 \pm 4\%$ des linksventrikulären Risikogebiets reduziert werden konnte [133]. In einer weiteren Arbeit der gleichen Arbeitsgruppe konnte darüber hinaus nachgewiesen werden, dass das Ausmaß der Protektion von der Anzahl der Zyklen abhängt, mit denen die Helium-Präkonditionierung des Herzens erfolgt. Bereits ein einzelner, 5-minütiger Zyklus einer inhalativen Applikation von 70 Vol.-% Helium führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße von $45 \pm 6\%$ auf $35 \pm 6\%$. Durch eine Steigerung auf drei sowie fünf Zyklen konnte eine weitere, signifikante Reduktion der Infarktgröße auf $25 \pm 3\%$ beziehungsweise $20 \pm 2\%$ erreicht werden. Dabei wies jedoch der Infarktgrößenunterschied nach 3 und 5 Zyklen Helium-Präkonditionierung keine Signifikanz mehr auf [153]. Neben einer Abhängigkeit von der Anzahl der durchgeführten Präkonditionierungszyklen weist die Helium-vermittelte Organprotektion zudem eine Konzentrationsabhängigkeit auf. Diese entspricht nach bisheriger Datenlage nicht einer linearen Dosis-Wirkungs-Beziehung, sondern folgt eher der Dynamik eines pharmakologischen On-Off-Phänomens. Während Präkonditionierungen mit 30 Vol.-%, 50 Vol.-% und 70 Vol.-% Helium einen vergleichbaren kardioprotektiven Effekt induzierten, erbrachte eine Präkonditionierung mit 10 Vol.-% Helium keine Reduktion des Infarktareals. Diese Konzentrationsabhängigkeit konnten Huhn et al. in einem Tiermodell für die späte Phase einer Präkonditionierung zeigen [135]. Für die frühe Phase einer Präkonditionierung existieren hierzu keine ausreichenden Daten.

Vor dem Hintergrund der protektiven Effekte in *in vivo*-Modellen des Herzens sowie des fehlenden anästhetischen und toxischen Effekts und der einfachen Applikationsweise auch in komplexen klinischen Szenarien wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich eine Helium-Vorbehandlung ebenfalls protektiv auf einen hepatischen IR-Schaden auswirkt.

Im Folgenden soll zunächst das hier gewählte Tiermodell und anschließend die Methodik sowie die Ergebnisse der Arbeit diskutiert werden.

4.1 Methodik

Das Ausmaß eines IR-Schadens bei gleicher Ischämiedauer unterscheidet sich bei Tieren unterschiedlichen Alters und Gewichts deutlich [154]. Deshalb wurden im gewählten *in vivo* Modell nur Tiere randomisiert den einzelnen Versuchsgruppen zugeteilt, deren Körpergewicht in engen Grenzen lag ($300\text{g} \pm 30\text{g}$). Dadurch konnten einerseits die technischen Schwierigkeiten bei der Präparation sehr junger Tiere und andererseits auch der störende Einfluss einer zunehmenden Lebersteatose bei älteren Tieren umgangen werden [155]. Da die Ischämie-Toleranz der Leber bei weiblichen Tieren in Abhängigkeit vom hormonellen Zyklus alteriert, kamen darüber hinaus ausschließlich männliche Versuchstiere zum Einsatz. Dies trug neben den definierten und identischen Haltungsbedingungen der Tiere zu einer höchstmöglichen Standardisierung der Versuchsbedingungen bei [155, 156].

Die Ischämiedauer in diesem Modell wurde unter dem Gesichtspunkt einer möglichst ausgeprägten Leberschädigung bei gleichzeitig hoher Überlebensrate der Versuchstiere gewählt, um den Einfluss auch schwacher protektiver Effekte auf die Freisetzung von Leberenzymen zeigen zu können. Bei zu geringer Ausprägung des hepatozellulären Schadens, z. B. durch eine zu kurze Ischämiedauer, würden möglicherweise Unterschiede zwischen den Gruppen nicht diskriminiert werden können. In der Literatur sind für *in vivo* Modelle der warmen Leberischämie Ischämiezeiten von 10-120 Minuten beschrieben (siehe Tabelle 12). Es gibt Hinweise darauf, dass eine Ischämiedauer von bis zu 60 Minuten einen reversiblen hepatozellulären Schaden induziert, während längere Ischämiezeiten von 120 bis 180 Minuten zu einer irreversiblen Schädigung der Hepatozyten führen [155]. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde in der vorliegenden Studie eine 45-minütige Ischämiezeit festgelegt. Diese gewährleistete eine hohe Überlebensrate der

Tiere auch nach einer 4-stündigen Reperfusion. Weiterhin war damit die Voraussetzung gegeben, protektive Effekte in potentiell reversibel geschädigtem Lebergewebe zeigen zu können [157, 158]. Die Induktion der Ischämie erfolgte durch Okklusion der zum mittleren und links-lateralen Leberlappen führenden Äste der *Arteria hepatica propria*, der *Vena porta* und des *Ductus choledochus*. Die rechten und kaudalen Leberlappen blieben weiterhin perfundiert, wodurch ein intestinaler Blutstau verhindert und die Anlage eines portosystemischen Shunts somit nicht erforderlich wurde [155]. Bei dieser standardisierten und etablierten Methode lässt sich bei der Ratte eine Ischämie erzeugen, die 70% des gesamten Leberparenchyms ausmacht [97, 99, 100, 155, 157-161].

Für die Wahl der Reperfusiondauer ist die biphasische Manifestation des hepatischen IR-Schadens von Relevanz. Zu unterscheiden ist dabei zwischen einer frühen Phase, die sich innerhalb der ersten 2 bis 4 Stunden entwickelt, und einer späten, 6 bis 48 Stunden nach Beginn der Reperfusion einsetzenden Phase [2-5]. Zur Beurteilung der auftretenden Veränderungen während der frühen Phase des IR-Schadens wurde eine 4-stündige Reperfusion durchgeführt, da das Maximum des Anstiegs der Transaminasen, der MDA und des TNF- α zwischen 4 und 6 Stunden nach Beginn der Reperfusion zu erwarten ist [162].

Tabelle 12: Übersicht über verschiedene Modelle zur Induktion eines hepatischen IR-Schadens.

Autor	Spezies	Ischämie (min)	Reperfusion (h)	Effekt
Yun et al., 2012 [74]	Ratte	90	3, 24	AST/ALT ↓, GSH ↑, MDA ↓, HO-1 ↑ durch IPC
Yun et al., 2010 [162]	Ratte	60	24	ALT ↑, HO-1 mRNA ↑, TNF- α ↑, MDA ↑, GSH ↓, iNOS ↑, COX-2 ↑
Bedirli et al., 2008 [163]	Ratte	45	4	AST/ALT ↓, MDA ↓, hepatischer Blutfluss ↑ durch Beatmung mit Sevofluran
Duenschede et al., 2007 [98]	Ratte	90	1	AST/ALT ↓, ATP ↑, Caspasen-Aktivität ↓ nach α -Liponsäure-Applikation
Fukada et al., 2007 [140]	Maus	90	3	AST/ALT ↓, MDA ↓ nach H ₂ -Inhalation
Schmidt et al., 2007 [131]	Ratte	60	1	AST/ALT ↓, α -GSH ↓, HO-1 ↑, MDA ↓ durch eine Isofluran-Vorbehandlung
Freise et al., 2006 [104]	Ratte	30	0,5, 168,0	AST/ALT ↓, Mikrozirkulation ↑, Leukozytenadhäsion ↓ durch Ramipril-Applikation

