

**Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

**Reduktion des Ischämie- und Reperfusionsschadens der isoliert perfun-
dierten Rattenleber nach kalter Ischämie durch TNF-alpha-Inhibition
mittels Etanercept**

Dissertation

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

vorgelegt von
Milena Fey
2019

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Stefan A. Topp

Zweitgutachterin: PD Dr. med. Rüdiger Wessalowski

Meinen geliebten Eltern
Ulrike und Hubertus

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2012 bis Juli 2018 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie der Universitätsklinik Düsseldorf angefertigt.

Zusammenfassung

Titel: Reduktion des Ischämie- und Reperfusionsschadens der isoliert perfundierten Rattenleber nach kalter Ischämie durch TNF-alpha-Inhibition mittels Etanercept

von: Milena Fey

Die Lebertransplantation gilt als Therapie der Wahl bei terminalen Lebererkrankungen, wie zum Beispiel der Leberzirrhose. Dabei kommt dem Leberschaden durch Ischämie und Reperfusion eine besondere Rolle bei der Entstehung einer intrahepatischen Cholestase nach Lebertransplantation zu.

Forschungen haben gezeigt, dass unter anderem TNF α an der Entstehung des Ischämie- und Reperfusionsschadens beteiligt ist. Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der TNF α -Hemmung auf das Ausmaß des Leberschadens nach Ischämie und Reperfusion. Das Ergebnis dieser Arbeit soll zum besseren Verständnis der postoperativen Cholestase beitragen und neue Behandlungsstrategien zur Reduktion des cholestatischen Leberschadens nach Lebertransplantation darstellen.

Zur Induktion eines Ischämie- und Reperfusionsschadens wurde das isoliert perfundierende Rattenlebermodell mit einer kalten Ischämiezeit von 24 Stunden sowie einer Reperusionszeit von 180 Minuten verwendet. Die zu untersuchende Intervention war die Präkonditionierung mittels Etanercept. Als Nachweis eines Leberschadens wurde die Serumkonzentration der Transaminasen GOT, GPT und AP sowie der Gallenfluss und die Galleproduktion bestimmt.

Diese Arbeit zeigt, dass eine Präkonditionierung mit Etanercept keinen signifikanten Einfluss auf den postischämischen Reperfusionsschaden, den Gallenfluss und die Galleproduktion hat.

Abstract

titel: reduction of ischemia and reperfusion injury of the isolated perfused rat liver after cold ischemia by TNF-alpha-inhibition with Etanercept

from: Milena Fey

The liver transplant is the preferred treatment option of patients suffering from terminal liver diseases such as liver cirrhosis. The ischemia and reperfusion injury plays a significant role in the development of intrahepatic cholestasis.

Research has shown that TNF α is a causal factor in the development of ischemia and reperfusion injury. This scientific thesis deals with the influence of TNF α -inhibition on reduction of liver damage. The result of this work should improve understanding the postoperative cholestasis and represent therapeutic strategies for reducing the cholestatic liver damage after liver transplant.

The isolated perfused rat liver model with a cold ischemic period of 24 hours and a perfusion period of 180 minutes was used to induce an ischemia reperfusion injury. A preconditioning with Etanercept was the intervention to be investigated. The serum concentration of hepatic transaminasen GOT, GPT and AP plus bile flow and bile production are used to evaluate the liver damage.

This work shows that there is no significant influence to preconditioning with Etanercept on the postischemic reperfusion injury, the bile flow and the bile production.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>Apoptosis - Inducing - Factor</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	alkalische Phosphatase
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor 1,</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bad-Protein	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i> - Protein
Bcl 2	B-cell-lymphoma-Protein 2
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i> - Protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cytochrom-c-Oxidase
DED	<i>Death-effector-domain</i>
DISC	<i>Death-inducing-signaling-complex</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
eNOS	<i>Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase</i>
ET	Endothelin
FADD	<i>Fas-associating-protein-with-death-domain</i>
Fe ²⁺	vollständig reduziertes Eisen
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
Hb	Hämoglobin
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
HTK	Hämatokrit
ICAM-1	<i>intercellular-adhesion-molecule-1</i>
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6

iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRS	Ischämie-und Reperfusionsschaden
IκB	<i>Inhibitor of NFκB</i>
kg	Kilogramm
KH	Krebs-Henseleit-Puffer
LDH	Laktatdehydrogenase
LTX	Lebertransplantation
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteasen
Na⁺-H⁺-Austauscher	Natrium-Protonen-Austauscher
Na⁺-HCO₃⁻-Kotransporter	Natrium-Bikarbonat-Kotransporter
Na⁺/Ca²⁺-Austauscher	Natrium-Kalzium-Austauscher
Na⁺/K⁺-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NaCl	Natriumchlorid
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NFκB	<i>Nuclear-factor-'kappa-light-chain-enhancer'-of-activated-B-cells</i> (ubiquitärer Transkriptionsfaktor)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
O₂⁻	Superoxid-Anionen
pCO₂	Kohlendioxidpartialdruck
PNF	<i>primary-non-function</i>
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2
TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
UW	<i>Universal Wisconsin</i>
c-IAP1	<i>Cellular-inhibitors-of-apoptosis-protein-1</i>
c-IAP2	<i>Cellular-inhibitors-of-apoptosis-protein-2</i>
TACE	<i>TNFα-converting-enzyme</i>

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	BEDEUTUNG DES ISCHÄMIE- UND REPERFUSIONSSCHADENS FÜR DIE LEBERTRANSPLANTATION	1
1.2	PATHOPHYSIOLOGIE DES ISCHÄMIE- UND REPERFUSIONSSCHADENS DER LEBER	3
1.2.1	ISCHÄMIE	3
1.2.2	REPERFUSION	5
1.3	APOPTOSE	9
1.3.1	DER EXTRINSISCHE SIGNALWEG (APOPTOSE TYP I)	10
1.3.2	DER INTRINSISCHE SIGNALWEG (APOPTOSE TYP II)	11
1.4	DIE ROLLE VON TNFALPHA FÜR DEN ISCHÄMIE- UND REPERFUSIONSSCHADEN	13
1.5	TNFALPHA-INHIBITOR ETANERCEPT	15
2	ZIELE DER ARBEIT	16
2.1	STAND DER FORSCHUNG	16
2.2	FRAGESTELLUNG	16
3	MATERIAL	17
3.1	TIERE	17
3.2	CHEMIKALIEN	17
3.3	MEDIKAMENTE	18
3.4	GERÄTE	18
3.5	OPERATIONSINSTRUMENTARIUM	19
3.6	VERBRAUCHSMATERIALIEN	19
4	METHODEN	20
4.1	VORBEMERKUNG	20
4.2	TIERVERSUCHE	20
4.2.1	GENEHMIGUNG DER TIERVERSUCHE	20
4.2.2	VERSUCHSGRUPPEN	20
4.2.3	ANÄSTHESIE	21
4.2.4	PRÄKONDITION	21
4.2.5	VERSUCHSABLAUF	21
4.2.6	HEPATEKTOMIE	21
4.2.7	REPERFUSION	23
4.3	ANALYTISCHE METHODEN	26
4.3.1	VITALPARAMETER	26
4.3.2	LABORCHEMISCHE ANALYSEN	26
4.4	STATISTISCHE DATENANALYSE	28
5	ERGEBNISSE	29
5.1	ETABLIERUNG DES MODELLS DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER	29
5.1.1	OP	29
5.1.2	KONSERVIERUNG	29
5.1.3	REPERFUSION	30
5.2	LABORCHEMISCHE ANALYSEN	31
5.2.1	KLEINES BLUTBILD	31
5.2.2	BLUTGASANALYSE	35
5.2.3	LEBERWERTE	38
5.3	PHYSIKALISCHE MESSPARAMETER	42

5.3.1	PORTALE FLUSSRATE	42
5.3.2	GALLE-PRODUKTION	43
6	DISKUSSION	44
6.1	DISKUSSION DER METHODEN	44
6.1.1	IPRL	44
6.1.2	OPERATION	45
6.1.3	ISCHÄMIE	48
6.1.4	KONSERVIERUNG	48
6.1.5	REPERFUSION	49
6.1.6	PRÄKONDITION	50
6.2	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	52
7	FAZIT	57
8	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	58
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	73
10	ANHANG	74

1 Einleitung

1.1 Bedeutung des Ischämie- und Reperfusionsschadens für die Lebertransplantation

Die weltweit erste humane Lebertransplantation (LTX) wurde 1963 von Thomas Earl Starzl in Denver, USA, durchgeführt. Erstmals erfolgreich gelang sie ihm 1967 (Starzl et al. 1968). Damals noch als experimentelles Therapiekonzept bezeichnet, wurde die Lebertransplantation an nur wenigen Zentren durchgeführt.

Durch die Weiterentwicklung der chirurgischen Operationstechnik, Innovationen im Bereich der immunsuppressiven Therapie, Verbesserungen der Konservierung sowie die Entwicklung standardisierter Verfahren zur Empfänger- und Spenderselektion ist die Zahl erfolgreicher Lebertransplantationen weltweit angestiegen. So lag die Fünf-Jahres-Überlebensrate vor 1985 bei ca. 21% und stieg bis 1999 auf 71% an (Frühauf et al. 2002). Heute liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit von der Grunderkrankung bei über 80%, weshalb die Lebertransplantation heute die Therapie der Wahl terminaler Lebererkrankungen ist (Wolff und Weihrauch 2014, 655).

Seit Juni 1983 ist die LTX durch die *Consensus Development Conference of the National Health* in den USA zur Behandlung terminaler Lebererkrankungen zugelassen ("National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Liver2 Transplantation-June 20–23, 1983" 1984).

Grundsätzlich ist eine mit konservativen Therapien nicht mehr behandelbare terminale Lebererkrankung eine Indikation für eine LTX (Lautz et al. 1989). Mit 58% stellt die Leberzirrhose die häufigste Indikation zur LTX in Europa dar (Strassburg und Manns 2009). Vor allem die virusassoziierte und die ethyltoxische Leberzirrhose sind hier beispielhaft zu nennen. Gefolgt von Lebertumoren in 13% der Fälle. Weitere Indikationen für eine LTX sind andere cholestatische Lebererkrankungen (11%), das akute Leberversagen (9%) und metabolische Erkrankungen (6%) (Strassburg and Manns 2009). Die häufigste Indikation für eine LTX im Kindesalter ist die Gallengangsatresie in 40% der Fälle (Rodeck und Zimmer 2013, 509).

Der Erfolg einer LTX ist unter anderem abhängig von der Grunderkrankung und dem Allgemeinzustand des Empfängers sowie der Histokompatibilität und der Nachsorge (Moore et al. 2005) (Feng et al. 2006).

Im postoperativen Verlauf kann es in Abhängigkeit von der Grunderkrankung und der Qualität des Spenderorgans zu Komplikationen kommen. Dabei werden Komplikationen nach ihrem zeitlichen Auftreten in Früh- bzw. Spätkomplikaionen unterteilt (Ganschow 2007).

Das primäre Transplantatversagen, auch *primary-non-function* (PNF) genannt, ist als typische Frühkomplikaion zu nennen. Bei guter Organqualität tritt eine PNF in nur 0,9-7,7% der Fälle auf (Chen and Xu 2014) (Riemann et al. 2007, 2:1580) (Riemann et al. 2007, p.1580). Sie zeigt sich in einem exzessiven Anstieg der Transaminasen, dem Verlust der Synthese- und Exkretionsfunktion, einer Hyperbilirubinämie sowie in einer progredienten Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Empfängers innerhalb der ersten postoperativen Tage (Riemann et al. 2007, 2:1580).

Risikofaktoren der PNF sind Spenderorgane von schlechter Qualität (hohes Spenderalter, Steatose und lange Intensivzeiten) sowie schwere Erkrankungen der Empfänger. Pathogenetisch ursächlich für die PNF ist ein ausgeprägter Ischämie- und Reperfusionsschaden (IRS) (Strasberg et al. 1994).

Zwar stellt die PNF eine seltene Komplikaion dar. Sie ist aber mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Tritt sie ein, ist eine Retransplantation notwendig. Andernfalls ist Letalität die Folge (Riemann et al. 2007:p.1580).

Um neue Behandlungsstrategien zur Prävention und Therapie der PNF zu entwickeln, ist das Verständnis der Pathomechanismen notwendig.

Der IRS ist daher Gegenstand aktueller Forschung, die zur Verbesserung der Transplantatfunktion und der Prognose der Lebertransplantation beitragen soll.

1.2 Pathophysiologie des Ischämie- und Reperfusionsschadens der Leber

Der IRS resultiert aus der durch Organentnahme bedingten Ischämie und der durch Wiederaufnahme der Organperfusion bedingten Reperfusion. Man unterscheidet die kalte von der warmen Ischämie. Als kalte Ischämiezeit bezeichnet man die Phase der Organkonservierung bei 4°C nach Explantation der Leber. Darauf folgt die Phase der warmen Ischämie während der Implantation bis zur Freigabe der Organreperfusion. (Peralta et al. 2013).

Das Ausmaß der Zellschädigung durch Ischämie und Reperfusion ist zellspezifisch. Die warme Ischämie schädigt überwiegend *Hepatozyten* (Vollmar et al. 1994). Die kalte Ischämie hingegen schädigt vorwiegend nicht parenchymatöse Zellen, wie zum Beispiel Sinusendothelzellen (Russo et al. 2012). Die Wiederaufnahme der Organperfusion potenziert den Schaden, der durch die Ischämie initiiert wurde (Serracino-Inglott, Habib, und Mathie 2001). Dabei scheinen sich Hepatozyten durch Reperfusion vom Ischämieschaden zu erholen, wohingegen Sinusendothelzellen besonders sensibel auf die Reperfusion reagieren.

1.2.1 Ischämie

Ischämie bezeichnet den Zustand der unterbrochenen Blutversorgung von Geweben oder Organen. Die Folge ist eine nutritive Unterversorgung (Pschyrembel 2014, 1042).

Die Ischämie der Leber äußert sich vor allem in hypoxiebedingten Zellschäden. Betroffen sind überwiegend solche Zellen, die eine nur geringe glykolytische Kapazität besitzen. Da Hepatozyten nicht in der Lage sind, ihren Energiehaushalt allein durch anaerobe Glykolyse aufrechtzuerhalten, sind sie besonders gefährdet (Eigler et al. 2013, 173). Der hypoxische Zellschaden, der im Folgenden näher erläutert wird, zeigt sich in Veränderungen des Energiehaushaltes und des Ionenhaushaltes sowie in der Aktivierung von Hydrolasen und Permeabilitätsveränderungen der Mitochondrien (H. de Groot 2005).

Veränderung im Energiehaushalt

Hypoxie schränkt die Funktion der *Cytochrom-c-Oxidase* (COX) ein. Die Folge ist eine eingeschränkte Produktion energiereicher Phosphate wie Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP). Die ATP-Depletion

führt zu einer massiven Beeinträchtigung ATP abhängiger Transport- und Stoffwechselprozesse (Rita Carini et al. 1999).

Durch den vermehrten ATP-Abbau und die Energiegewinnung durch anaerobe Glykolyse fallen saure Metabolite wie Laktat und Wasserstoff an. Eine intrazelluläre Azidose ist die Folge (Herbert de Groot 2013).

Veränderung im Ionenhaushalt

Durch den Abfall des intrazellulären pHs wird die Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschers (Na^+/H^+ -Austauscher) und des Natrium-Bikarbonat-Kotransporters ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter) gesteigert, um der intrazellulären Azidose entgegenzuwirken. Dabei nimmt die intrazelluläre Natriumkonzentration zu (R. Carini et al. 1995).

Daneben stellt die Natrium-Kalium-ATPase (Na^+/K^+ -ATPase) ihre Funktion ein, weshalb sich Natrium intrazellulär weiter anreichert. Die erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration treibt den Natrium-Kalzium-Austauscher ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher) an, so dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt (Gasbarrini et al. 1992).