Autor	Spezies	Ischämie (min)	Reperfusion (h)	Effekt
Massip-Salcedo et al., 2006 [73]	Ratte	60	6, 24	HO-1 ↑, HSP72 ↑ nach IPC
Ke et al., 2006 [164]	Ratte	30	1, 3, 6, 12, 24	ALT ↓, TNF-α ↓, MPO ↓, IL-10 ↑ durch Vorbehandlung mit hypertoner Kochsalzlösung
Dinant et al., 2006 [165]	Ratte	60	24	AST/ALT ↓, IL-6 ↓, MPO ↓, Apoptose ↓ durch Gabe von rekombinantem IL-10
Koti et al., 2005 [159]	Ratte	45	2	AST/ALT ↓, Mikrozirkulation ↑ und Oxygenierung ↑ in steatotischen Lebern nach IPC
Serafin et al., 2004 [166]	Ratte	60	6	ALT ↓, MDA ↓, IL-10 ↑ durch IPC
Glantzounis et al., 2004 [100]	Kaninchen	60	7	ALT ↓, intrazelluläre Oxygenierung ↑, Mikrozirkulation ↑ durch N-Acetylcystein-Gabe
Schauer et al., 2004 [99]	Ratte	60, 90	2	AST/ALT ↓, intrazelluläre Vakuolen ↓, Peroxisomen ↓ nach Glutathion-Gabe
Toledo-Pereyra et al., 2004 [108]	Maus	90	3	AST ↓, MPO ↓ nach Gabe eines Selectin-Inhibitors
Glanemann et al., 2003 [167]	Ratte	45	1,5	Gallefluß ↑, Mikrozirkulation ↑ durch IPC
Cavalieri et al., 2003 [161]	Ratte	90	0,5	AST/ALT ↓ nach IPC, kein Effekt nach Kupffer-Zell Depletion
Shinoda et al., 2002 [168]	Ratte	30	1, 3, 6	AST/ALT ↓, TNF-a ↓ Apoptose ↓, Mikrozirkulation ↑ durch IPC
Seo et al., 2002 [97]	Ratte	60	5	AST/ALT ↓, Gallefluss ↑ nach Applikation von Ascorbinsäure-
Rudiger et al., 2002 [82]	Maus	75, 120	2	AST/ALT ↓ durch IPC
Koti et al., 2002 [158]	Ratte	45	2	ALT ↓, intrazelluläre Oxygenierung ↑ durch IPC
Peralta et al., 2001 [169]	Ratte	90	1,5	AST/ALT ↓, P-Selectin-Expression ↓, TNF-a ↓, MPO ↓ in Lunge, Magen, Pankreas, Dünndarm und Kolon durch IPC
Kawachi et al., 2000 [157]	Maus	45	5	AST/ALT ↑, weitere ↑ bei eNOS-Defizienz
Peralta et al., 2000 [79]	Ratte	10, 30, 60, 90	-	ATP ↑, Adenin-Nukleoside und cAMP ↓ durch IPC
Howell et al.,	Maus	30	2, 5, 12, 24	AST ↓, intraluminale

Autor	Spezies	Ischämie (min)	Reperfusion (h)	Effekt
2000 [70]				Leukozytenadhäsion ↓ durch IPC
Peralta et al., 1999 [69]	Ratte	90	1,5	AST/ALT ↓, TNF-α ↓ durch IPC
Bilbao et al., 1999 [120]	Maus	40	6	AST/ALT ↓, Nekrosen ↓ durch induzierte Bcl-2 Expression
Yadav et al., 1999 [81]	Maus	90	6	AST/ALT ↓, Caspase-Aktivität ↓, Apoptoserate ↓ durch IPC
Peralta et al., 1999 [76]	Ratte	90	1,5	AST/ALT ↓, Adenosin (extrazellulär) ↑ durch IPC, Effekt verschwindet durch A ₂ -Antagonist
Peralta et. al., 1997 [75]	Ratte	90	1,5	AST/ALT/LDH ↓ nach IPC, kein Effekt nach Inhibition der NO-Synthese
Wanner et al., 1996 [170]	Ratte	20	4	TNF-α ↑, IL-1 ↑, IL-6 ↑
Hardy et al., 1996 [160]	Ratte	45	24	Prothrombinzeit ↓, Überlebensrate nach 24 h ↑ durch IPC

Da bisher nicht bekannt ist, welches Protokoll für einen hepatischen IR-Schaden geeignet ist, wurde für die Helium-Vorbehandlung ein etabliertes kardiales Präkonditionierungsprotokoll angewendet [133, 138, 141, 153, 171]. Dabei wurde dem Atemgas in drei Zyklen jeweils für 5 Minuten 70 Vol.-% Helium beigemischt, gefolgt von einer jeweils 5 minütigen Auswaschphase. Obwohl Huhn et al. auch für geringere Helium-Konzentrationen (30 Vol.-% und 50 Vol.-%) eine vergleichbare Kardioprotektion zeigen konnten, wurde in der vorliegenden Studie mit 70 Vol.-% die höchstmögliche Konzentration gewählt [135]. Da organspezifische Unterschiede bestehen könnten, würde so der Nachweis einer Protektion der Leber auch gelingen, wenn die dafür notwendige Helium-Konzentration höher ist als die niedrigste kardioprotektive Konzentration. Als Positivkontrolle für die Funktionalität des Modells wurde zudem eine IPC durchgeführt. In verschiedenen Modellen konnte durch eine IPC mit Ischämiezeiten zwischen 5 und 10 Minuten sowie einer sich von 5 bis 30 Minuten erstreckenden Reperfusionsdauer ein protektiver Effekt bei einem IR-Schaden erreicht werden (siehe Tabelle 13). Basierend auf den Arbeiten von Peralta et al. und Cavalieri et al., die eine signifikante und reproduzierbare Reduktion eines hepatischen IR-Schadens zeigen konnten, wurde die IPC mit einer 10-minütigen Ischämie gefolgt von 10 Minuten Reperfusion durchgeführt [69, 75, 76, 79, 161, 169].

Tabelle 13: Übersicht über verschiedene Modelle für eine IPC beim hepatischen IR-Schaden.

Autor	Spezies	IPC-Ischämie (min)	IPC-Reperfusion (min)	Effekt
Yun et al., 2012 [74]	Ratte	10	10	AST/ALT ↓, GSH ↑, MDA ↓, HO-1 ↑
Massip-Salcedo et al., 2006 [73]	Ratte	5	10	HO-1 ↑, HSP72 ↑
Koti et al., 2005 [159]	Ratte	5	10	AST/ALT ↓, Mikrozirkulation ↑ und Oxygenierung ↑ in steatotischen Lebern
Serafin et al., 2004 [166]	Ratte	5	10	ALT ↓, MDA ↓, IL-10 ↑ durch IPC
Glanemann et al., 2003 [167]	Ratte	5	30	Gallefluß ↑, Mikrozirkulation ↑
Cavalieri et al., 2003 [161]	Ratte	10	10	AST/ALT ↓, Kein Effekt nach Kupffer-Zell-Depletion
Shinoda et al., 2002 [168]	Ratte	5	5	AST/ALT ↓, TNF-a ↓ Apoptose ↓, Mikrozirkulation ↑ durch IPC
Rudiger et al., 2002 [82]	Maus	10	15	AST/ALT ↓
Koti et al., 2002 [158]	Ratte	5	10	ALT ↓, intrazelluläre Oxygenierung ↑
Peralta et al., 2001 [169]	Ratte	10	10	AST/ALT ↓, P-Selectin-Expression ↓ und TNF-a ↓ in Lunge, Magen, Pankreas, Dünndarm und Kolon
Peralta et al., 2000 [79]	Ratte	10	10	ATP ↑, Adenin-Nukleoside und cAMP ↓
Howell et al., 2000 [70]	Ratte	5	10	AST ↓, intraluminale Leukozytenadhäsion ↓
Peralta et al., 1999 [69]	Ratte	10	10	AST/ALT ↓, TNF-a ↓
Peralta et al., 1999 [76]	Ratte	10	10	AST/ALT ↓, Adenosin (extrazellulär) ↑, Effekt verschwindet durch A ₂ -Antagonist
Yadav et al., 1999 [81]	Maus	10	15	AST/ALT ↓, Caspase-Aktivität ↓, Apoptoserate ↓
Peralta et. al, 1997 [75]	Ratte	10	10	AST/ALT/LDH ↓, kein Effekt nach Inhibition der NO-Synthese
Hardy et al., 1996 [160]	Ratte	5	10	Prothrombinzeit ↓, Überlebensrate nach 24 h ↑

4.2 Ergebnisse

Um das Ausmaß des induzierten IR-Schadens der Leber zu erfassen, wurde die Serumaktivität der Transaminasen ALT und AST herangezogen. Diese beiden mitochondrialen, beziehungsweise zytosolischen Enzyme werden durch die Ruptur der Zellmembran in Folge eines hepatozellulären Schadens ins Plasma freigesetzt. Ihre Serumkonzentration korreliert dabei mit der Schwere der zellulären Schädigung, weshalb AST und ALT etablierte biochemische Marker für einen hepatozellulären Schaden darstellen [172, 173]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für alle IR-Versuchsgruppen (IR, IPC-IR, HePC-IR) einen signifikanten Anstieg der AST und ALT im Vergleich zur SHAM-Gruppe. In Übereinstimmung mit den Arbeiten anderer Autoren konnte ein hepatoprotektiver Effekt für die IPC im Sinne einer Positivkontrolle nachgewiesen werden, sodass die Funktionalität des angewandten *in vivo* Modells bestätigt wurde [69, 75, 76, 79, 161, 169]. Die Vorbehandlung mit Helium hatte hingegen keinen Einfluss auf den hepatischen IR-Schaden. Da die Helium-Präkonditionierung exakt nach demselben Protokoll durchgeführt wurde, welches einen protektiven Effekt im Kontext eines kardialen IR-Schadens zeigte, spricht dies möglicherweise für eine Organspezifität der durch Helium vermittelten Protektion. Es lässt sich zwar nicht ausschließen, dass zur Induktion eines protektiven Effekts in der Leber ein anderes Protokoll für die Helium-Vorbehandlung erforderlich ist, jedoch wurde bereits die höchstmögliche Heliumkonzentration und die für eine Kardioprotektion effektivste Anzahl an Zyklen angewendet.

Eine weitere mögliche Ursache für die fehlende Leberprotektion der Helium-Vorbehandlung könnte eine Verschiebung des Blut-pH-Wertes in den alkalischen Bereich darstellen. Pagel et al. konnten für einen kardialen IR-Schaden zeigen, dass der protektive Effekt von Helium durch eine in der Frühphase der Reperfusion bestehende Alkalose aufgehoben wird [171]. Um eine Veränderung des Blut-pH-Wertes zu erfassen und gegebenenfalls zu korrigieren, erfolgte in der vorliegenden Studie jeweils nach Ende der Präparation und zu Beginn der Reperfusion die Abnahme einer arteriellen BGA. Die Ergebnisse dieser Messungen ergaben, dass sich die Blut-pH-Werte der Tiere in allen Versuchsgruppen, auch während der frühen Phase der Reperfusion, im Normbereich (pH 7,35-7,45) befanden. Somit konnten Verschiebungen im pH-Wert als Ursache der fehlenden Protektion ausgeschlossen werden (siehe Tabelle 11). Eine mögliche Beeinflussung durch die Körpertemperatur der Versuchstiere scheint auf Grundlage der erhobenen Daten ebenfalls

unwahrscheinlich. Diese lag über die gesamte Versuchsdauer in allen Versuchsgruppen im definierten Normbereich von 36,5–37,5 °C (siehe Tabelle 10). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Als ein mögliches Effektormolekül für die Vermittlung eines hepatoprotektiven Effekts wurde in dieser Arbeit die relative Genexpression der HO-1 untersucht. Eine Induktion der HO-1-Expression konnte für eine IPC und das volatile Anästhetikum Isofluran nachgewiesen werden [21, 73, 74, 131]. Als endogenes, zytoprotektives Enzym wird die HO-1 auch durch das Auftreten von oxidativem Stress, beispielsweise im Rahmen eines IR-Schadens, verstärkt exprimiert [14, 74, 162]. Übereinstimmend mit diesen Untersuchungen zeigte sich in der vorliegenden Studie in allen IR-Gruppen (IR, IPC-IR, HePC-IR) eine signifikant erhöhte Expression der HO-1 mRNA verglichen mit SHAM. IPC alleine führte ebenfalls zu einem Anstieg der HO-1 mRNA. Dies könnte in Zusammenschau mit der ebenfalls gesteigerten Expression in der IPC-IR-Gruppe ein Hinweis dafür sein, dass eine Induktion der HO-1 möglicherweise zu dem protektiven Effekt einer IPC beiträgt. Ebenfalls dafür sprechen könnten die Ergebnisse von Yun et al. und Massip-Salcedo et al. In beiden Arbeiten wurde ein Rattenmodell mit 70%iger Leberischämie und einer Ischämiedauer von 90 beziehungsweise 60 Minuten angewandt. Nach 3 beziehungsweise 6 sowie 24 Stunden Reperfusion wurden jeweils die Aktivität der Transaminasen und die Proteinexpression der HO-1 untersucht. Für eine 10 respektive 5 Minuten dauernde IPC mit nachfolgender IR zeigte sich zu jedem Messzeitpunkt eine signifikante Reduktion des IR-Schadens im Vergleich zur IR-Gruppe. Darüber hinaus führte die IPC zu einer Induktion der HO-1 nach 24-stündiger, nicht jedoch nach 3- und 6-stündiger Reperfusion [73, 74]. Die Applikation des HO-1-Inhibitors ZnPP-IX (Zinkprotoporphyrin-IX) hob dabei nach 24 Stunden, nicht aber nach 6 Stunden Reperfusion den protektiven Effekt der IPC auf [73]. Dieser Zeitverlauf der HO-1-Induktion deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren, dass der HO-1-vermittelte protektive Effekt der IPC eine wichtige Rolle im *Late preconditioning* (24 Stunden nach erfolgter IPC) spielt [61-63, 73]. Für den Einfluss von Helium auf die HO-1-Expression finden sich in der Literatur bisher keine Daten. Die durchgeführte Helium-Vorbehandlung (HePC-Gruppe) besaß keine Auswirkung auf die HO-1-Genexpression. Eine nachfolgende Ischämie führte in der HePC-IR-Gruppe in gleichem Maße zu einem Anstieg der HO-1 mRNA, wie nach alleiniger IR. Die fehlende HO-1-Induktion durch Helium könnte darauf hinweisen,

dass Helium keinen Effekt auf dieses wichtige zytoprotektive Enzym besitzt und ein weiterer Grund für die ausbleibende Hepatoprotektion sein.

Um das Ausmaß des oxidativen Stresses zu erfassen, der durch die vermehrte Freisetzung von ROS im Rahmen eines IR-Schadens auftritt, wurde die MDA-Konzentration im Lebergewebe bestimmt [2, 4]. MDA stellt ein Produkt aus der Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren dar und kann daher als Indikator für den Ablauf dieser Reaktion herangezogen werden [96, 148]. In Folge einer hepatischen Ischämie zeigt sich ein signifikanter Anstieg der MDA-Konzentration im Leberparenchym. Für verschiedene Zeitpunkte, beginnend mit einer Stunde bis hin zu 24 Stunden nach Ischämie, konnte ein Anstieg der MDA-Konzentration nachgewiesen werden [74, 96, 97, 140]. Des Weiteren konnten Yun et al. zeigen, dass eine der Ischämie vorangehende IPC die MDA-Konzentration signifikant senken kann [74]. Dies lässt sich anhand der Ergebnisse in dieser Arbeit nicht nachvollziehen. Insbesondere zeigten die MDA-Konzentrationen in den IR-Gruppen im Vergleich zur SHAM-Gruppe keinen signifikanten Anstieg. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz zwischen diesen und den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen könnte in der geringen Spezifität des verwendeten MDA-Assays liegen [147, 174, 175]. Wie in vielen anderen, häufig angewandten Assays, beruht auch das hier verwendete Assay auf der Reaktion von MDA mit TBA [147, 174, 175]. Diese Reaktion führt zur Ausbildung einer rötlichen Farbe, deren Absorption photometrisch erfasst wird [147, 149]. Da TBA jedoch auch mit verschiedenen anderen Oxidationsprodukten, den sogenannten *Thiobarbituric acid reactive substance* (TBARS), und unter anderem auch mit Biliverdin Bindungen eingeht, kann es zu einer Beeinflussung der Messwerte kommen [147, 174, 175]. Zusätzliche Interferenzen könnten darüber hinaus durch eine weitere Oxidation während der Probenanalyse und insbesondere bei der notwendigen Erhitzung der Proben auftreten [175]. Ebenfalls führt bereits das Auftreten einer geringen Hämolyse zu einem Anstieg der gemessenen MDA-Konzentration [147, 174]. Diese Ursachen erschweren gemeinsam mit der Vielzahl verschiedener Assays, die zur Bestimmung der MDA-Konzentration Anwendung finden, den Vergleich zwischen verschiedenen Studien, beziehungsweise Daten aus verschiedenen Laboren.