Der Ausfall der Na^+/K^+ -ATPase führt zeitgleich auch zum Abfall der intrazellulären Kaliumkonzentration und zum Anstieg des extrazellulären Kaliums. Die Elektrolytverschiebung bedingt eine Depolarisation der Zellmembran, der ein Chlorid- und Wasser-einstrom folgt. Die Zelle schwillt an (Vollmar et al. 1994).

Aktivierung von Hydrolasen

Das erhöhte intrazelluläre Kalzium aktiviert hydrolysierende Enzyme, wie zum Beispiel die Phospholipase A_2 . Diese führt zur Degradierung membranständiger Phospholipide und letztlich zur Desintegration der mitochondrialen Membran (Inoue et al. 1993)(Z. Dong et al. 2006).

Daneben ist die intrazelluläre Azidose für die Destabilisierung lysosomaler Membranen verantwortlich. Der lysosomale Inhalt ist wesentlich an der Zellschädigung durch Ischämie beteiligt (Gasbarrini et al. 1992).

Permeabilitätsveränderung der Mitochondrienmembran

Untersuchungen haben gezeigt, dass der mitochondriale Permeabilitätsübergang am hypoxiebedingten Zelluntergang der Hepatozyten beteiligt ist (Szabó und Zoratti 1992).

Dabei schienen Mitochondrien bei geöffneten Permeabilitätsporen nicht mehr in der Lage zu sein, ATP zu produzieren (H. de Groot 2005).

1.2.2 Reperfusion

Der Begriff Reperfusion beschreibt das Wiedereinsetzen der Blutzirkulation zuvor hypoxischer Gewebe oder Organe und somit auch das Wiedereinsetzen der Sauerstoffversorgung (Dancygier 2013, 130).

Mit dem Einsetzen der Reperfusion wird die Leber wieder mit Sauerstoff versorgt. Es werden Prozesse in Gang gesetzt, die den Schaden der Ischämiephase aggravieren. Dabei unterscheidet man Zellschäden, die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst werden, von solchen, die durch eine inflammatorische Gewebereaktion ausgelöst werden (Petrat et al. 2012).

Reaktive Sauerstoffspezies

ROS sind zu einem großen Teil für den hepatozytären Zellschaden bei Reperfusion verantwortlich (H. de Groot 2005).

Sie werden überwiegend in den durch Ischämie strukturell veränderten Mitochondrien der Hepatozyten gebildet (Caraceni et al. 1995). Daneben sind auch aktivierte Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen und Thrombozyten in der Lage, ROS zu bilden (Petrat et al. 2012).

Durch die zuvor erwähnten hypoxiebedingten strukturellen Veränderungen der Mitochondrien kommt es zur Ausbildung sogenannter Elektronenlecks. Elektronen können nun von den Komplexen der Atmungskette über die Lecks in das Zytosol gelangen und dort elementaren Sauerstoff unter Bildung von Superoxid-Anionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduzieren. Diese noch sehr reaktionsarmen ROS werden in Anwesenheit vollständig reduzierten Eisens (Fe^{2+}) zu sehr stark reaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt (Fentonreaktion) (Schmid-Schönbein und Granger 2013, 454).

Fentonreaktion:



ROS entstehen auch beim Abbau energiereicher Phosphate zu Harnsäure. Unter physiologischen Bedingungen katalysiert die Xanthindehydrogenase den Abbau von Hypoxanthin, ein Zwischenprodukt des ATP-Abbaus, über Xanthin zu Harnsäure unter Verwendung von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) (Hille and Nishino 1995).

Durch bisher noch nicht gänzlich geklärte Prozesse während einer Ischämie konvertiert die Xanthindehydrogenase irreversibel zur Xanthinoxidase (Engerson et al. 1987) (Stirpe, Corte, und Lorenzoni 1969). Diese baut Hypoxanthin unter Verwendung des durch Reperfusion wieder vorhandenen elementaren Sauerstoffes zu Xanthin unter Bildung von Sauerstoffradikalen ab (H.-G. Beger et al. 2013, 310).

ROS sind in der Lage, Zellen durch *Lipidperoxidation* direkt zu schädigen. Die so hervorgerufene Desintegration der Lipidmembran ist zu einem Großteil für den Zelltod verantwortlich. Folge der Membranschäden ist ein massiver Kalziumeinstrom in die Zelle, welcher, wie bereits dargestellt, Phospholipasen und Hydrolasen aktiviert. Diese Enzyme führen letztlich zu einem Parenchymschaden (Inoue et al. 1993).

Inflammatorische Gewebereaktion

Den intrazellulären Schäden durch ROS sind die extrazellulären Schäden durch inflammatorische Gewebereaktionen gegenüberzustellen (H. de Groot und Rauen 2007).

Hierbei spielen neben der Bildung von ROS und Stickstoffmonoxid auch die Aktivierung von Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Lymphozyten, das Komplementsystem, proinflammatorische Zytokine und eine mikrovaskuläre Dysfunktion eine wichtige Rolle (H. de Groot and Rauen 2007).

Leukozyten-Endothelinteraktion

Durch Reperfusion werden Leukozyten und Sinusendothelzellen aktiviert. Letztere exprimieren daraufhin Adhäsionsmoleküle (u.a. E-Selektin) auf ihrer Zelloberfläche. E-Selektine binden zirkulierende Leukozyten locker mit geringer Affinität. Dabei bleiben Leukozyten auf der Endothelzellschicht haften und rollen darüber hinweg (*Rolling*) (Siegenthaler and Blum 2013, [489]). Durch die reduzierte Geschwindigkeit sind Leukozyten nun vermehrt den endothelial freigesetzten Mediatoren ausgesetzt. Durch die weitere Aktivierung kommt es zur Expression von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche. Diese erkennen unter anderem endotheliale Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie wie *intercellular-adhesion-molecule-1* (ICAM-1). Sie binden fest da-

ran und ermöglichen die transendotheliale Migration und Leukodiapedese in das umliegende Gewebe (Siegenthaler und Blum 2013).

Dort setzen sie weitere Prozesse in Gang, die eine Gewebeinflammation zur Folge haben (de Groot 2013).

Kupffer-Zellen

Kupffer-Zellen stellen die größte Population an gewebständigen Makrophagen im menschlichen Körper dar (Alldinger 2005, 277).

Von der Ischämie kaum beeinflusst werden Kupffer-Zellen durch Reperfusion aktiviert. Dabei kommt es zur Vakuolisierung, Degranulation (J. C. Caldwell-Kenkel et al. 1991) und einer gesteigerten Phagozytoserate (Herbert de Groot 2013). Sie sezernieren neben proinflammatorischen Mediatoren, wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-6 (IL-6), auch antiinflammatorische Mediatoren, wie Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-13 (IL-13) und den Transkriptionsfaktor *nuclear-factor- κ -light-chain-enhancer-of-activated-B-cells* (NF κ B) (Montalvo-Jave et al. 2008). Außerdem sind sie zu einem großen Teil für die Produktion von ROS nach Einsetzen der Reperfusion verantwortlich (H. Jaeschke und Farhood 1991).

Mikrovaskuläre Dysfunktion

Die zuvor beschriebene Leukozyten-Endothelinteraktion führt unter anderem auch zu einer intravasalen Akkumulation von Leukozyten, die für eine gestörte Perfusion in den Sinusoiden mitverantwortlich gemacht wird (Tapuria et al. 2012).

Es wird davon ausgegangen, dass die Dysbalance vasoaktiver Substanzen einen deutlich größeren Einfluss auf die Mikrozirkulationsstörung hat als die zuvor erwähnte Leukostase (Clemens et al. 1997).

Zu Beginn der Reperfusion kommt es zu einem konsekutiven Anstieg der Endothelin-konzentration. Endothelin (ET) ist eine vasokonstriktive Substanz. Die Vasokonstriktion begünstigt die Adhärenz von Leukozyten und Thrombozyten an die Endotheloberfläche. Dabei kommt es zur Reduktion des Gefäßquerschnitts bis hin zur Okklusion und zur vermehrten Freisetzung weiterer Zytokine und Sauerstoffradikale (Herbert de Groot 2013).

Stickstoffmonoxid (NO) ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage, der ET-Wirkung entgegenzuwirken und somit die Mikrozirkulation zu gewährleisten. Aufgrund

der Ischämie mangelt es an wichtigen Kofaktoren (NADPH und O₂) der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS). Daher ist von einer gestörten Regulation des kapillären Durchmessers auszugehen (Herbert de Groot 2013).

Daneben spielt die Zunahme des interstitiellen Drucks durch das interstitielle Ödem als Folge der inflammatorischen Gewebereaktion, aber auch die zunehmende Hämkonzentration durch den massiven Flüssigkeitsausstrom in das umliegende Gewebe eine entscheidende Rolle bei der mikrovaskulären Dysbalance (H. de Groot 2005).

Das Ausmaß der Schädigung durch Reperfusion ist abhängig von der betroffenen Zelle. So sind Hepatozyten in der Lage, sich rasch durch Reperfusion von der Ischämie zu erholen. Sinusendothelzellen und Kupffer-Zellen reagieren hingegen empfindlicher auf die Reperfusion. Neben der Zellart ist auch die Lokalität der Zelle für den Schaden relevant. Zellen im Bereich der Portalgefäße sind in der Lage, sich vom Reperfusionsschaden zu erholen. Zellen im Bereich der Sinus gehen hingegen vollständig zu Grunde (Lemasters et al. 1983) (J. C. Caldwell-Kenkel, Thurman und Lemasters 1988) (Jane C. Caldwell-Kenkel et al. 1989).

1.3 Apoptose

Der Begriff Apoptose beschreibt den Prozess eines programmierten Zelltodes. Sie spielt zum einen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, zum anderen in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase, d.h. dem Zusammenspiel aus Zellproliferation und Zelldepletion (Kerr, Wyllie und Currie 1972).

Die Apoptose unterscheidet sich von der Nekrose morphologisch durch Chromatinkondensation, Vakuolisierung des Zytoplasmas, *membrane blebbing*, Zellschrumpfung und DNA-Fragment-Phagozytose (Lauber, Engels und Wesselborg 2004). Dabei bleibt der Zellinhalt grundsätzlich von einer Membran umgeben, wird schrittweise phagozytiert bzw. abgebaut und gelangt somit nicht in das umliegende Gewebe. Dabei laufen diese Vorgänge üblicherweise ohne Inflammation ab (Will 2014, 189). Bei Nekrose entsteht ein Zellödem, die DNA wird unkontrolliert abgebaut und der Zellinhalt gelangt in das umliegende Gewebe, wo er eine Inflammationsreaktion induziert (Hofmann 2006a, 154).

Apoptose ist das Ergebnis einer kaskadenartigen Aktivierung spezifischer Proteasen. Diese Proteasen werden als Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*) bezeichnet. Sie besitzen ein Cystein im aktiven Zentrum und spalten Proteine an spezifischen Aspartatresten. Caspasen entstehen aus Procaspasen, die wiederum durch Caspasen aktiviert werden (Hofmann 2006a, 155).

Im Rahmen der Apoptose unterscheidet man Initiator-Caspasen von Effektor-Caspasen. Zu den Initiator-Caspasen zählt man die Caspase-8, -9 und -10, wohingegen die Caspasen-3, -6 und -7 den Effektor-Caspasen zuzuordnen sind (Will 2014, 189).

Grundsätzlich ist die Apoptose eine Abfolge gezielter und limitierter Proteolyse spezifischer Proteine mit konsekutiver Aktivierung oder Inaktivierung. Das Ergebnis sind Signalwege, die zelluläre Reaktionen hervorrufen und den gezielten Untergang der Zelle bewirken. Dabei führt Apoptose zum Zellzyklusarrest, zum Verlust von Interzellularkontakten, zur Kennzeichnung apoptotischer Zellen für die Phagozytose und schließlich zur zellulären Desintegration (Lauber, Engels und Wesselborg 2004).

Bei der Induktion der Apoptose geht man heute vorwiegend von zwei unterschiedlichen Wegen der Apoptoseinduktion aus. Man unterscheidet zwischen einem extrinsischen und einem intrinsischen Signalweg (Hofmann 2006b, 156 f).

1.3.1 Der extrinsische Signalweg (Apoptose Typ I)

Der extrinsische Weg wird über die Bindung eines Liganden an membranständige Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie vermittelt. Ihnen gemein sind eine Mehrzahl extrazellulärer, eine transmembranäre und eine intrazelluläre Todesdomäne. Zu den Todesrezeptoren zählt man das CD95(Fas) und den TNF-Rezeptor-1 (TNFR1) (K. Schulze-Osthoff et al. 1998).

Durch die Bindung des CD95 Liganden an den Todesrezeptor CD95 kommt es zu dessen Trimerisierung. Dadurch bindet das Adapterprotein *fas-associating-protein-with-death-domain*(FADD) an die intrazelluläre Domäne des CD95-Rezeptors. Dieser Komplex wird als *death-inducing-signaling-complex*(DISC) bezeichnet (Kischkel et al. 1995). Daneben besitzt FADD eine *death-effector-domain*(DED), welche mehrere Procaspase-8-Moleküle bindet (Medema et al. 1997). Dadurch kommt es zur autokatalytischen Proteolyse von Procaspase-8 zu Caspase-8 (Salvesen und Dixit 1999). Die Caspase-8, eine Initiatorcaspase, aktiviert wiederum Caspase-3, eine Effektorcaspase. Caspase 3 schneidet Zielproteine und führt dadurch zum Zelltod (Heinrich, Müller und Graeve 2014, 634).

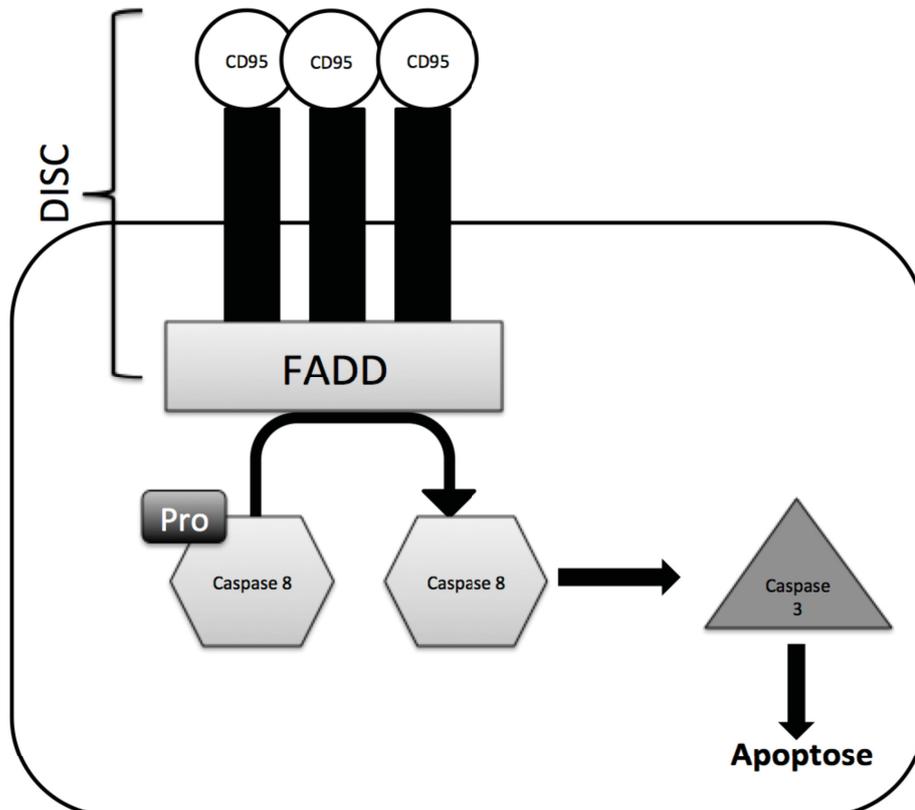


Abb. 1 Der extrinsische Weg der Apoptoseinduktion

1.3.2 Der intrinsische Signalweg (Apoptose Typ II)

Entscheidend für die Induktion des intrinsischen Signalwegs ist die mitochondriale *Cytochrom c* Freisetzung (Hofmann 2006a, 157). Was genau zur mitochondrialen Freisetzung führt, ist noch nicht gänzlich geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass DNA-Schäden, osmotischer Stress oder ein unphysiologischer pH-Wert für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 verantwortlich sind, welcher die Expression proapoptischer Proteine wie Bax, Bad und Bak stimuliert (Hofmann 2006a, 1).