Zusätzlich zur vermehrten Freisetzung von ROS führt die Aktivierung der Kupferzellen in der frühen Phase des IR-Schadens zu einer gesteigerten Synthese und Sekretion von verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen, unter anderem TNF-

α [2, 4, 8]. Der Zeitverlauf des TNF- α -Anstiegs im Serum wurde von Yun et al. in einem Rattenmodell mit einer partiellen Leberischämie von 60-minütiger Dauer untersucht. Dabei zeigte sich, dass es unmittelbar nach Einsetzen der Reperfusion zu einem steilen, sich kontinuierlich fortsetzenden Anstieg der Serumkonzentration von TNF- α kommt, welcher nach 4 bis 8 Stunden sein Maximum erreicht [162]. Übereinstimmend dazu zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Anstieg der TNF- α -Serumkonzentration in der IR-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe (SHAM). Im Gegensatz dazu waren weder nach einer Helium-Vorbehandlung noch nach einer IPC mit und ohne nachfolgende Ischämie die Serumkonzentrationen von TNF- α erhöht. Dies bestätigt einerseits die von Peralta et al. beschriebene signifikante Senkung der TNF- α -Serumkonzentration durch eine IPC [69]. Andererseits deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Helium einen günstigen Einfluss auf die Freisetzung des inflammatorischen TNF- α besitzt. Dieser zuvor unbekannte Effekt könnte das protektive Potential von Helium widerspiegeln.

Die Expression der TNF- α mRNA in der Leber war in allen Interventionsgruppen mit Ausnahme der IPC-IR-Gruppe erhöht. Dieser Effekt der IPC deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren, die eine signifikante Reduktion der TNF- α mRNA durch eine IPC beschreiben [168, 176]. Eine mögliche Erklärung dafür könnte darin liegen, dass sich der Zellkern nach der IPC in einem „refraktären“ Zustand befindet, in dem seine ribosomalen Kapazitäten erschöpft sind. Daher erfolgt auf eine zweite, kurz darauf eintretende Ischämie nur eine inadäquate mRNA-Synthese [168]. Diese Hypothese könnte die fehlende Induktion der TNF- α -Expression in der IPC-IR-Gruppe gegenüber einer alleinigen IPC erklären. Im Gegensatz zur IPC führte eine Helium-Vorbehandlung mit nachfolgender Ischämie zu keiner Reduktion der TNF- α -mRNA Expression. Damit zeigt sich eine Divergenz zwischen der TNF- α -Serumkonzentration und der hepatischen TNF- α mRNA Expression nach einer Helium-Vorbehandlung, die sich auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht hinreichend erklären lässt. Um dies näher zu untersuchen, wären weitere Versuchsreihen mit verschiedenen Messzeitpunkten, sowie verschiedenen Ischämie- und Reperfusionszeiten erforderlich.

Als Folge der in der Reperfusionsphase auftretenden Inflammation erfolgt eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Diese invadieren entlang eines sich entwickelnden Chemokin-Gradienten in das Leberparenchym. Durch Exozytose ihrer intrazellulären Granula werden unter anderem Proteasen, ROS und MPO freigesetzt,

die durch ihre proteolytische, beziehungsweise oxidative Aktivität zur Ausbildung eines IR-Schadens beitragen [2, 4, 9]. Um die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten im Leberparenchym zu bestimmen, wurde die Aktivität der MPO im Leberparenchym gemessen, für die eine Korrelation mit der Granulozytenzahl gezeigt wurde [150]. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass die MPO-Aktivität nach einer IR im Vergleich zu SHAM signifikant ansteigt. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die nach warmer Ischämie der Leber bereits ab einer Reperfusionsdauer von 90 Minuten einen deutlicher Anstieg der MPO-Aktivität zeigen konnten [71, 72, 108, 169]. Für alle weiteren Versuchsgruppen konnte keine Erhöhung der MPO-Aktivität gegenüber SHAM detektiert werden. Dies bestätigt einerseits die Ergebnisse der Arbeiten von Jin et al. und Yuan et al., dass eine IPC von 10 Minuten die MPO-Aktivität nach einer 90-minütigen Ischämie inhibiert [71, 72]. Andererseits spricht der fehlende Anstieg der MPO-Aktivität in der HePC-IR Gruppe für einen immunmodulatorischen Effekt des Heliums, der zu einer Hemmung der Granulozyteninfiltration führt. Allerdings spiegelt sich dies nicht in einer Reduktion des hepatozellulären Schadens wider. Ursächlich dafür könnte sein, dass der durch neutrophile Granulozyten induzierte Zellschaden vor allem in der Spätphase der Reperfusion (nach 6 bis 48 Stunden) zum Tragen kommt [2-4]. Dementsprechend wäre der in dieser Arbeit gewählte Messzeitpunkt (4 Stunden nach Reperfusion) zu früh, um eine Abschwächung des Leberzellschadens durch die verminderte Granulozyteninfiltration festzustellen.

Neben dem auftretenden inflammatorischen Geschehen kommt es im Rahmen eines IR-Schadens auch zur verstärkten Synthese anti-inflammatorischer Zytokine, beispielsweise IL-10. IL-10 scheint eine wichtige Rolle für das Ausmaß eines hepatischen IR-Schadens zu spielen, da die vorherige Gabe eines IL-10-Antikörpers eine signifikante Zunahme des IR-Schadens bedingt [165, 166]. Darüber hinaus kann durch eine pharmakologische Induktion der IL-10-Synthese und die Applikation von rekombinantem IL-10 eine Hepatoprotektion erzielt werden [164-166, 177].

IL-10 vermittelt dabei seine anti-inflammatorische Wirkung unter anderem über eine Inhibition der Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 [165]. Darüber hinaus hemmt IL-10 die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Lebergewebe [164, 177]. In mehreren Publikationen konnte in einem Modell mit 70%iger warmer Leberischämie ein signifikanter Anstieg der IL-10-Konzentration im Serum gezeigt werden [164-166]. Einen solchen konnten Serafin et al. ebenfalls für

eine 5 Minuten dauernde IPC vor 60-minütiger Ischämie nachweisen [166]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nur nach einer Helium-Vorbehandlung ohne nachfolgende Ischämie eine signifikant gesteigerte Expression der IL-10 mRNA-Expression, was ein weiterer Hinweis auf einen potentiell anti-inflammatorischen Effekt des Heliums sein könnte. Allerdings wies die Serumkonzentration von IL-10 in keiner der Versuchsgruppen einen signifikanten Unterschied zur SHAM-Gruppe auf. Eine mögliche Ursache für die fehlende Kongruenz zwischen diesen Ergebnissen und denen anderer Autoren könnte in der Wahl des Messzeitpunktes liegen. Für den Zeitverlauf der Serumkonzentration von IL-10 beschreiben Ke et al. ein Maximum nach 6 Stunden Reperfusion. Zum gleichen Zeitpunkt bestand auch eine maximale mRNA-Expression von IL-10. Die Ischämiedauer betrug 30 Minuten [164]. Für eine Ischämiedauer von 60 Minuten hingegen zeigten Dinant et al. eine maximale Serumkonzentration bereits nach 30-minütiger Reperfusion [165], sodass der Zeitpunkt der maximalen Serumkonzentration und mRNA-Expression von IL-10 für die in dieser Arbeit gewählte Ischämiedauer unklar bleibt. Daher wäre es denkbar, dass der Messzeitpunkt von 4 Stunden nach Reperfusion einen relevanten Anstieg der Serumkonzentration von IL-10 noch nicht oder nicht mehr erfasst. Eine weitere Einschränkung der Vergleichbarkeit dieser Daten ergibt sich zusätzlich aus der unterschiedlichen Dauer der IPC und IR [166].

4.3 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich aus dieser Arbeit das Fazit ziehen, dass eine Helium-Vorbehandlung mit 70 Vol.-% nach 4-stündiger Reperfusion zwar keinen signifikanten Einfluss auf einen hepatischen IR-Schaden, gemessen anhand der Freisetzung der Enzyme AST und ALT, besitzt, jedoch einen immunmodulatorischen Effekt aufweist. Der bereits bekannte protektive Effekt einer IPC sowie eine IPC-vermittelte HO-1-Induktion konnten in dieser Arbeit bestätigt werden.

Das Ausbleiben einer Hepatoprotektion durch eine Vorbehandlung mit Helium steht im Gegensatz zum nachgewiesenen kardio-, neuro- und endothelprotektiven Effekt, und könnte für das Bestehen einer Organspezifität der Helium-Präkonditionierung sprechen. Ein möglicher Anhaltspunkt dafür findet sich bei Betrachtung der bisher bekannten Mechanismen, über die Helium seinen protektiven Effekt vermittelt,

allerdings nicht. Diese beruhen, soweit beschrieben, auf ubiquitär exprimierten Proteinen und Enzymen.