Cytochrom c befindet sich auf der Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran und im Intermembranraum. Es gelangt über spannungsabhängige Ionenkanäle (VDAC) in der äußeren Mitochondrienmembran in das Zytosol (Hofmann 2006a, 157).

Das antiapoptotische Bcl-2 stabilisiert das mitochondriale Membranpotential, hält damit den VDAC geschlossen und verhindert so die Freisetzung von *Cytochrom c*. Daneben aktiviert Bad das proapoptotische Multidomän-Protein-Bax, welches den VDAC öffnet und für eine *Cytochrom c* Freisetzung sorgt. Zeitgleich kommt es zur Freisetzung von Apaf-1 aus der Mitochondrienzellmembran. Apaf-1 bindet über seine *caspase recruitment domain* (CARD) Procaspase-9. Apaf-1, Procaspase-9 und *Cytochrom c* bilden das sogenannte Apoptosom. Die Procaspase-9 wird autoproteolytisch zu Caspase-9 aktiviert. Diese ist wiederum in der Lage die Effektcaspase-3 des extrinsichen Weges zu aktivieren und somit den Zelltod einzuleiten (Hofmann 2006a, 158).

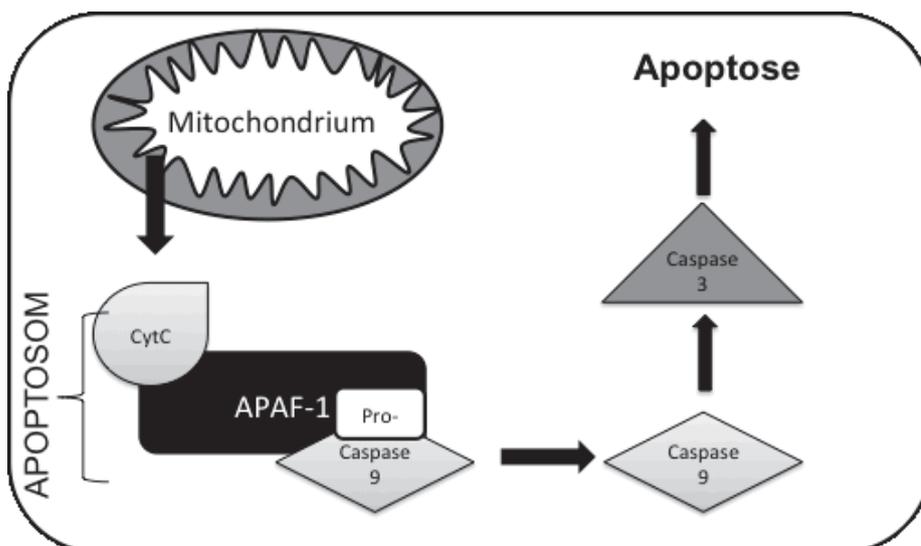


Abb. 2 Der intrinsische Weg der Apoptoseinduktion

Darüber hinaus gibt es einen weiteren Mechanismus zur Induktion der Apoptose. Durch Freisetzung von AIF, dem *apoptosis-inducing-factor*, aus dem intermembranösen Raum

kommt es zur Freisetzung von Caspase 9, welche an der Bildung des Apoptosoms beteiligt ist (Susin et al. 1999).

1.4 Die Rolle von TNF α für den Ischämie- und Reperfusionsschaden

Der Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) ist ein Zytokin der Tumornekrosefaktor- Superfamilie. Es handelt sich um eine Gruppe von Proteinen, die ihre Wirkung über die Bindung an TNFR1 und TNFR2 entfalten (Bazzoni und Beutler 1996). TNF α wird überwiegend von Makrophagen und Monozyten, aber auch von Endothelzellen und Fibroblasten produziert (Siegenthaler und Blum 2013, 531).

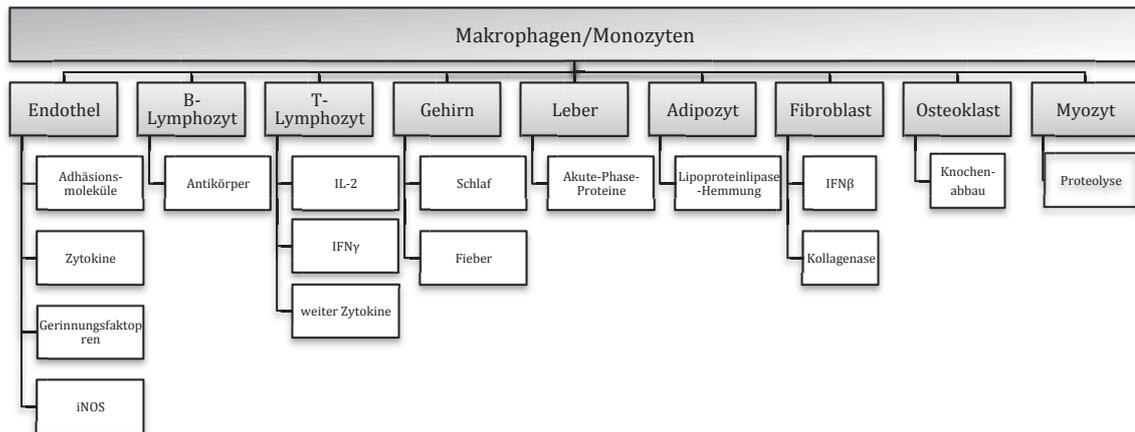


Abb. 3 Wirkspektrum von TNF α

TNF α hat zahlreiche zell- und gewebespezifische Wirkungen (vgl. Abb. 3 Wirkspektrum von TNF α), die in ihrer Gesamtheit für die Regulation von Inflammation verantwortlich sind. In Endothelzellen löst es vielfältige entzündliche Veränderungen aus. Neben der Expression von Adhäsionsmolekülen stimuliert TNF α die Sekretion von Zytokinen, prokoagulatorische Substanzen und die Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) (Klaus Schulze-Osthoff et al. 1998). Die Folge ist unter anderem eine gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität. In hohen Konzentrationen kann TNF α so zu einem septischen Schock beitragen (Männel und Echtenacher 1999). Durch die Hemmung der Lipoproteinlipase in Adipozyten führt TNF α bei permanent niedrigen Konzentrationen zur Kachexie (Tumorkachexie) (Torti et al. 1985).

TNF α kommt entweder als ein Membran gebundenes oder als ein gelöstes Homotrimer vor (Tang, Hung M-C und Klostergaard 1996).

Wie unter 1.3.1. beschrieben, ist TNF α über die Bindung an TNFR1 in der Lage, über die Aktivierung einer Caspasekaskade die Apoptose zu induzieren (Salvesen und Dixit

1999). Durch Bindung an TNFR2 aktiviert TNF α den Transkriptionsfaktor NF κ B (*nuclear factor kappa B*) (Baker und Reddy 1998).

NF κ B spielt eine essenzielle Rolle in der Regulation von Immunantworten, Zellproliferation und Zelltod. Der Transkriptionsfaktor kommt als aktive oder inaktive Form vor. Die aktive Form, ein Heterodimer aus je den Proteinen p65 und p50, findet sich im Zellkern. Die inaktive Form, an *I κ B* (inhibitorisches κ B) gebundenes P65/50-Heterodimer, findet sich gelöst im Zytosol. Durch einen entsprechenden Stimulus phosphorylieren die aktivierten Kinasen *IKK α* und *IKK β* das *I κ B* und führen so zu dessen *Ubiquitierung*. *I κ B* wird vom 26S-Proteasom abgebaut, wodurch es sich von NF κ B löst (vgl. Heinrich, Müller und Graeve 2014, fig. 35.25). *NF κ B* diffundiert in den Zellkern, wo es die Transkription seiner Zielgene bewirkt (Oberholzer 2001, 124f).

Zu den Zielgenen gehören unter anderem Gene, die für antiapoptotische Proteine kodieren. So zum Beispiel für *cellular inhibitors of apoptosis proteins 1* (c-IAP1) und 2 (c-IAP2). Sie hemmen die TNFR-1 vermittelte Caspase-8-Aktivierung (Wang et al. 1998).

TNF α hat eine ambivalente Wirkung (Shuh et al. 2013). So induziert es über die Bindung an TNFR-1 die Apoptose über den extrinsischen Signalweg (K. Schulze-Osthoff et al. 1998). Andererseits hat TNF α auch eine antiapoptotische Wirkung, da es NF κ B aktiviert, welches für Schutzproteine gegen die Apoptose kodiert (Wang et al. 1998) (Nagaki et al. 2000).

Wie unter 1.2.2 bereits beschrieben, kommt es im Zuge der Reperfusion zur Aktivierung von Kupffer-Zellen, die daraufhin unter anderem das Zytokin TNF α ausschütten (Wanner et al. 1995).

1.5 TNF α -Inhibitor Etanercept

Wie unter 1.4 bereits beschrieben, spielt TNF α eine zentrale Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse. Daher spielen TNF-Inhibitoren heute eine große Rolle in der Therapie TNF-assoziiierter rheumatischer Erkrankungen, wie zum Beispiel bei rheumatoider Arthritis, Psoriasis-Arthritis oder Morbus Bechterew (Esposito und Cuzzocrea 2009).

Heute sind zur Therapie diverser entzündlicher Erkrankungen (*Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn*) fünf Präparate zugelassen. Die monoklonalen Antikörper Infliximab, Adalimumab, Golimumab und Certolizumab und der rekombinant hergestellte TNF-Rezeptor *Etanercept* (Karow 2014, 609).

Etanercept (Enbrel[®]) ist ein löslicher TNF-Rezeptor. Es handelt sich um ein dimeres TNFR-p75-Fc-Fusionsprotein, welches rekombinant aus einer Ovarzelllinie des Chinesischen Hamsters gewonnen wird. Etanercept entsteht durch Fusion des extrazellulären ligandenbindenden Anteils eines humanen TNFR2(p75) mit dem humanen IgG1-Fc Stück. Das Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 150 kD und setzt sich aus 934 Aminosäuren zusammen (pfizermed 2015).

Etanercept bindet hochaffin an zirkulierendes TNF α , welches dann nicht mehr in der Lage ist, an TNFR1/2 zu binden. Dadurch wird seine biologische Aktivität und demnach auch die Induktion und die Verstärkung einer Inflammation eingedämmt (Kalden 2002).

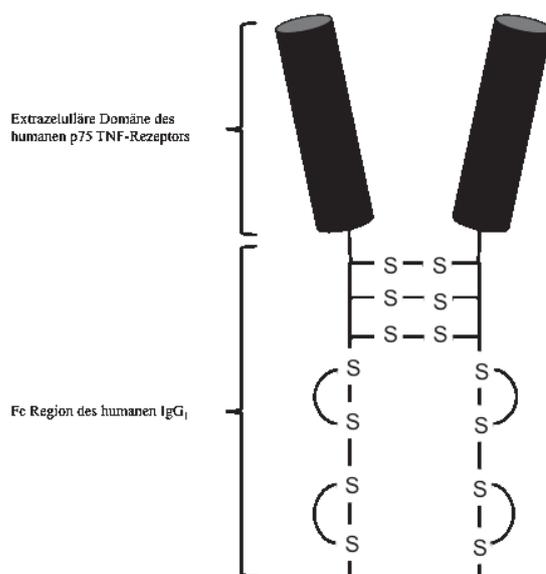


Abb. 4 Molekularer Aufbau des Etanercept

2 Ziele der Arbeit

2.1 Stand der Forschung

Es gibt zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Charakterisierung des IRS der Leber befassen. So zeigten sich zum einen vermehrte Zellnekrosen, zum anderen erhöhte TNF α -Konzentrationen nach Ischämie und während der Reperfusion (Wanner et al. 1995; Wanner et al. 1996).

Wanner und sein Team schreiben dem TNF α eine Triggerfunktion bei der Induktion proinflammatorischer Prozesse nach Ischämie und Reperfusion zu. In einer experimentellen Studie untersuchten sie deshalb den Einfluss einer TNF α -Inhibition mittels monoklonaler Antikörper. Sie kamen zu dem Erkenntnis, dass TNF α -Inhibitoren TNF α neutralisieren und so die proinflammatorischen Prozesse nach warmer Ischämie reduzieren (Wanner, Müller et al. 1996).

2.2 Fragestellung

Die Arbeiten von *Donner et al.* zeigten eine zonale Herabregulation von Gallensäuretransportern in der Leber im Rahmen einer Cholestase. Dabei beschreiben sie unter anderem auch Zytokin abhängige Regulationsmechanismen (Donner et al. 2007, 2013). In dieser Studie wurden die Folgen einer in vivo Gallengangsligatur mit und ohne Präkonditionierung mit Etanercept untersucht.

Daher ist der Einfluss der TNF α -Inhibition nicht nur im Rahmen einer Cholestase, sondern auch nach kalter Ischämie, wie sie bei einer Lebertransplantation auftritt Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer TNF α -Inhibition auf den IRS nach kalter Ischämie von 24 Stunden zu untersuchen.

Diese Arbeit sollte Antworten auf folgende Fragen geben:

1. Kann eine TNF α -Inhibition mittels Etanercept den IRS minimieren?
2. Welchen Einfluss könnten die hier gewonnenen Erkenntnisse auf die Entwicklung möglicher therapeutischer Ansätze zur Minimierung des cholestatischen Leberschadens nach Ischämie und Reperfusion haben?

3 Material

3.1 Tiere

Die Versuche erfolgten nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium sowie unter der Aufsicht der Versuchsleitung der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Für die durchgeführten Versuche wurden männliche Wistar-Ratten unterschiedlichen Alters verwendet. Sie wurden bei gleichbleibendem Tag-Nacht-Rhythmus, einer konstanten Temperatur von 21-23°C und mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser gehalten.

Für die Hepatektomie wurden deutsche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 250g verwendet. Sie wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben des Universitätsklinikums Düsseldorf gezüchtet.

Das Perfusat für die Reperfusion wurde durch 40 ml Blut dreier Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 400 - 450g ergänzt.

3.2 Chemikalien

Reagenzien	Firma
Aqua dest.	
Acrylamide	
Bovines Serumalbumin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München
Calciumchloriddihydrat	
Conoxia GO ₂ N	Linde Gas Therapeutics GmbH
Custodiol	
Ethanol	
Glucose	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München
Krebs-Henseleit-Puffer	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhydrogencarbonat	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, München
Proteaseinhibitor	Roche applied Science
Taurocholessigsäure	Calbiochem, Bad Soden
Silikon	
Stickstoff	

3.3 Medikamente

Medikament	Firma
Etanercept	Pfizer
Heparin-Natrium	Ratiopharm
Isofluran	Baxter
NaCL 0,9%	Fresenius Kabi

3.4 Geräte

Gerät	Typenbezeichnung	Hersteller
Analysewaage		Sartorius
Auflicht	HAL 100	Zeiss
Blotter	Fastblot	Biometra GmbH
Blutanalysegerät	ABX Micros ABC Vet	HORIBA ABX Inc., Irvine, CA, USA
Blutgasanalysegerät	Blood Gas Analyzer ABL-505	Radiometer, Kopenhagen
Laser Scanning Mikroskop	LSM 510	Zeiss
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf
Pipetten	Research Pipette (10, 100, 1000µl)	Eppendorf
Doppel- Gel System für Gelelektrophorese	Maxigel	Biometra GmbH
Rüttelplatte	Thermomixer 5436	Eppendorf
Spectrophotometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham bioscience
Ultrazentrifuge		
Vaporisateur		
Vortexgerät	VORTEX-MIXER-WIZARD	Velp.Scientifica
Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf

3.5 Operationsinstrumentarium



3.6 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Firma
Einmalkanüle	Sterican® Insulin G27	Braun
Einmalkanüle	Sterican® Standardkanüle G20	Braun
Einmalspritze	Injekt® 20ml	Braun
Einmalspritze	Injekt® 2 ml	Braun
Einmalspritze mit Heparinskalierung	Omnifix® H	Braun
Pipettenspitzen	TipOne Tips(10; 100; 1000 µl)	Starlab
Schlauch (Lunge)	0.058in. ID(1,47mm)x0.077in. OD(1.96mm)	Silastic Laboratory Tubing
Schlauch (Pfortader)	0.078in. ID(1,98mm)x0.125in. OD(3.18mm)	Silastic Laboratory Tubing
Box		Silastic Laboratory Tubing
Box- overflow		Silastic Laboratory Tubing
Prolene		
Transfermembran	PVDF Membrane	GE Healthcare
Tupfer		
Seide		

4 Methoden

4.1 Vorbemerkung

Die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden im Zeitraum vom 03. Februar 2012 bis 21. Oktober 2013 in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutz des Universitätsklinikums Düsseldorf durchgeführt.

Dabei wurden für die Etablierung der Hepatektomie und des in vitro Reperfusionssmodells 82 Wistarratten mit einem Gewicht von 250g und für die Blutabnahme 103 Wistarratten mit einem Gewicht von 400-450g operiert, welche nicht in die endgültige Statistik eingegangen sind.

4.2 Tierversuche

4.2.1 Genehmigung der Tierversuche

Die für diese Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (Fachbereich Tierschutz, Leibnitzstraße 10, 45659 Recklinghausen) zur Durchführung der Tierversuche genehmigt. (Aktenzeichen: 87-51.04.2010.A011).

Die Versuche erfolgten unter regelmäßiger Aufsicht der Versuchsleitung in der Tierversuchsanstalt des Universitätsklinikums Düsseldorf gemäß dem Tierschutzgesetz in der Fassung vom 25. Mai 1998.

4.2.2 Versuchsgruppen

Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet.

Gruppe 1: keine Präkonditionierung, Hepatektomie, keine kalte Ischämie, keine Reperfusion (n=4)

Gruppe 2: keine Präkonditionierung, Hepatektomie, 24 Stunden kalte Ischämie, 180 min Reperfusion (n=7)

Gruppe 3: Präkonditionierung mit Etanercept, Hepatektomie, 24 Stunden kalte Ischämie, 180 min Reperfusion (n=9)

4.2.3 Anästhesie

Die Injektion von Etanercept 24 Stunden präoperativ und die Hepatektomie wurden unter Allgemeinanästhesie mit Isofluran durchgeführt.

4.2.4 Präkonditionierung

Zur Präkonditionierung wurden 24 Stunden vor der Hepatektomie 8mg/kg Körpergewicht Etanercept intraperitoneal injiziert. Zusätzlich wurde 0,3mg Etanercept dem Perfusat zugegeben, damit Etanercept in einer Konzentration von 3mg/l vorliegt.

4.2.5 Versuchsablauf



Abb. 5 Versuchsaufbau zur Induktion eines Ischämie- und Reperfusionsschadens nach einer kalten Ischämie von 24 h und einer Reperfusion von 180min

4.2.6 Hepatektomie

Nach Ethanoldesinfektion wurde ein vertikaler Hautschnitt gesetzt. Der Bauchraum wurde entlang der *Linea alba* eröffnet und beidseits durch vertikale Schnittführung erweitert. Nach Aufspannen des Abdomens wurde das *Ligamentum falciforme* durchtrennt. Der *Lobus dexter* und *Processus caudatus* wurde von sämtlichen weiteren anhängenden Ligamenten und Adhäsionen gelöst. Der Magen wurde mit einer gebogenen Arterienklemme angespannt und die Ösophagusgefäße mit einer gebogenen Präparierklemme abgeklemmt und anschließend durchtrennt. Die *Vena diaphragmatica sinistra* wurde mit 7-0 Prolene ligiert. Das Darmgekröse kam außerhalb des Situs in einer feuchten Kompresse zu liegen. Der *Ductus hepaticus* wurde ligiert, angespannt, eröffnet und mit einem Polyethylenröhrchen (I.D. 0.58 mm/O.D. 0.0965mm) kanüliert. Anschließend wurden *Vena und Arteria gastroduodenalis* ligiert. Die *Arteria hepatica* wurde präpariert. Die *Vena und Arteria renalis dexter* wurden mit 6-0 Seide ligiert und anschließend durchtrennt. Die *Vena suprarenalis dexter* wurde ligiert. Anschließend wurde die Leber vorsichtig nach links bewegt und die retrohepatischen Adhäsionen gelöst. Die *Arteria hepatica* wurde mit 6-0 Seide ligiert, die *Vena portae* abgeklemmt und kanüliert. Die Leber wurde über die Pfortaderkanüle mit 30ml eiskaltem NaCl 0,9% und

im Anschluss daran mit 40ml Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) durchgespült, nachdem die *Vena cava caudalis* eröffnet wurde. Nach Durchtrennen der *Vena cava cranialis* wurde die Leber herausgelöst und in 100ml eiskalter (4°C) HTK- Lösung gelagert. Die *Vena cava cranialis und caudalis* wurden kurz vor der Reperfusion mit 12 G Kanülen kanüliert.



Abb. 6 Situs nach Längslaparatomie



Abb. 7 Situs nach Luxation des Darmgekröses

4.2.7 Reperfusion

Die isolierte Perfusion der explantierten Rattenleber wurde von Herrn Leon Philipp nach dem Modell von Miller (Miller et al. 1951) mit Modifikationen nach Clavien (Clavien et al. 1993) vorgenommen.

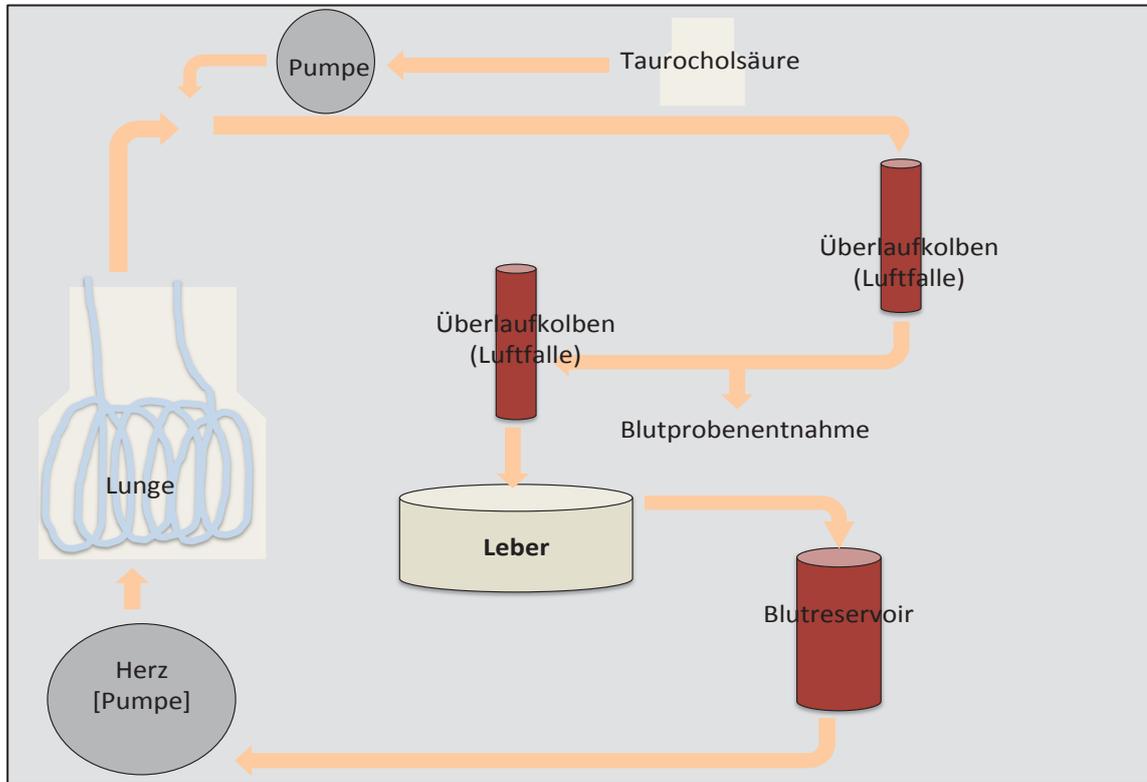


Abb. 8 Reperfusionsapparatur Skizze

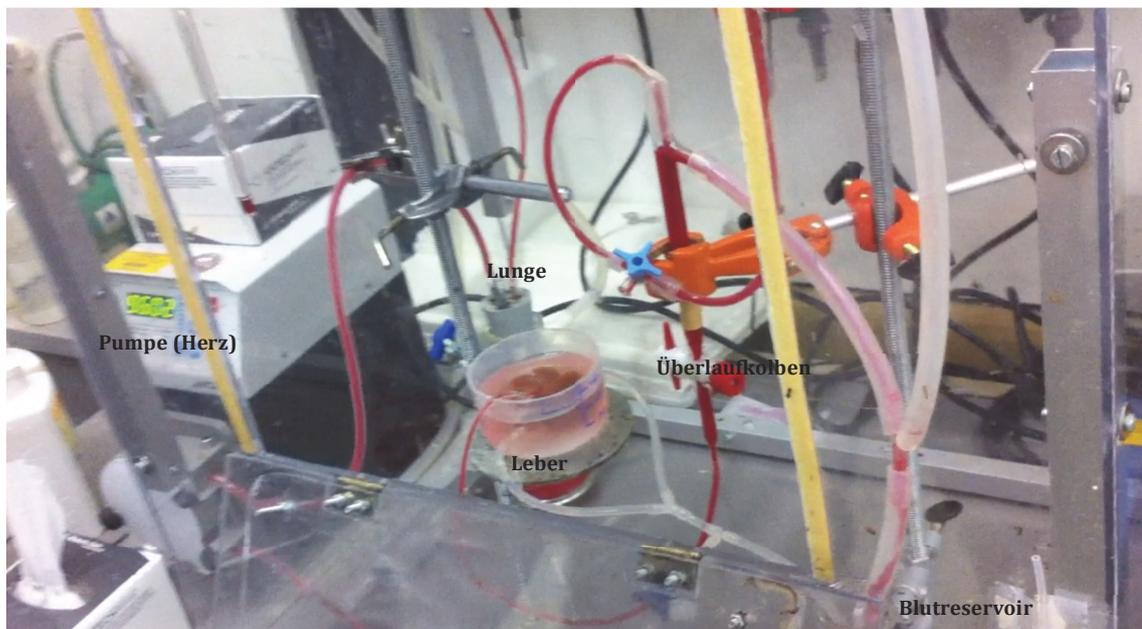


Abb. 9 Reperfusionsvorrichtung

Lösungen

Krebs-Henseleit-Puffer (KH), 1000ml:

0,373g Calciumchloriddihydrat (FW147.02) und 2,1g Natriumbicarbonat (FW 84.01;Sigma, S-6014) wurden in 1000ml KH gelöst. Dabei sollte der pH-Wert 7,4 sein.

Perfusat-I:Albumin-Krebs-Henseleit-Puffer (AKH), 100ml:

2,0g bovines Serumalbumin (Sigma, A-7906) und 0,1g Glukose (FW 180.2; Sigma G-6152) wurden in 100 ml KH-Puffer gelöst.

Taurocholat 1mM Stock- Lösung:

26,9 mg Taurocholat wurden in 50 ml KH gelöst.

Perfusat-II: Taurocholat und Heparin:

1ml Taurocholat-Stock-Lösung und 3ml Heparin wurden zu 8ml KH-Lösung gegeben.

8,4 % Natriumhydrogencarbonatpuffer:

8,4g Natriumcarbonat in 100ml H₂O.

Durchführung

Die explantierte Leber wurde nach der Hepatektomie in HTK-Lösung für 24 Stunden bei +4°C konserviert. Nach der kalten Ischämie von 24 Stunden wurde die Leber für 180min mit 100ml Perfusat reperfundiert. Das Perfusat setzte sich aus 60ml Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung und 40ml heparinisiertem Blut zusammen. Drei Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 350- 400g wurden für die Blutgewinnung benötigt.

Der Hämatokrit sollte bei ca. 15% liegen. Nachdem das Perfusat in das System gegeben wurde, wurden weitere 1000 IE Heparin hinzugegeben. Bevor die Leber an das System angeschlossen wurde, wurde sie mit 12ml kalter Albumin-Krebs-Henseleit-Lösung gespült, wobei ein Druck von 12mmHg nicht überschritten wurde. Die Konservierungslösung wurde kurz vor dem Reperfusionstart durch 37°C warme Krebs-Henseleit-Lösung ersetzt. Die Reperfusion wurde mittels Schwerkraft und einem Perfusionsdruck von 12mmHg aufrechterhalten.

Der Sauerstoffpartialdruck wurde bei über 350mmHg und einem pH-Wert zwischen 7,3 und 7,4 konstant gehalten. Abweichungen wurden mit 8,5% Natriumbicarbonat korrigiert.

Die Oxygenierung des perfundierenden Blutes fand in einer künstlichen Lunge statt. Die künstliche Lunge setzte sich zusammen aus einem Kolben der mit einem Fluss von 4l/min 95%-igem Sauerstoff und 5%igem CO₂ befüllt wurde, welcher wiederum über das *silasting tube* ins Blut diffundierte.

Das zirkulierende Volumen wurde konstant bei 100ml gehalten. Mit regelmäßigen Blutabnahmen wurden Leberwerte wie AST und ALT sowie Blutgase und kleines Blutbild bestimmt. 12ml Perfusat-II wurden kontinuierlich über drei Stunden in das System gegeben.

4.3 Analytische Methoden

4.3.1 Vitalparameter

Zur Beurteilung der Narkosetiefe wurde die Spontanatmung kontinuierlich überwacht.

4.3.2 Laborchemische Analysen

Zur Analyse laborchemischer Parameter wurden während der Reperfusion zu den Zeitpunkten 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min Blutproben entnommen.

BGA

Die Stabilität des Reperfusionssystems wurde mit Hilfe regelmäßiger laborchemischer Analysen der Blutgasbestandteile sowie des pH-Wertes kontrolliert.

Kleines Blutbild

Zur Bestimmung des Blutanteils im Perfusat wurde alle 30 Minuten ein kleines Blutbild angefertigt. Die Bestimmung von Hämatokrit, Hämoglobin, Leukozyten und der Thrombozyten wurden von Herrn Leon Philipp durchgeführt.

Bestimmung serumaktiver Enzyme

Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde durch Frau Dr. med. Carmen Barthuber, Fachärztin für Laboratoriumsmedizin des Zentrallabors des Universitätsklinikums Düsseldorf, durchgeführt.

Zur Quantifizierung des Leberzellschadens wurde die Aktivität verschiedener Serumenzyme bestimmt.

Die Alanin-Aminotransferase (ALT) gilt als Kenngröße einer hepatozellulären Schädigung. Als Ergänzung wurde auch die Aktivität der weniger leberspezifischen Aspartat-Aminotransferase (AST) bestimmt.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) gilt als unspezifischer Marker für Zellzerfall. In Zusammenschau mit den Aminotransferasen wurde sie als Indikator für einen hypoxischen Leberschaden herangezogen.