Andererseits wäre es auch möglich, dass sich die Anzahl und Dauer der Präkonditionierungszyklen, die möglicherweise für eine Induktion eines hepatoprotektiven Effekts nötig sind, von denen anderer Organsysteme unterscheidet.

Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein möglicher protektiver Effekt einer Helium-Vorbehandlung in der Leber, im Gegensatz zu einer Präkonditionierung im Herzen, zu gering ausgeprägt ist und so unter der Nachweisgrenze des vorliegenden Studiendesigns liegt. Dafür spricht insbesondere, dass durch eine Helium-Vorbehandlung eine Immunmodulation in Form einer Induktion der IL-10 mRNA-Expression, einer gesenkten TNF- α -Serumkonzentration und einer reduzierten MPO-Aktivität erreicht werden konnte. Um dies näher zu untersuchen, wären weitere Versuchsreihen, in denen man die Ischämie- und Reperfusionsdauer variiert, notwendig. Allerdings erscheint eine solch aufwendige Untersuchung mit entsprechend großen Versuchsgruppen vor dem Hintergrund des Nachweises eines nur geringen protektiven Effekts und der nur geringen Aussicht auf eine klinische Anwendung auch aus tierschutzrechtlichen Gründen nicht gerechtfertigt.

5 Zusammenfassung

Ein IR-Schaden der Leber kann bei Lebertransplantationen und Leberteilresektionen sowie traumatischen Leberläsionen und einem Schock auftreten. Wegen seiner Relevanz für die Morbidität und Mortalität der Patienten wurden zahlreiche Strategien entwickelt, um die Ischämie-Toleranz der Leber zu erhöhen.

Ausgehend vom bekannten kardioprotektiven Effekt des Heliums wurde ein *in vivo*-Modell etabliert, um einen möglichen protektiven Effekt einer Helium-Vorbehandlung bei einem warmen IR-Schaden der Leber zu untersuchen. Dazu wurden männliche Wistar-Ratten sechs Versuchsgruppen zugeteilt. Bei den SHAM-Tieren wurde lediglich eine Scheinoperation durchgeführt. Ebenso in der IPC und HePC Gruppe, jedoch zusätzlich mit einer 10 Minuten dauernder IPC bzw. einer dreimal fünfminütigen Vorbehandlung mit 70 Vol.-% inhalativem Helium. In der IR Gruppe erfolgte eine 45 Minuten dauernde 70%-ige Leberischämie, der eine 240-minütige Reperfusionphase folgte. In der IPC-IR Gruppe war der IR eine IPC und in der HePC-IR Gruppe eine Helium-Vorbehandlung vorangestellt. Am Versuchsende wurden Lebergewebe und Serum asserviert. Zur Quantifizierung des hepatozellulären Schadens wurde die Serumaktivität der ALT und AST herangezogen. Als potentiell effektives Organ eines möglichen protektiven Effekts wurde die Genexpression der HO-1 in der Leber untersucht. Als Maß für den oxidativen Stress wurde die MDA-Konzentration und für die Akkumulation neutrophiler Granulozyten die MPO-Aktivität im Leberparenchym bestimmt. Die Immunantwort wurde anhand der Serumkonzentrationen von IL-10 und TNF- α sowie deren Genexpression in der Leber erfasst.

Durch eine Vorbehandlung mit Helium konnte der hepatozelluläre Schaden nicht reduziert werden, jedoch konnte die TNF- α -Serumkonzentration gesenkt und die MPO-Aktivität, als Maß für die Akkumulation neutrophiler Granulozyten, vermindert werden. Ebenfalls zeigte sich eine Induktion der IL-10 mRNA-Expression. Durch eine IPC konnte eine Induktion der HO-1, eine Verminderung der systemischen Inflammation und in Folge eine Reduktion des IR-Schadens erreicht werden.

Wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass eine Vorbehandlung mit inhalativem Helium zwar keinen protektiven Effekt auf einen hepatischen IR-Schaden besitzt, jedoch zu einer Immunmodulation führt. Daneben konnte der vorbekannte protektive Effekt einer IPC bestätigt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Bahde, R. and H.U. Spiegel, *Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside*. Br J Surg, 2010. **97**(10): p. 1461-75.
2. Teoh, N.C. and G.C. Farrell, *Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection*. J Gastroenterol Hepatol, 2003. **18**(8): p. 891-902.
3. Banga, N.R., et al., *Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver*. Br J Surg, 2005. **92**(5): p. 528-38.
4. Klune, J.R. and A. Tsung, *Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements*. Surg Clin North Am, 2010. **90**(4): p. 665-77.
5. Ikeda, T., et al., *Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats*. Hepatology, 1992. **16**(2): p. 454-61.
6. Ramalho, F.S., et al., *Hepatic microcirculatory failure*. Acta Cir Bras, 2006. **21 Suppl 1**: p. 48-53.
7. Jaeschke, H., *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26 Suppl 1**: p. 173-9.
8. Selzner, N., et al., *Protective strategies against ischemic injury of the liver*. Gastroenterology, 2003. **125**(3): p. 917-36.
9. Lentsch, A.B., et al., *Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury*. Hepatology, 2000. **32**(2): p. 169-73.
10. Serracino-Inglott, F., N.A. Habib, and R.T. Mathie, *Hepatic ischemia-reperfusion injury*. Am J Surg, 2001. **181**(2): p. 160-6.
11. Pannen, B.H., et al., *Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat*. Hepatology, 1998. **27**(3): p. 755-64.
12. Tsuchihashi, S., C. Fondevila, and J.W. Kupiec-Weglinski, *Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury*. Ann Transplant, 2004. **9**(1): p. 84-7.
13. Gozzelino, R., V. Jeney, and M.P. Soares, *Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2010. **50**: p. 323-54.
14. Soares, M.P. and F.H. Bach, *Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential*. Trends Mol Med, 2009. **15**(2): p. 50-8.
15. Bauer, M. and I. Bauer, *Heme oxygenase-1: redox regulation and role in the hepatic response to oxidative stress*. Antioxid Redox Signal, 2002. **4**(5): p. 749-58.
16. Bauer, I., et al., *Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver*. Hepatology, 1998. **27**(3): p. 829-38.
17. Bauer, I., et al., *Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat*. J Hepatol, 2000. **33**(3): p. 395-406.
18. Richards, J.A., S.J. Wigmore, and L.R. Devey, *Heme oxygenase system in hepatic ischemia-reperfusion injury*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(48): p. 6068-78.
19. Katori, M., et al., *A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cytoprotection with heme oxygenase system*. Transpl Immunol, 2002. **9**(2-4): p. 227-33.
20. Fondevila, C., R.W. Busuttil, and J.W. Kupiec-Weglinski, *Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look*. Exp Mol Pathol, 2003. **74**(2): p. 86-93.

21. Hoetzel, A., et al., *Mechanism of hepatic heme oxygenase-1 induction by isoflurane*. *Anesthesiology*, 2006. **104**(1): p. 101-9.
22. Otterbein, L.E., et al., *Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(8): p. 449-55.
23. Nakagami, T., et al., *A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1158**(2): p. 189-93.
24. Vachharajani, T.J., et al., *Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(5): p. H1613-7.
25. Balla, G., et al., *Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(25): p. 18148-53.
26. Berberat, P.O., et al., *Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury*. *FASEB J*, 2003. **17**(12): p. 1724-6.
27. Bauer, I. and B.H. Pannen, *Bench-to-bedside review: Carbon monoxide--from mitochondrial poisoning to therapeutic use*. *Crit Care*, 2009. **13**(4): p. 220.
28. Jarnagin, W.R., et al., *Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade*. *Ann Surg*, 2002. **236**(4): p. 397-406; discussion 406-7.
29. Yamamoto, J., et al., *Perioperative blood transfusion promotes recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy*. *Surgery*, 1994. **115**(3): p. 303-9.
30. Stephenson, K.R., et al., *Perioperative blood transfusions are associated with decreased time to recurrence and decreased survival after resection of colorectal liver metastases*. *Ann Surg*, 1988. **208**(6): p. 679-87.
31. Jones, R.M., C.E. Moulton, and K.J. Hardy, *Central venous pressure and its effect on blood loss during liver resection*. *Br J Surg*, 1998. **85**(8): p. 1058-60.
32. DeMatteo, R.P., et al., *Recent advances in hepatic resection*. *Semin Surg Oncol*, 2000. **19**(2): p. 200-7.
33. Melendez, J.A., et al., *Perioperative outcomes of major hepatic resections under low central venous pressure anesthesia: blood loss, blood transfusion, and the risk of postoperative renal dysfunction*. *J Am Coll Surg*, 1998. **187**(6): p. 620-5.
34. Cunningham, J.D., et al., *One hundred consecutive hepatic resections. Blood loss, transfusion, and operative technique*. *Arch Surg*, 1994. **129**(10): p. 1050-6.
35. Pringle, J.H., V. *Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma*. *Ann Surg*, 1908. **48**(4): p. 541-9.
36. van Gulik, T.M., et al., *Vascular occlusion techniques during liver resection*. *Dig Surg*, 2007. **24**(4): p. 274-81.
37. Lau, W.Y., E.C. Lai, and S.H. Lau, *Methods of vascular control technique during liver resection: a comprehensive review*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010. **9**(5): p. 473-81.
38. Castaing, D., O.J. Garden, and H. Bismuth, *Segmental liver resection using ultrasound-guided selective portal venous occlusion*. *Ann Surg*, 1989. **210**(1): p. 20-3.
39. Man, K., et al., *Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study*. *Ann Surg*, 1997. **226**(6): p. 704-11; discussion 711-3.

40. Capussotti, L., et al., *Continuous versus intermittent portal triad clamping during hepatectomy in cirrhosis. Results of a prospective, randomized clinical trial.* Hepatogastroenterology, 2003. **50**(52): p. 1073-7.
41. Chouker, A., et al., *Effects of Pringle manoeuvre and ischaemic preconditioning on haemodynamic stability in patients undergoing elective hepatectomy: a randomized trial.* Br J Anaesth, 2004. **93**(2): p. 204-11.
42. Behrns, K.E., et al., *Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection.* J Gastrointest Surg, 1998. **2**(3): p. 292-8.
43. Huguet, C., et al., *Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit?* Surgery, 1992. **111**(3): p. 251-9.
44. Huguet, C., A. Gavelli, and S. Bona, *Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour.* J Am Coll Surg, 1994. **178**(5): p. 454-8.
45. Badger, S.A., et al., *Management of liver trauma.* World J Surg, 2009. **33**(12): p. 2522-37.
46. Bernardo, C.G., *Treatment of Liver Trauma: Operative or Conservative Management.* Gastroenterology research, 2010. **3**(1): p. 9.
47. Di Saverio, S., et al., *Predictive factors of morbidity and mortality in grade IV and V liver trauma undergoing perihepatic packing: Single institution 14 years experience at European trauma centre.* Injury, 2012.
48. David Richardson, J., et al., *Evolution in the management of hepatic trauma: a 25-year perspective.* Ann Surg, 2000. **232**(3): p. 324-30.
49. Leppaniemi, A.K., et al., *Severe hepatic trauma: nonoperative management, definitive repair, or damage control surgery?* World J Surg, 2011. **35**(12): p. 2643-9.
50. Perdriet, G.A., et al., *Major hepatic trauma: warm ischemic tolerance of the liver after hemorrhagic shock.* J Surg Res, 2006. **136**(1): p. 70-7.
51. Kozar, R.A., et al., *Western Trauma Association/critical decisions in trauma: operative management of adult blunt hepatic trauma.* J Trauma, 2011. **71**(1): p. 1-5.
52. Strassburg, C.P., *Gastrointestinal disorders of the critically ill. Shock liver.* Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(3): p. 369-81.
53. Peitzman, A.B., et al., *Hemorrhagic shock.* Curr Probl Surg, 1995. **32**(11): p. 925-1002.
54. Paxian, M., et al., *Recovery of hepatocellular ATP and "pericentral apoptosis" after hemorrhage and resuscitation.* FASEB J, 2003. **17**(9): p. 993-1002.
55. Fouche, Y., R. Sikorski, and R.P. Dutton, *Changing paradigms in surgical resuscitation.* Crit Care Med, 2010. **38**(9 Suppl): p. S411-20.
56. Rosen, H.R., et al., *Significance of early aminotransferase elevation after liver transplantation.* Transplantation, 1998. **65**(1): p. 68-72.
57. Strasberg, S.M., et al., *Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation.* Hepatology, 1994. **20**(4 Pt 1): p. 829-38.
58. Briceno, J. and R. Ciria, *Early graft dysfunction after liver transplantation.* Transplant Proc, 2010. **42**(2): p. 631-3.
59. Howard, T.K., et al., *The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient.* Transplantation, 1990. **49**(1): p. 103-7.
60. DeOliveira, M.L., R. Graf, and P.A. Clavien, *Ischemic preconditioning: promises from the laboratory to patients--sustained or disillusioned?* Am J Transplant, 2008. **8**(3): p. 489-91.
61. Carini, R. and E. Albano, *Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning.* Gastroenterology, 2003. **125**(5): p. 1480-91.

62. Korthuis, R., et al., *Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning*. Pathophysiology, 1998. **5**(1): p. 35-48.
63. Jenkins, D.P., G.F. Baxter, and D.M. Yellon, *The pathophysiology of ischaemic preconditioning*. Pharmacol Res, 1995. **31**(3-4): p. 219-24.
64. Kanoria, S., et al., *Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury*. Br J Surg, 2006. **93**(6): p. 762-8.
65. Gurusamy, K.S., H.D. Gonzalez, and B.R. Davidson, *Current protective strategies in liver surgery*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(48): p. 6098-103.
66. Ates, E., et al., *Renal protection by brief liver ischemia in rats*. Transplantation, 2002. **74**(9): p. 1247-51.
67. Tapuria, N., et al., *Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury--a review*. J Surg Res, 2008. **150**(2): p. 304-30.
68. Arai, M., R.G. Thurman, and J.J. Lemasters, *Involvement of Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells in ischemic preconditioning to rat livers stored for transplantation*. Transplant Proc, 1999. **31**(1-2): p. 425-7.
69. Peralta, C., et al., *Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat*. Hepatology, 1999. **30**(6): p. 1481-9.
70. Howell, J.G., et al., *Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions*. Transplantation, 2000. **69**(2): p. 300-3.
71. Jin, L.M., et al., *Ischemic preconditioning attenuates morphological and biochemical changes in hepatic ischemia/reperfusion in rats*. Pathobiology, 2010. **77**(3): p. 136-46.
72. Yuan, G.J., et al., *Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats*. World J Gastroenterol, 2005. **11**(12): p. 1825-8.
73. Massip-Salcedo, M., et al., *Heat shock proteins and mitogen-activated protein kinases in steatotic livers undergoing ischemia-reperfusion: some answers*. Am J Pathol, 2006. **168**(5): p. 1474-85.
74. Yun, N., S.H. Kim, and S.M. Lee, *Differential consequences of protein kinase C activation during early and late hepatic ischemic preconditioning*. J Physiol Sci, 2012. **62**(3): p. 199-209.
75. Peralta, C., et al., *Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine*. Hepatology, 1997. **25**(4): p. 934-7.
76. Peralta, C., et al., *The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors*. Hepatology, 1999. **29**(1): p. 126-32.
77. Cuong, D.V., et al., *Nitric oxide-cGMP-protein kinase G signaling pathway induces anoxic preconditioning through activation of ATP-sensitive K⁺ channels in rat hearts*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(5): p. H1808-17.
78. Billiar, T.R., et al., *Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes*. Am J Physiol, 1992. **262**(4 Pt 1): p. C1077-82.
79. Peralta, C., et al., *Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(1): p. G163-71.