Zur Beurteilung einer intrahepatischen Cholestase wurde die Alkalische Phosphatase (AP) bestimmt.

4.3.3 Physikalische Messparameter

Portale Flussrate

Zur Kontrolle der Reperfusionsgeschwindigkeit wurde zu den Zeitpunkten 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 und 180 min die Durchflussgeschwindigkeit durch die Portalgefäße bestimmt.

Zur Bestimmung der portalen Flussrate wurde der Blutfluss vor dem Überlaufkolben gestoppt. Hierbei leerte sich der Überlaufkolben pro Zeiteinheit um ein bestimmtes Volumen (575µl). Zur Berechnung der Flussrate wurde folgende Formel angewendet:

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

Galleproduktion

Zur Kontrolle der Exkretionsfunktion wurde das endgültige Volumen der gesammelten Galle nach 180 Minuten Reperfusion bestimmt. Hierzu wurde der *Ductus choledochus* kanüliert.

4.4 Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der in den Versuchen erhobenen Daten wurde mit Microsoft® Excel® für Mac 2011 (Version 14.0.0) an einem MacBook Pro 13 Zoll (Ende 2011) durchgeführt.

Vor der statistischen Datenanalyse wurde eine Fallauswahl getroffen. Dabei wurden alle Versuchstiere in die Datenanalyse aufgenommen, die jeweils die folgenden Kriterien erfüllt haben:

- kalte Ischämie von 24 Stunden;
- durchgeführte und beendete Reperfusion sowie
- keine Komplikationen

Es ergab sich eine Anzahl $n=6$ für Tiere ohne Präkondition und eine Anzahl $n=7$ für Tiere mit Präkondition.

Im Anschluss daran wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen und die entsprechenden Standardfehler berechnet.

Die Berechnung der Signifikanz wurde mit IBM® SPSS® Statistics Version 22(22.0.0.2.) 64-Bit-Version an einem Mac Book Pro 13 Zoll (Ende 2011) durchgeführt. Die kleinen Stichprobengrößen bedingten die Durchführung eines nichtparametrischen Testes. Es handelte sich um unabhängige Stichproben, da die Parameter bei unterschiedlichen Tieren erhoben wurden.

Diese Arbeit unterscheidet zwei Gruppen voneinander (unpräkonditioniert versus präkonditioniert). Daher wurde der *Mann-Whitney-U-Test* als statistischer Test zur Bestimmung der Signifikanz herangezogen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurde eine Signifikanz angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber

Das Model der isoliert perfundierten Rattenleber (IPRL) zu etablieren, gestaltete sich anfangs als sehr schwierig. Die Komplikationen, die sich während des Etablierungsprozesses ergaben, werden im Folgenden dargestellt.

5.1.1 OP

Die Operationstechnik der Hepatektomie bei Ratten wurde an 82 Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250g erlernt. In die statistischen Auswertungen wurden lediglich die Tiere aufgenommen, deren Operation reproduzierbar komplikationslos war und eine Operationszeit von 45 Minuten nicht überschritten hat.

Komplikationen, die zu einem Ausschluss geführt haben, werden im Folgenden in chronologischer Reihenfolge aufgezählt:

- Herzkreislauf- und Atemstillstand bei zu tiefer Narkose;
- Verletzungen der Leber, die mit einem massiven Blutverlust einhergehen;
- Ruptur der diaphragmalen Gefäße;
- Ruptur des Gallengangs, mit daraus resultierender Unmöglichkeit der Kanülierung

5.1.2 Konservierung

Das zunächst vorliegende Versuchsprotokoll sah eine Konservierung für 44h bei +4°C in Universal Wisconsin (UW) Lösung vor. Aufgrund von Lieferengpässen musste auf die Verwendung von HTK-Brettschneider'sche Lösung (Custodiol®) zurückgegriffen werden. Hierbei zeigte sich, dass eine Ischämiezeit von 44 Stunden einen derart ausgeprägten Ischämieschaden mit Laktatdehydrogenase (LDH)-Werte von über 14.000 I/U bei einer Reperusionszeit von 5 Minuten induzierte, dass von einer völligen Leberdestruktion bei einer Ischämiezeit von 44 Stunden ausgegangen werden konnte.

Nach Rücksprache mit Herrn Professor Stefan A. Topp und Herrn PD Dr. Markus Donner wurde die Ischämiezeit im Versuchsprotokoll von 44 Stunden auf 24 Stunden reduziert.

5.1.3 Reperfusion

Die Reperfusion wurde im Wesentlichen von Herrn Leon Philipp durchgeführt. Die Blutabnahme wurde an 132 Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 350-400g erlernt. Bei frustrierender Blutabnahme mit einer Blutmenge <40ml war eine Reperfusion nicht möglich. So konnte nicht jede explantierte Leber reperfundiert werden.

Im Folgenden werden Komplikationen im Rahmen der Reperfusion aufgezählt, die einen Ausschluss von der statistischen Auswertung bedeuteten:

- Dislokation der Kanülierung der *supra- und infrahepatischen Vena cava*
- Eine Durchspülung der explantierten Leber mit 12ml kalter Albumin-Krebs-Henseleit- Lösung bei einem Druck >12mm Wassersäule;
- Perforation der Leber, die letztlich mit einem massiven Blutverlust während der Reperfusion einhergeht und zu einem Hämatokritabfall führt;
- Nicht messbare portale Flussraten

5.2 Laborchemische Analysen

5.2.1 Kleines Blutbild

Hämoglobin

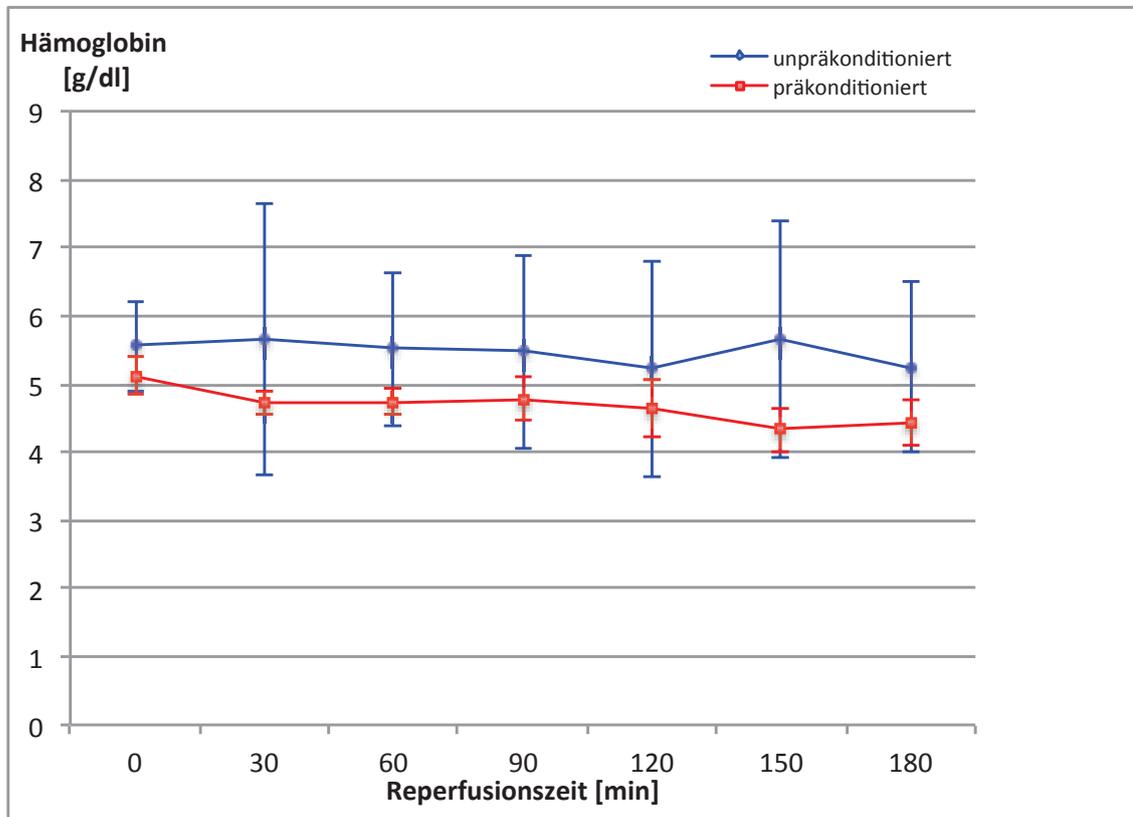


Abb. 10 Verlauf der Hämoglobinkonzentration[g/dl]

In der Gruppe der unpräkonditionierten Tiere hat sich vor Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=9) eine Hämoglobinkonzentration von 5.56 ± 0.88 g/dl gezeigt. Nach 30min (n=7) 5.66 ± 2.23 g/dl, nach 60min (n=9) 5.51 ± 1.50 g/dl, nach 90min (n=9) 5.48 ± 1.89 g/dl, nach 120min (n=7) 5.23 ± 1.78 g/dl, nach 150min (n=9) 5.64 ± 2.30 g/dl und nach 180min (n=8) 5.25 ± 1.53 g/dl.

In der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere hat sich zum Zeitpunkt 0min (n=8) eine Hämoglobinkonzentration von 5.13 ± 0.35 g/dl gezeigt. Nach 30min (n=8) 4.71 ± 0.22 g/dl, nach 60min (n=8) 4.74 ± 0.23 g/dl, nach 90min (n=8) 4.78 ± 0.39 g/dl, nach 120min (n=8) 4.65 ± 0.52 g/dl, nach 150min (n=7) 4.33 ± 0.36 g/dl und nach 180min (n=6) 4.43 ± 0.33 g/dl.

Hämatokrit

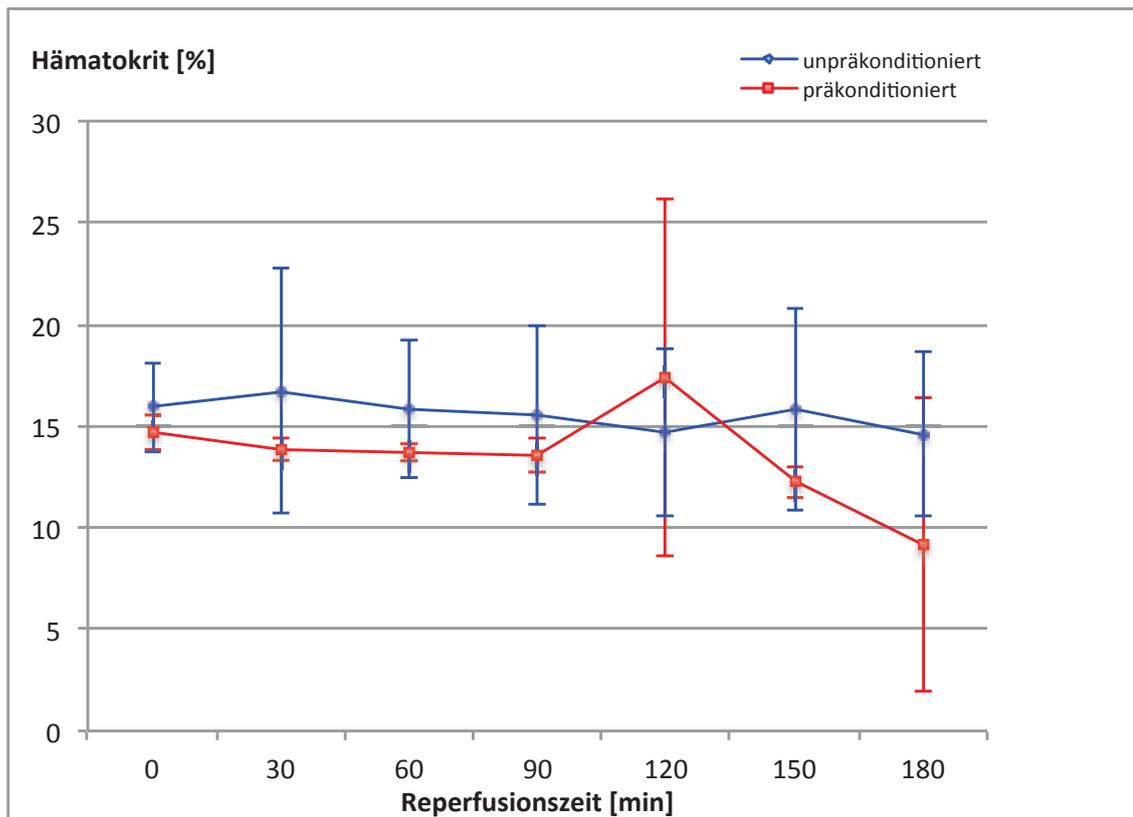


Abb. 11 Verlauf des Hämatokrits[%]

In der Gruppe der unpräkonditionierten Tiere zeigte sich zum Zeitpunkt 0min (n=9) ein Hämatokrit von 15.93 ± 27.77 %. Nach 30min (n=7) 26.74 ± 6.77 %, nach 60min (n=9) 15.83 ± 15.58 %, nach 90min (n=9) 201.25 ± 72.44 %, nach 120min (n=7) 14.66 ± 4.58 %, nach 150min (n=9) 15.58 ± 6.55 % und nach 180min (n=8) 14.58 ± 4.96 %.

In der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zeigte sich zum Zeitpunkt 0min (n=8) ein Hämatokrit von 14.69 ± 1.07 %. Nach 30min (n=8) 13.85 ± 0.66 %, nach 60min (n=8) 13.74 ± 0.55 %, nach 90min (n=8) 13.59 ± 1.04 %, nach 120min (n=8) 17.41 ± 10.79 %, nach 150min (n=7) 12.26 ± 0.87 % und nach 180min (n=7) 9.16 ± 8.05 %.

Leukozyten

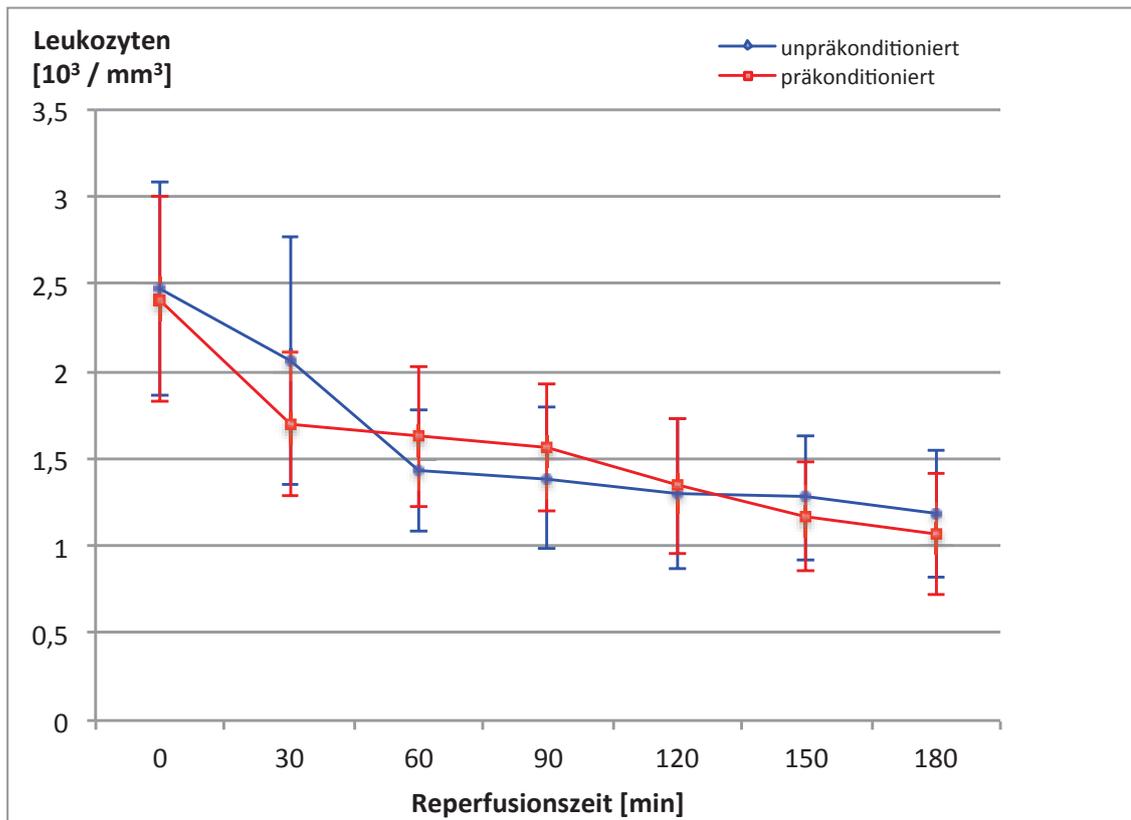


Abb. 12 Verlauf der Leukozytenzahl [$10^3 / \text{mm}^3$]

Vor Beginn der Reperfusion zeigt sich in der Gruppe unpräkonditionierten Tiere zum Zeitpunkt 0min (n=9) eine Leukozytenzahl von $2.48 \pm 0.81 \times 10^3 / \text{mm}^3$. Zum Zeitpunkt 30min (n=8) $2.06 \pm 0.87 \times 10^3 / \text{mm}^3$. Nach 60min (n=9) $1.43 \pm 0.47 \times 10^3 / \text{mm}^3$, nach 90min (n=9) $1.39 \pm 0.45 \times 10^3 / \text{mm}^3$, nach 120min (n=7) $1.3 \pm 0.48 \times 10^3 / \text{mm}^3$, nach 150min (n=9) $1.28 \pm 0.48 \times 10^3 / \text{mm}^3$ und nach 180 min (n=9) $1.19 \pm 0.45 \times 10^3 / \text{mm}^3$ Leukozyten.