80. Javadov, S.A., et al., *Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart*. J Physiol, 2003. **549**(Pt 2): p. 513-24.
81. Yadav, S.S., et al., *Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway*. Hepatology, 1999. **30**(5): p. 1223-31.
82. Rudiger, H.A., et al., *Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver*. Ann Surg, 2002. **235**(3): p. 400-7.
83. Hausenloy, D.J., et al., *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning?* Cardiovasc Res, 2002. **55**(3): p. 534-43.
84. Petrowsky, H., et al., *A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection*. Ann Surg, 2006. **244**(6): p. 921-8; discussion 928-30.
85. Smyrniotis, V., et al., *Ischemic preconditioning versus intermittent vascular occlusion in liver resections performed under selective vascular exclusion: a prospective randomized study*. Am J Surg, 2006. **192**(5): p. 669-74.
86. Belghiti, J., et al., *Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study*. Ann Surg, 1999. **229**(3): p. 369-75.
87. van Wagenveld, B.A., et al., *Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs*. Ann Surg, 1999. **229**(3): p. 376-84.
88. Man, K., et al., *Tolerance of the liver to intermittent pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors*. Arch Surg, 1999. **134**(5): p. 533-9.
89. Gurusamy, K.S., et al., *Methods of vascular occlusion for elective liver resections*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(4): p. CD006409.
90. Sun, H.Y., et al., *Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. Apoptosis, 2006. **11**(9): p. 1583-93.
91. Zhao, Z.Q. and J. Vinten-Johansen, *Postconditioning: reduction of reperfusion-induced injury*. Cardiovasc Res, 2006. **70**(2): p. 200-11.
92. Kaur, S., A.S. Jaggi, and N. Singh, *Molecular aspects of ischaemic postconditioning*. Fundam Clin Pharmacol, 2009. **23**(5): p. 521-36.
93. Santos, C.H., et al., *Postconditioning effect in the hepatic ischemia and reperfusion in rats*. Acta Cir Bras, 2010. **25**(2): p. 163-8.
94. Wang, N., et al., *Effects of ischemic postconditioning on reperfusion injury in rat liver grafts after orthotopic liver transplantation*. Hepatol Res, 2009. **39**(4): p. 382-90.
95. Wheeler, M.D., et al., *Comparison of the effect of adenoviral delivery of three superoxide dismutase genes against hepatic ischemia-reperfusion injury*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(18): p. 2167-77.
96. Giakoustidis, D., et al., *Severe total hepatic ischemia and reperfusion: relationship between very high alpha-tocopherol uptake and lipid peroxidation*. Free Radic Res, 2001. **35**(2): p. 103-9.
97. Seo, M.Y. and S.M. Lee, *Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats*. J Hepatol, 2002. **36**(1): p. 72-7.

98. Duenschede, F., et al., *Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by alpha-lipoic acid*. Shock, 2007. **27**(6): p. 644-51.
99. Schauer, R.J., et al., *Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia*. Ann Surg, 2004. **239**(2): p. 220-31.
100. Glantzounis, G.K., et al., *Continuous infusion of N-acetylcysteine reduces liver warm ischaemia-reperfusion injury*. Br J Surg, 2004. **91**(10): p. 1330-9.
101. Yabe, Y., et al., *Targeted delivery and improved therapeutic potential of catalase by chemical modification: combination with superoxide dismutase derivatives*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(2): p. 1176-84.
102. Allan, P.F., B.B. Bloom, and S. Wanek, *Reversal of hemorrhagic shock-associated hepatic ischemia-reperfusion injury with N-acetylcysteine*. Mil Med, 2011. **176**(3): p. 332-5.
103. Hanazaki, K., et al., *Prostaglandin E1 reduces thromboxane A2 in hepatic ischemia-reperfusion*. Hepatogastroenterology, 2000. **47**(33): p. 807-11.
104. Freise, H., D. Palmes, and H.U. Spiegel, *Inhibition of angiotensin-converting enzyme reduces rat liver reperfusion injury via bradykinin-2-receptor*. J Surg Res, 2006. **134**(2): p. 231-7.
105. Uhlmann, D., et al., *Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury*. Eur Surg Res, 1998. **30**(3): p. 175-84.
106. Pannen, B.H., et al., *Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats*. J Clin Invest, 1998. **102**(6): p. 1220-8.
107. Arias-Diaz, J., et al., *Both tacrolimus and sirolimus decrease Th1/Th2 ratio, and increase regulatory T lymphocytes in the liver after ischemia/reperfusion*. Lab Invest, 2009. **89**(4): p. 433-45.
108. Toledo-Pereyra, L.H., et al., *Selectin inhibition modulates Akt/MAPK signaling and chemokine expression after liver ischemia-reperfusion*. J Invest Surg, 2004. **17**(6): p. 303-13.
109. Takeyoshi, I., et al., *The effect of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor in extended liver resection with ischemia in dogs*. J Surg Res, 2001. **100**(1): p. 25-31.
110. Harada, N., K. Okajima, and S. Kushimoto, *Gabexate mesilate, a synthetic protease inhibitor, reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by inhibiting leukocyte activation*. Crit Care Med, 1999. **27**(9): p. 1958-64.
111. Shito, M., et al., *Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat*. Transplantation, 1997. **63**(1): p. 143-8.
112. Glanemann, M., et al., *Steroid administration before partial hepatectomy with temporary inflow occlusion does not influence cyclin D1 and Ki-67 related liver regeneration*. Langenbecks Arch Surg, 2004. **389**(5): p. 380-6.
113. Yoshidome, H., et al., *Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB*. Hepatology, 1999. **30**(1): p. 203-8.
114. Aldrighetti, L., et al., *Impact of preoperative steroids administration on ischemia-reperfusion injury and systemic responses in liver surgery: a prospective randomized study*. Liver Transpl, 2006. **12**(6): p. 941-9.
115. Kim, Y.I., et al., *Evaluation of a protease inhibitor in the prevention of ischemia and reperfusion injury in hepatectomy under intermittent Pringle maneuver*. Am J Surg, 2006. **191**(1): p. 72-6.

116. Kim, Y.I., et al., *Successful intermittent application of the Pringle maneuver for 30 minutes during human hepatectomy: a clinical randomized study with use of a protease inhibitor*. Hepatogastroenterology, 2007. **54**(79): p. 2055-60.
117. Cursio, R., et al., *A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis*. FASEB J, 1999. **13**(2): p. 253-61.
118. Nakajima, H., et al., *Blockade of the Fas/Fas ligand interaction suppresses hepatocyte apoptosis in ischemia-reperfusion rat liver*. Apoptosis, 2008. **13**(8): p. 1013-21.
119. Selzner, M., et al., *Transgenic mice overexpressing human Bcl-2 are resistant to hepatic ischemia and reperfusion*. J Hepatol, 2002. **36**(2): p. 218-25.
120. Bilbao, G., et al., *Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene*. Ann Surg, 1999. **230**(2): p. 185-93.
121. Cason, B.A., et al., *Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits*. Anesthesiology, 1997. **87**(5): p. 1182-90.
122. Mullenheim, J., et al., *Isoflurane preconditions myocardium against infarction via release of free radicals*. Anesthesiology, 2002. **96**(4): p. 934-40.
123. Belhomme, D., et al., *Evidence for preconditioning by isoflurane in coronary artery bypass graft surgery*. Circulation, 1999. **100**(19 Suppl): p. II340-4.
124. De Hert, S.G., et al., *Cardioprotective properties of sevoflurane in patients undergoing coronary surgery with cardiopulmonary bypass are related to the modalities of its administration*. Anesthesiology, 2004. **101**(2): p. 299-310.
125. Toller, W.G., et al., *Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs*. Anesthesiology, 1999. **91**(5): p. 1437-46.
126. Tanaka, K., et al., *Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics*. Anesthesiology, 2004. **100**(3): p. 707-21.
127. Minguet, G., J. Joris, and M. Lamy, *Preconditioning and protection against ischaemia-reperfusion in non-cardiac organs: a place for volatile anaesthetics?* Eur J Anaesthesiol, 2007. **24**(9): p. 733-45.
128. Krolikowski, J.G., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition enhances isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion: the role of mitochondrial KATP channels*. Anesth Analg, 2005. **101**(6): p. 1590-6.
129. Krolikowski, J.G., et al., *Role of Erk1/2, p70s6K, and eNOS in isoflurane-induced cardioprotection during early reperfusion in vivo*. Can J Anaesth, 2006. **53**(2): p. 174-82.
130. Chiari, P.C., et al., *Role of endothelial nitric oxide synthase as a trigger and mediator of isoflurane-induced delayed preconditioning in rabbit myocardium*. Anesthesiology, 2005. **103**(1): p. 74-83.
131. Schmidt, R., et al., *Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury*. Ann Surg, 2007. **245**(6): p. 931-42.
132. Beck-Schimmer, B., et al., *A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic*. Ann Surg, 2008. **248**(6): p. 909-18.
133. Pagel, P.S., et al., *Noble gases without anesthetic properties protect myocardium against infarction by activating prosurvival signaling kinases and inhibiting mitochondrial permeability transition in vivo*. Anesth Analg, 2007. **105**(3): p. 562-9.