Vor Beginn der Reperfusion zeigt sich in der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zum Zeitpunkt 0min (n=8) eine Leukozytenzahl von $2.41 \pm 0.72 \times 10^3 / \text{mm}^3$. Zum Zeitpunkt 30min (n=8) $1.70 \pm 0.50 \times 10^3 / \text{mm}^3$. Nach 60min (n=8) $1.63 \pm 0.49 \times 10^3 / \text{mm}^3$, nach 90min (n=8) $1.56 \pm 0.44 \times 10^3 / \text{mm}^3$, nach 120min (n=7) $1.34 \pm 0.43 \times 10^3 / \text{mm}^3$, nach 150min (n=7) $1.17 \pm 0.35 \times 10^3 / \text{mm}^3$ und nach 180 min (n=6) $1.07 \pm 0.37 \times 10^3 / \text{mm}^3$ Leukozyten.

Thrombozyten

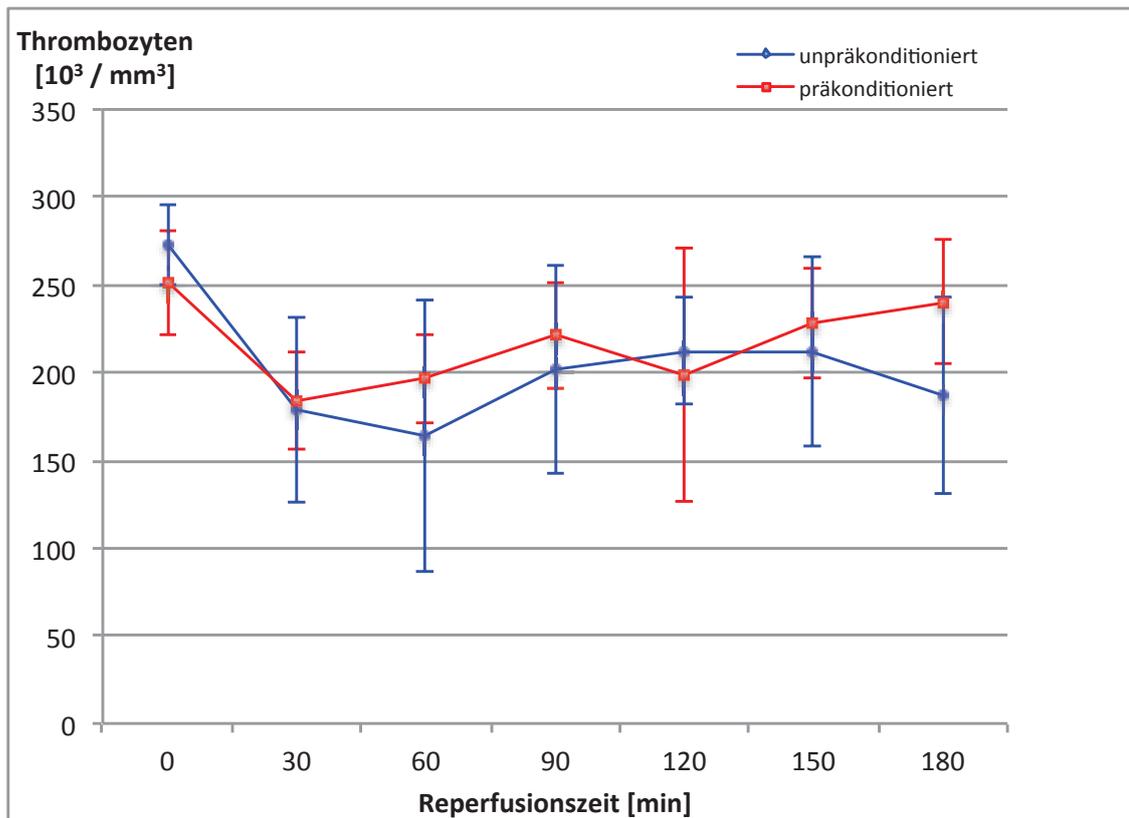


Abb. 13 Verlauf der Thrombozytenzahl [$10^3/\text{mm}^3$]

Vor Beginn der Reperfusion zeigt sich in der Gruppe unpräkonditionierten Tiere zum Zeitpunkt 0min (n=8) eine Thrombozytenzahl von $272.75 \pm 27.77 \times 10^3/\text{mm}^3$. Zum Zeitpunkt 30min (n=7) $179.00 \pm 59.13 \times 10^3/\text{mm}^3$. Nach 60min (n=8) $163.63 \pm 94.50 \times 10^3/\text{mm}^3$, nach 90min (n=8) $201.25 \pm 72.44 \times 10^3/\text{mm}^3$, nach 120min (n=6) $212.40 \pm 30.64 \times 10^3/\text{mm}^3$, nach 150min (n=8) $212.25 \pm 66.64 \times 10^3/\text{mm}^3$ und nach 180 min (n=7) $186.67 \pm 62.75 \times 10^3/\text{mm}^3$ Thrombozyten.

Vor Beginn der Reperfusion zeigt sich in der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zum Zeitpunkt 0min (n=8) eine Thrombozytenzahl von $250.63 \pm 36.38 \times 10^3/\text{mm}^3$. Zum Zeitpunkt 30min (n=8) $183.88 \pm 33.71 \times 10^3/\text{mm}^3$. Nach 60min (n=8) $196.13 \pm 30.39 \times 10^3/\text{mm}^3$, nach 90min (n=8) $221.00 \pm 36.73 \times 10^3/\text{mm}^3$, nach 120min (n=7) $198.63 \pm 88.32 \times 10^3/\text{mm}^3$, nach 150min (n=7) $228.57 \pm 35.35 \times 10^3/\text{mm}^3$ und nach 180 min (n=6) $240.17 \pm 35.86 \times 10^3/\text{mm}^3$ Thrombozyten.

5.2.2 Blutgasanalyse

pH-Wert

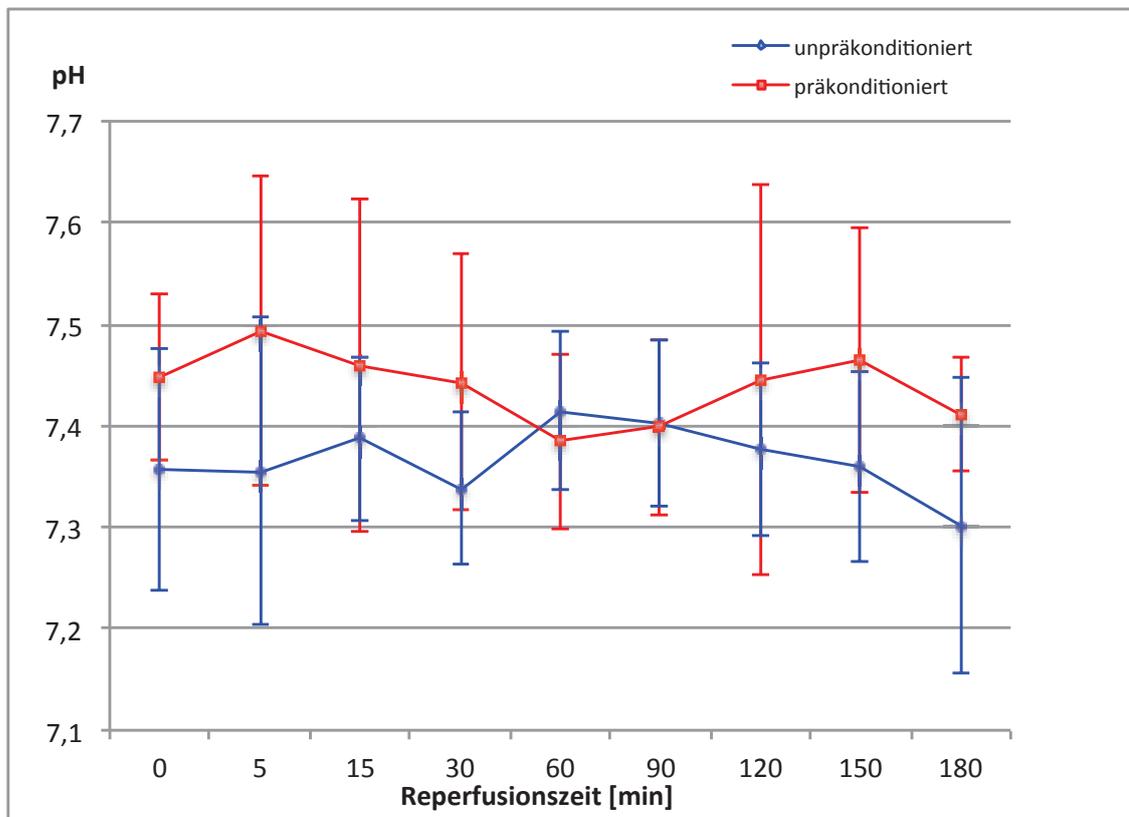


Abb. 14 Verlauf des pH- Wertes

In der Gruppe der unpräkonditionierten Tiere zeigt sich zum Zeitpunkt 0min (n=9) ein pH-Wert von 7.356 ± 0.149 . Nach 5min (n=9) ein Wert von 7.355 ± 0.185 , nach 15min (n=9) 7.388 ± 0.099 , nach 30min (n=7) 7.388 ± 0.091 , nach 60min (n=9) 7.415 ± 0.096 , nach 90min (n=9) 7.403 ± 0.101 , nach 120min (n=7) 7.377 ± 0.105 , nach 150min (n=9) 7.359 ± 0.104 und nach 180min (n=8) 7.302 ± 0.145 .

In der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zeigt sich zum Zeitpunkt 0min (n=8) ein pH-Wert von 7.448 ± 0.091 . Nach 5min (n=8) ein Wert von 7.493 ± 0.170 , nach 15min (n=8) 7.460 ± 0.183 , nach 30min (n=8) 7.442 ± 0.141 , nach 60min (n=8) 7.384 ± 0.096 , nach 90min (n=8) 7.398 ± 0.096 , nach 120min (n=8) 7.445 ± 0.215 , nach 150min (n=8) 7.465 ± 0.146 und nach 180min (n=7) 7.411 ± 0.062 .

pCO₂

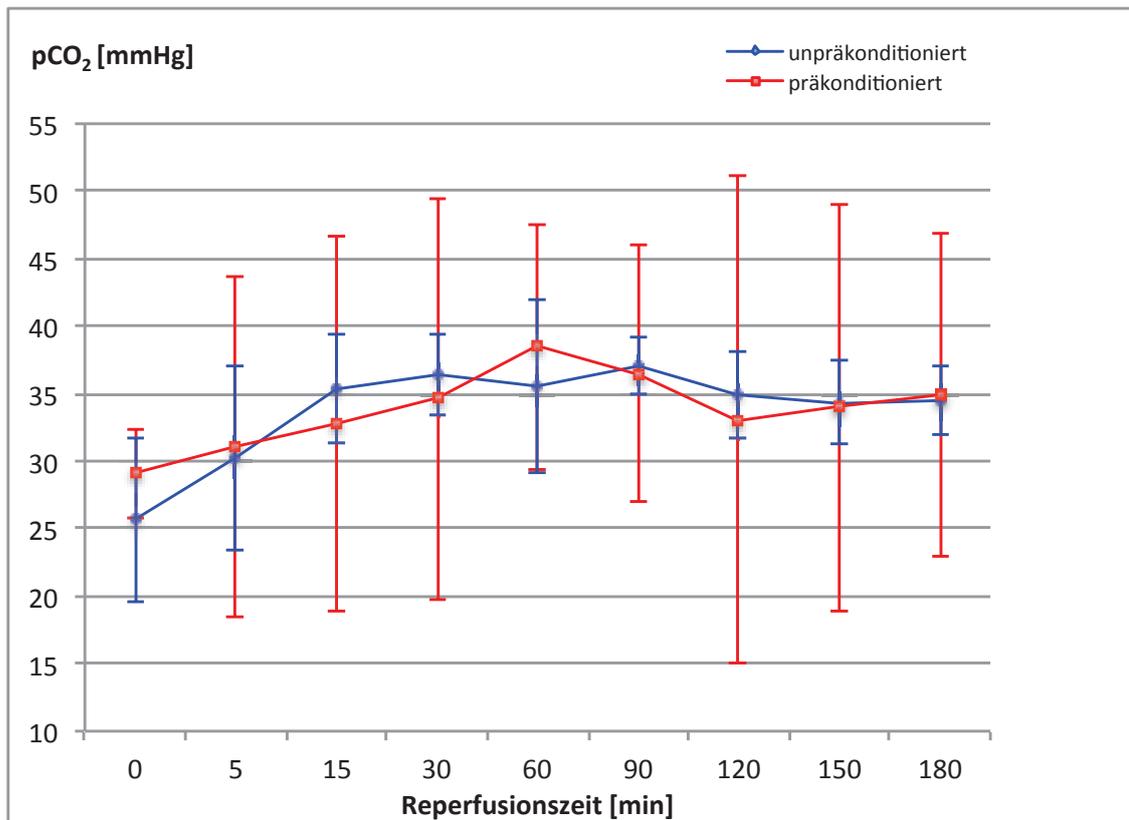


Abb. 15 Verlauf des pCO₂[mmHg]

In der Gruppe der nicht präkonditionierten Tiere zeigt sich zum Zeitpunkt 0min (n=8) ein pCO₂ von 25.70 ± 7.49 mmHg. Nach 5min (n=8) ein Wert von 30.25 ± 8.38 mmHg, nach 15min (n=8) 35.35 ± 4.90 mmHg, nach 30min (n=8) 36.38 ± 3.72 mmHg, nach 60min (n=8) 35.49 ± 7.87 mmHg, nach 90min (n=8) 37.13 ± 2.64 mmHg, nach 120min (n=8) 34.93 ± 3.95 mmHg, nach 150min (n=7) 34.31 ± 3.49 mmHg und nach 180min (n=6) 34.38 ± 2.51 mmHg.

In der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zeigt sich zum Zeitpunkt 0min (n=4) ein pCO₂ von 29.13 ± 2.40 mmHg. Nach 5min (n=4) ein Wert von 31.00 ± 9.09 mmHg, nach 15min (n=4) 32.78 ± 10.05 mmHg, nach 30min (n=4) 34.60 ± 10.74 mmHg, nach 60min (n=4) 38.45 ± 6.53 mmHg, nach 90min (n=4) 36.50 ± 6.86 mmHg, nach 120min (n=4) 33.05 ± 13.00 mmHg, nach 150min (n=4) 34.00 ± 10.88 mmHg und nach 180min (n=4) 34.85 ± 8.60 mmHg.

pO₂

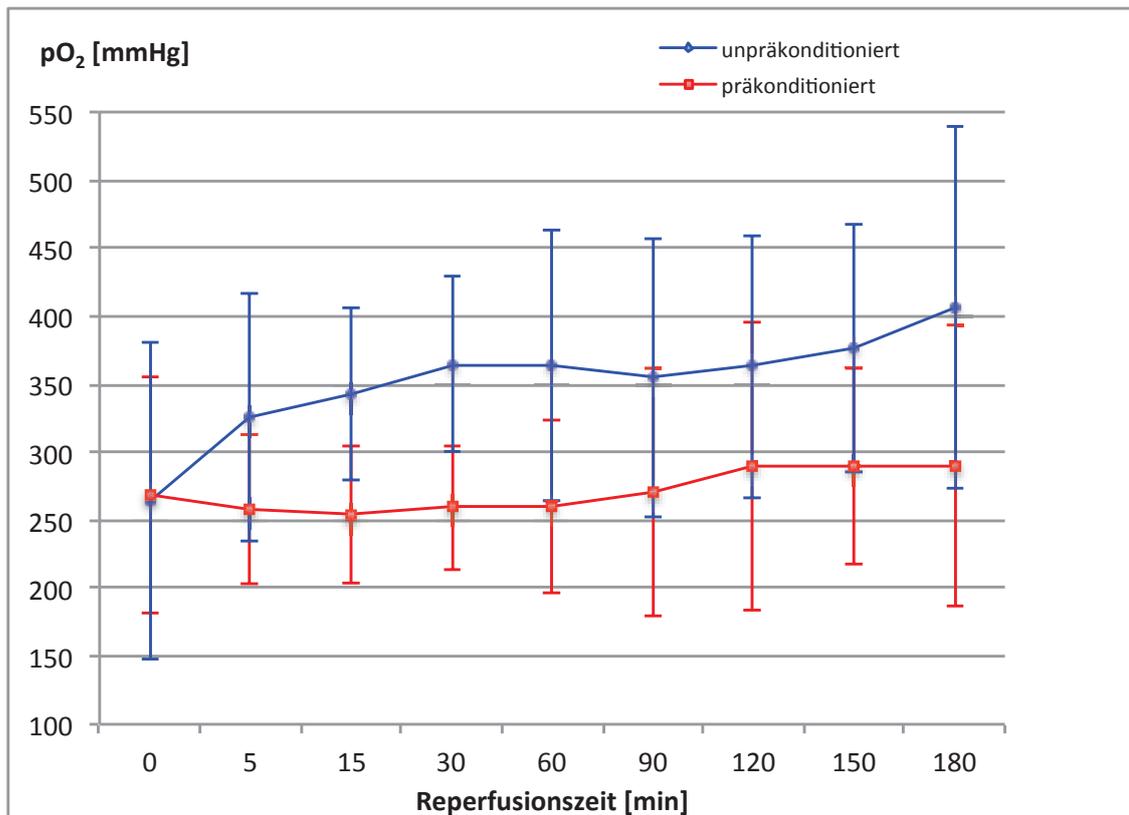


Abb. 16 Verlauf des pO₂[mmHg]

In der Gruppe der unpräkonditionierten Tiere zeigt sich zum Zeitpunkt 0min (n=8) ein pO₂ von 264.33 ± 143.30 mmHg. Nach 5min (n=8) ein Wert von 325.89 ± 112.64 mmHg, nach 15min (n=8) 342.40 ± 77.07 mmHg, nach 30min (n=8) 364.65 ± 78.67 mmHg, nach 60min (n=8) 363.91 ± 122.36 mmHg, nach 90min (n=8) 354.31 ± 354.31 mmHg, nach 120min (n=8) 362.88 ± 362.88 mmHg, nach 150min (n=7) 376.03 ± 102.49 mmHg und nach 180min (n=6) 406.12 ± 132.73 mmHg.

In der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zeigt sich zum Zeitpunkt 0min (n=4) ein pO₂ von 268.00 ± 62.26 mmHg. Nach 5min (n=4) ein Wert von 258.00 ± 39.40 mmHg, nach 15min (n=4) 254.50 ± 36.52 mmHg, nach 30min (n=4) 259.50 ± 33.01 mmHg, nach 60min (n=4) 260.25 ± 46.34 mmHg, nach 90min (n=4) 270.25 ± 65.71 mmHg, nach 120min (n=4) 289.75 ± 76.58 mmHg, nach 150min (n=4) 289.25 ± 51.87 mmHg und nach 180min (n=4) 290.50 ± 74.59 mmHg.

5.2.3 Leberwerte

Laktatdehydrogenase

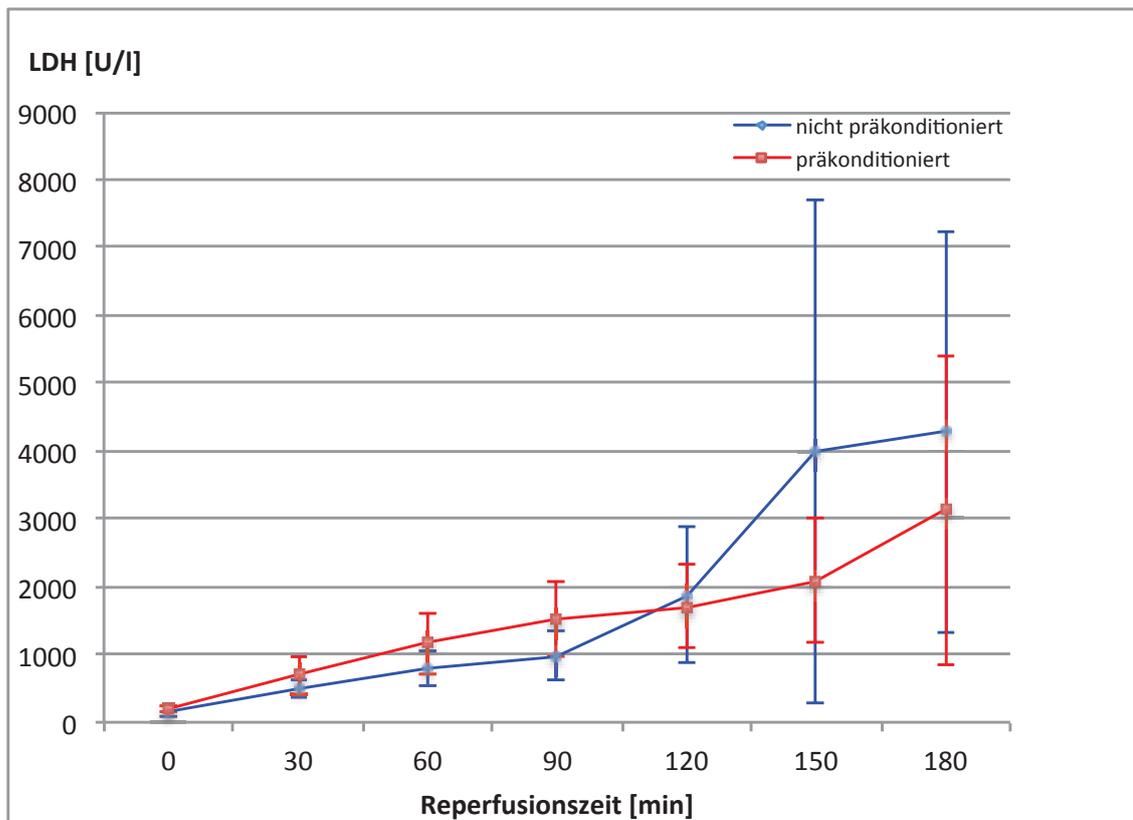


Abb. 17 Verlauf der Laktatdehydrogenase[U/l]

In der Gruppe der nicht präkonditionierten Tiere zeigt sich zu Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=9) eine LDH-Konzentration von 157.78 ± 93.26 U/l. Nach 30min (n=9) 485.22 ± 159.36 U/l, nach 60min (n=9) 789.78 ± 330.80 U/l, nach 90min (n=9) 983.44 ± 491.73 U/l, nach 120min (n=9) 1881.89 ± 1330.65 U/l, nach 150min (n=9) 3983.67 ± 4904.77 und nach 180min (n=9) eine LDH-Konzentration von 4273.11 ± 3911.28 U/l.

In der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zeigte sich zu Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=9) eine LDH-Konzentration von 196.29 ± 58.64 U/l. Nach 30min (n=9) 695.75 ± 344.31 U/l, nach 60min (n=9) 570.25 ± 330.80 U/l, nach 90min (n=9) 1532.75 ± 688.05 U/l, nach 120min (n=9) 1710.13 ± 746.67 U/l, nach 150min (n=9) 2084.50 ± 1124.61 und nach 180min (n=9) eine LDH-Konzentration von 3132.25 ± 2801.49 U/l.

Aspartat-Aminotransferase

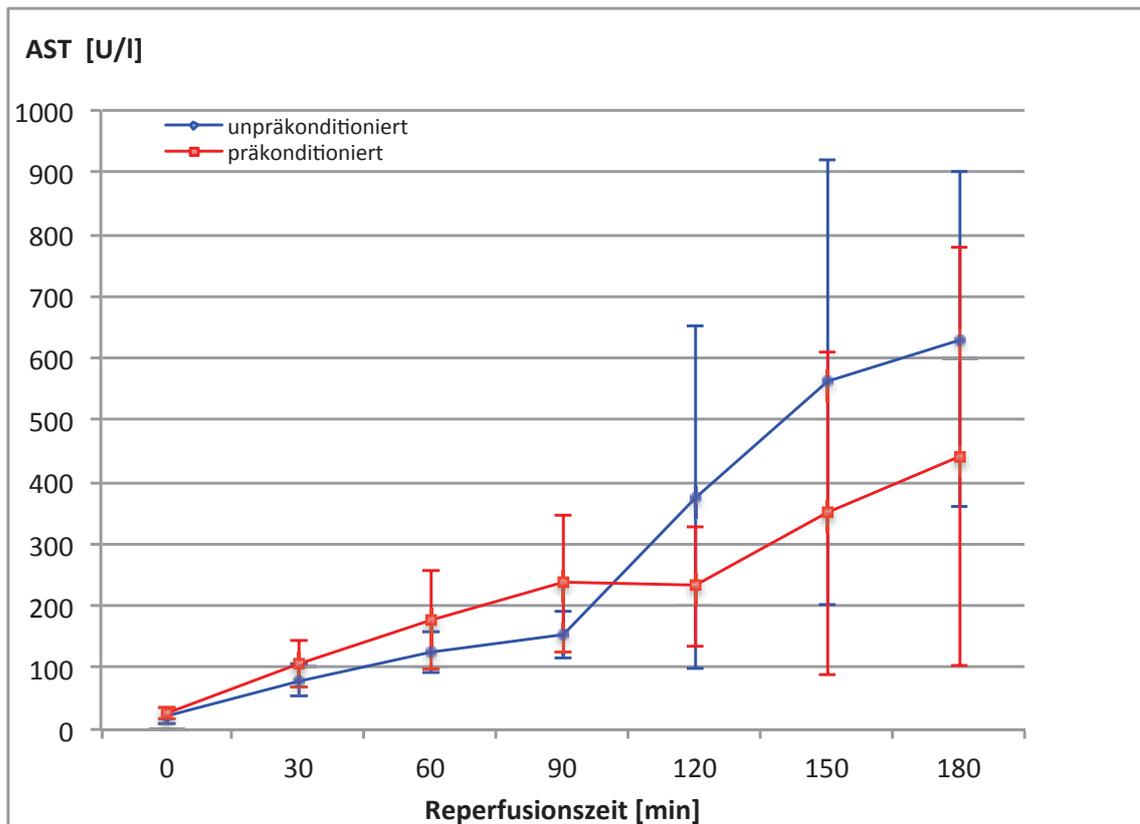


Abb. 18 Verlauf der Aspartat-Aminotransferase[U/l]

In der Gruppe der nicht prkonditionierten Tiere zeigte sich zu Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=9) eine AST-Konzentration von 21.78 ± 16.07 U/l. Nach 30min (n=9) 78.67 ± 34.95 U/l, nach 60min (n=9) 125.11 ± 44.47 U/l, nach 90min (n=9) 153.11 ± 52.07 U/l, nach 120min (n=9) 376.11 ± 367.97 U/l, nach 150min (n=9) 560.22 ± 475.49 und nach 180min (n=9) eine AST-Konzentration von 629.22 ± 359.01 U/l.

In der Gruppe der mit Etanercept prkonditionierten Tiere zeigte sich zu Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=8) eine AST-Konzentration von 25.50 ± 9.97 U/l. Nach 30min (n=8) 105.63 ± 45.75 U/l, nach 60min (n=8) 177.88 ± 98.10 U/l, nach 90min (n=8) 236.13 ± 137.60 U/l, nach 120min (n=8) 231.63 ± 119.82 U/l, nach 150min (n=8) 349.63 ± 320.26 U/l und nach 180min (n=8) eine AST-Konzentration von 442.13 ± 415.63 U/l.

Alanin-Aminotransferase

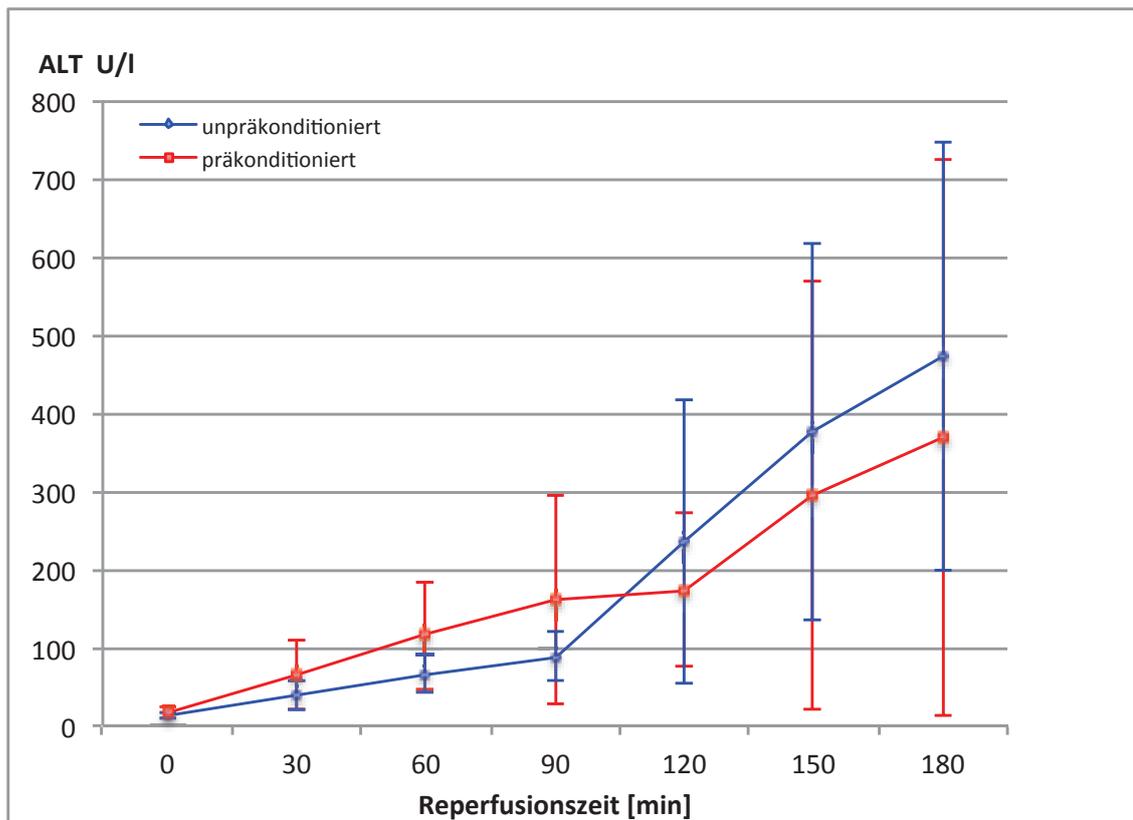


Abb. 19 Verlauf der Alanin-Aminotransferase[U/l]

In der Gruppe der nicht präkonditionierten Tiere zeigte sich zu Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=9) eine ALT-Konzentration von 13.00 ± 4.39 U/l. Nach 30min (n=9) 78.89 ± 24.39 U/l, nach 60min (n=9) 65.56 ± 32.11 U/l, nach 90min (n=9) 89.00 ± 41.26 U/l, nach 120min (n=9) 236.00 ± 240.92 U/l, nach 150min (n=9) 376.56 ± 321.15 U/l und nach 180min (n=9) eine ALT-Konzentration von 473.22 ± 363.83 U/l.