134. Weber, N.C., et al., *The noble gas xenon induces pharmacological preconditioning in the rat heart in vivo via induction of PKC-epsilon and p38 MAPK*. Br J Pharmacol, 2005. **144**(1): p. 123-32.
135. Huhn, R., et al., *Helium-induced late preconditioning in the rat heart in vivo*. Br J Anaesth, 2009. **102**(5): p. 614-9.
136. Pan, Y., et al., *Heliox and oxygen reduce infarct volume in a rat model of focal ischemia*. Exp Neurol, 2007. **205**(2): p. 587-90.
137. Smit, K.F., et al., *Helium induces preconditioning in human endothelium in vivo*. Anesthesiology, 2013. **118**(1): p. 95-104.
138. Pagel, P.S., et al., *The mechanism of helium-induced preconditioning: a direct role for nitric oxide in rabbits*. Anesth Analg, 2008. **107**(3): p. 762-8.
139. Pagel, P.S., *Cardioprotection by noble gases*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2010. **24**(1): p. 143-63.
140. Fukuda, K., et al., *Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **361**(3): p. 670-4.
141. Heinen, A., et al., *Helium-induced preconditioning in young and old rat heart: impact of mitochondrial Ca(2+) -sensitive potassium channel activation*. Anesthesiology, 2008. **109**(5): p. 830-6.
142. Martins, P.N. and P. Neuhaus, *Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat*. Liver Int, 2007. **27**(3): p. 384-92.
143. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
144. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
145. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
146. Hartree, E.F., *Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response*. Anal Biochem, 1972. **48**(2): p. 422-7.
147. Knight, J.A., R.K. Pieper, and L. McClellan, *Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation*. Clin Chem, 1988. **34**(12): p. 2433-8.
148. Pedrajas, J.R., J. Peinado, and J. Lopez-Barea, *Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers*. Chem Biol Interact, 1995. **98**(3): p. 267-82.
149. Mihara, M. and M. Uchiyama, *Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test*. Anal Biochem, 1978. **86**(1): p. 271-8.
150. Komatsu, H., et al., *Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals*. Am J Physiol, 1992. **262**(4 Pt 1): p. G669-76.
151. Schierwagen, C., A.C. Bylund-Fellenius, and C. Lundberg, *Improved method for quantification of tissue PMN accumulation measured by myeloperoxidase activity*. J Pharmacol Methods, 1990. **23**(3): p. 179-86.
152. Dogan, S. and M. Aslan, *Hepatic ischemia-reperfusion injury and therapeutic strategies to alleviate cellular damage*. Hepatol Res, 2011. **41**(2): p. 103-17.
153. Pagel, P.S., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase or the apoptotic protein p53 lowers the threshold of helium cardioprotection in vivo: the role of mitochondrial permeability transition*. Anesth Analg, 2008. **107**(3): p. 769-75.

154. Yahanda, A.M., C.N. Paidas, and M.G. Clemens, *Susceptibility of hepatic microcirculation to reperfusion injury: a comparison of adult and suckling rats*. J Pediatr Surg, 1990. **25**(2): p. 208-13.
155. Mendes-Braz, M., et al., *The current state of knowledge of hepatic ischemia-reperfusion injury based on its study in experimental models*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 298657.
156. Gasbarrini, A., et al., *Gender affects reperfusion injury in rat liver*. Dig Dis Sci, 2001. **46**(6): p. 1305-12.
157. Kawachi, S., et al., *Nitric oxide synthase and postischemic liver injury*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(3): p. 851-4.
158. Koti, R.S., et al., *The relationship of hepatic tissue oxygenation with nitric oxide metabolism in ischemic preconditioning of the liver*. FASEB J, 2002. **16**(12): p. 1654-6.
159. Koti, R.S., et al., *Effect of ischaemic preconditioning on hepatic oxygenation, microcirculation and function in a rat model of moderate hepatic steatosis*. Clin Sci (Lond), 2005. **108**(1): p. 55-63.
160. Hardy, K.J., D.N. McClure, and S. Subwongcharoen, *Ischaemic preconditioning of the liver: a preliminary study*. Aust N Z J Surg, 1996. **66**(10): p. 707-10.
161. Cavalieri, B., et al., *Ischaemic preconditioning modulates the activity of Kupffer cells during in vivo reperfusion injury of rat liver*. Cell Biochem Funct, 2003. **21**(4): p. 299-305.
162. Yun, N., H.A. Eum, and S.M. Lee, *Protective role of heme oxygenase-1 against liver damage caused by hepatic ischemia and reperfusion in rats*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(10): p. 1503-12.
163. Bedirli, N., et al., *Hepatic energy metabolism and the differential protective effects of sevoflurane and isoflurane anesthesia in a rat hepatic ischemia-reperfusion injury model*. Anesth Analg, 2008. **106**(3): p. 830-7, table of contents.
164. Ke, Q.H., et al., *Pretreatment of hypertonic saline can increase endogenous interleukin 10 release to attenuate hepatic ischemia reperfusion injury*. Dig Dis Sci, 2006. **51**(12): p. 2257-63.
165. Dinant, S., et al., *IL-10 attenuates hepatic I/R injury and promotes hepatocyte proliferation*. J Surg Res, 2007. **141**(2): p. 176-82.
166. Serafin, A., et al., *Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion*. Hepatology, 2004. **39**(3): p. 688-98.
167. Glanemann, M., et al., *Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state*. J Hepatol, 2003. **38**(1): p. 59-66.
168. Shinoda, M., et al., *Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning*. J Gastroenterol Hepatol, 2002. **17**(11): p. 1211-9.
169. Peralta, C., et al., *Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat*. Hepatology, 2001. **33**(1): p. 100-13.
170. Wanner, G.A., et al., *Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation*. Shock, 1996. **5**(1): p. 34-40.

171. Pagel, P.S. and J.G. Krolikowski, *Transient metabolic alkalosis during early reperfusion abolishes helium preconditioning against myocardial infarction: restoration of cardioprotection by cyclosporin A in rabbits*. *Anesth Analg*, 2009. **108**(4): p. 1076-82.
172. Lu, S., et al., *Markers of allograft viability in the rat. Relationship between transplantation viability and liver function in the isolated perfused liver*. *Transplantation*, 1987. **44**(4): p. 562-9.
173. Lemasters, J.J., et al., *Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in the isolated, perfused rat liver*. *J Cell Biol*, 1983. **97**(3): p. 778-86.
174. Lykkesfeldt, J., *Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking*. *Clin Chim Acta*, 2007. **380**(1-2): p. 50-8.
175. Del Rio, D., A.J. Stewart, and N. Pellegrini, *A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005. **15**(4): p. 316-28.
176. Funaki, H., et al., *Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver*. *Transplantation*, 2002. **74**(4): p. 551-6.
177. Oreopoulos, G.D., et al., *Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: a role for interleukin 10*. *Hepatology*, 2004. **40**(1): p. 211-20.

7 Anhang

Bescheinigung der Teilnahme an der Versuchstierkunde



Universitätsklinikum Düsseldorf
 Tierversuchsanlage
 Zentrale Einrichtung
 Geschäftsf. Direktorin: Dr. Annemarie Treiber

Übungsschein

Gabriel Plitzko
 Karolingerstraße 53
 geb. am: 30.11.1984
 in: Bonn

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 Nager); 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 03.02.2009


 Dr. A. Treiber

8 Danksagungen

Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen für die Bereitstellung des Laborplatzes und der benötigten Materialien, sowie die Finanzierung der Versuche.

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Inge Bauer für die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung, die mir gebotenen Rahmenbedingungen im Institut und die Hilfestellungen, welche ich zu jedem Zeitpunkt der Arbeit erhielt.

Dr. med. Sebastian Braun für die geduldigen Instruktionen zur Instrumentierung der Tiere, die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und die enge Betreuung während des gesamten Projekts.

Antje Nebert, Yvonne Grüber und Jan Schulz für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und den molekularbiologischen Analysen.

Sylvia Plitzko und **Dr. rer. nat. Winfried Plitzko**, ohne deren uneingeschränkte Unterstützung mein gesamter Bildungsweg nicht möglich gewesen wäre.

9 Eidesstattliche Versicherung

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

06.01.2014, Gabriel Andreas Plitzko