In der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zeigte sich zu Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=8) eine ALT-Konzentration von 16.00 ± 9.13 U/l. Nach 30min (n=8) 65.38 ± 54.18 U/l, nach 60min (n=8) 115.38 ± 85.52 U/l, nach 90min (n=7) 161.29 ± 149.35 U/l, nach 120min (n=8) 173.13 ± 121.15 U/l, nach 150min (n=8) 294.25 ± 335.08 U/l und nach 180min (n=8) eine ALT-Konzentration von 368.75 ± 437.17 U/l.

Alkalische Phosphatase

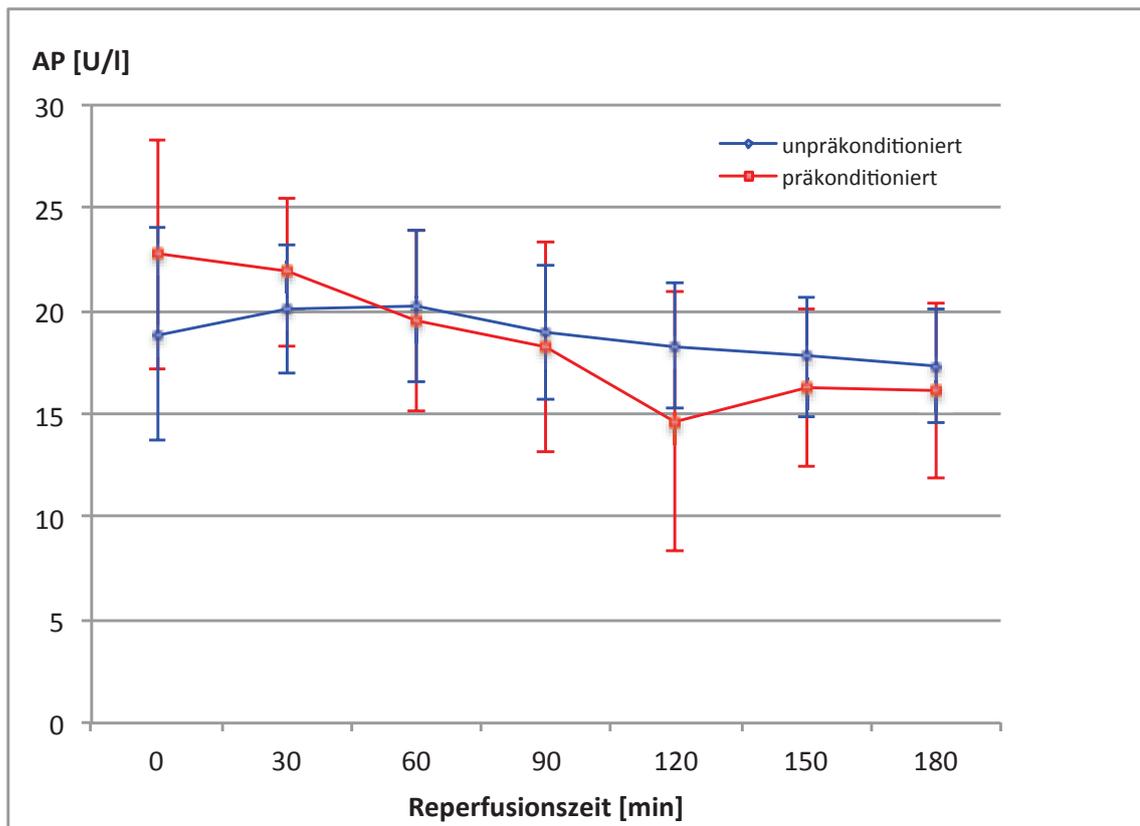


Abb. 20 Verlauf der Alkalische Phosphatase[U/l]

In der Gruppe der nicht präkonditionierten Tiere zeigte sich zu Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=9) eine AP-Konzentration von 18.89 ± 6.88 U/l. Nach 30min (n=9) 20.11 ± 4.20 U/l, nach 60min (n=9) 20.22 ± 4.84 U/l, nach 90min (n=9) 19.00 ± 4.36 U/l, nach 120min (n=9) 18.33 ± 4.09 U/l, nach 150min (n=9) 17.78 ± 3.87 U/l und nach 180min (n=9) eine AP-Konzentration von 17.33 ± 3.71 U/l.

In der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere zeigte sich zu Beginn der Reperfusion zum Zeitpunkt 0min (n=8) eine AP-Konzentration von 22.75 ± 6.82 U/l. Nach 30min (n=8) 21.88 ± 4.39 U/l, nach 60min (n=8) 19.50 ± 5.40 U/l, nach 90min (n=8) 18.25 ± 6.23 U/l, nach 120min (n=8) 14.63 ± 7.71 U/l, nach 150min (n=8) 16.25 ± 4.71 U/l und nach 180min (n=8) eine AP-Konzentration von 16.13 ± 5.22 U/l.

5.3 Physikalische Messparameter

5.3.1 Portale Flussrate

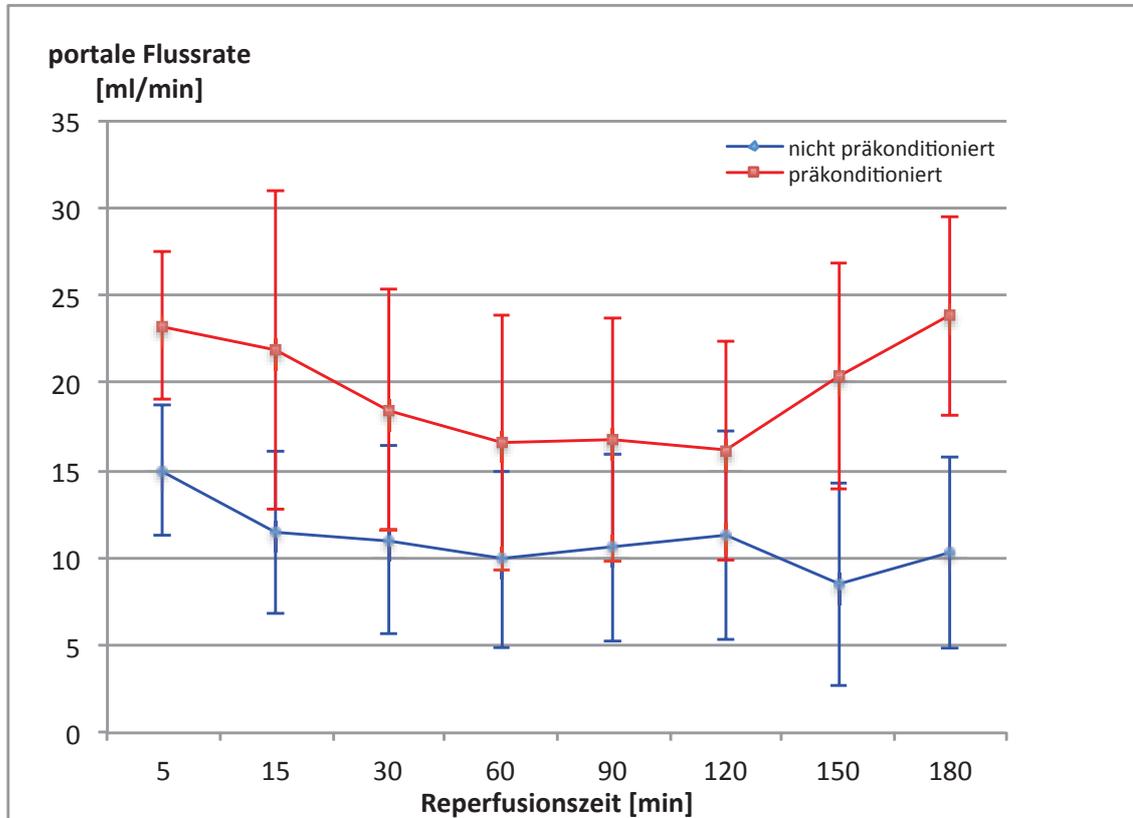


Abb. 21 Verlauf der portalen Flussrate[ml/min]

In der Gruppe der nicht präkonditionierten Tiere zeigte sich zum Zeitpunkt 5min (n=8) eine portale Flussrate von 15.02 ± 4.37 ml/min. Nach 15 min (n=8) 11.46 ± 5.36 ml/min, nach 30min (n=7) 11.01 ± 5.84 ml/min, nach 60min (n=7) 9.89 ± 5.42 ml/min, nach 90min (n=7) 10.58 ± 5.76 ml/min, nach 120min (n=7) 11.29 ± 6.48 ml/min, nach 150min (n=7) 8.52 ± 6.28 ml/min und nach 180min (n=7) eine portale Flussrate von 10.31 ± 5.94 ml/min.

In der Gruppe der präkonditionierten Tiere zeigte sich zum Zeitpunkt 5min (n=8) eine portale Flussrate von 23.26 ± 4.88 ml/min. Nach 15 min (n=8) 21.86 ± 10.52 ml/min, nach 30min (n=8) 18.47 ± 7.93 ml/min, nach 60min (n=8) 16.55 ± 8.37 ml/min, nach 90min (n=8) 16.77 ± 8.07 ml/min, nach 120min (n=8) 16.17 ± 7.27 ml/min, nach 150min (n=7) 20.36 ± 7.01 ml/min und nach 180min (n=7) eine portale Flussrate von 23.85 ± 6.16 ml/min.

5.3.2 Galle-Produktion

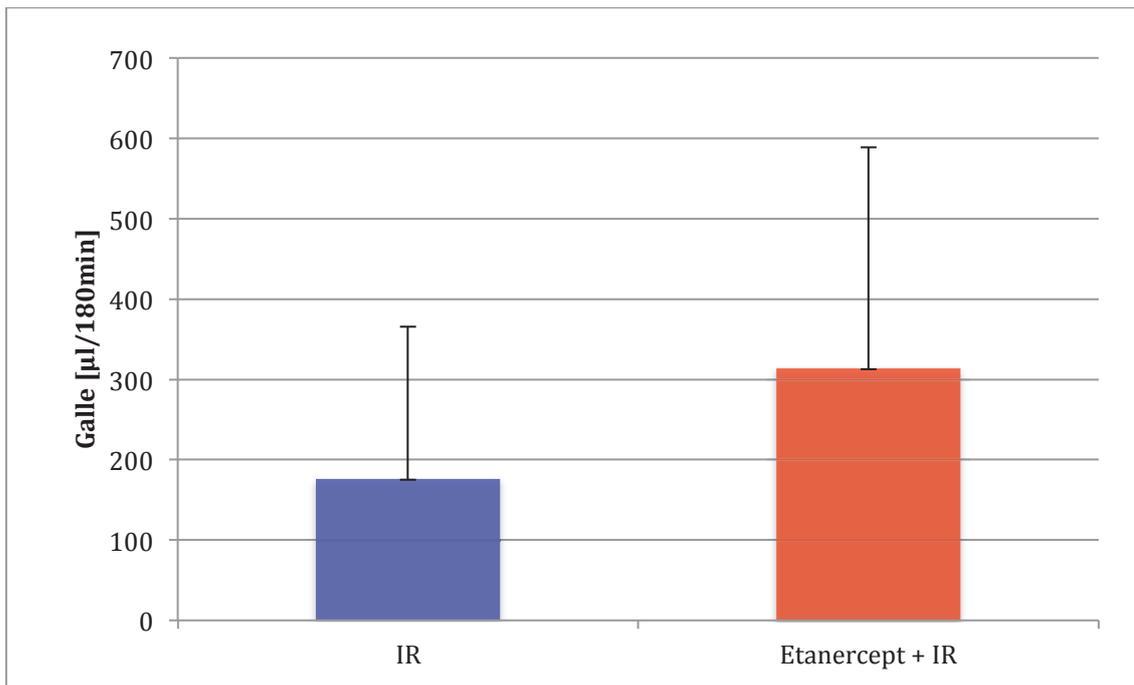


Abb. 22 Galleproduktion nach Ischämie- und Reperfusion(IR) sowie nach Präkondition mit Etanercept und Ischämie-und Reperfusion (Etanercept + IR):

In der Gruppe der nicht präkonditionierten Tiere zeigte sich eine Galleproduktion Reperfusion von $176,13 \pm 189,8 \mu\text{l}/180\text{min}$.

In der Gruppe der präkonditionierten Tiere zeigte sich eine Galleproduktion Reperfusion von $313,75 \pm 275,1 \mu\text{l}/180\text{min}$.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methode

6.1.1 Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber nach Miller ist ein etabliertes *ex vivo* Modell zur Untersuchung der Leberphysiologie und -pathophysiologie bei Ratten (Gores, Kost und Larusso 1986). Es ermöglicht die Induktion eines zellulären Schadens in einem isolierten Setting (Bessems et al. 2006a). Das Modell der IPRL hat sich bei der Entwicklung von Präventions- und Behandlungsstrategien zur Reduktion des hepatischen IRS bewährt.

Im Gegensatz zu *in vitro* Modellen (isolierte Hepatozyten, Lebergewebsschnitte) bleiben beim IPRL-Modell die Leberarchitektur (zonale Heterogenität, Polarität und vaskuläre Integrität) und damit die Zellintegrität und der Gallefluss erhalten. Es ermöglicht damit auch Aussagen zu nicht parenchymatösen Zellen (Ferrigno, Richelmi und Vairetti 2013). Gegenüber *in vitro* Modellen hat das IPRL den Vorteil, dass es unabhängig ist von extrahepatischen Faktoren wie Herz-Kreislauf, Blutbestandteilen oder hormonregulatorischen Faktoren. Dadurch erlaubt es die präzise Kontrolle der experimentellen Konditionen und macht die Versuche daher reproduzierbarer.

Grundsätzlich handelt es sich bei dem Modell der isoliert perfundierten Rattenleber um einen Kompromiss zwischen klinischer Realität und einer experimentellen Vereinfachung. Die Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse aus tierexperimentellen Studien auf die klinische Praxis gestaltete sich auf Grund anatomischer sowie physiologischer Differenzen als äußerst schwierig. Dies erklärt die große Diskrepanz zwischen tierexperimentellen Studien und der Anzahl an Interventionen zur Präkondition des IRS in der klinischen Praxis.

Ob ein neues Therapieregime, wie eine Präkonditionierung mittels Etanercept zur Hemmung von TNF α , zu einer Reduktion des IRS führt, kann letztlich nur eine Transplantation zeigen. Die Beurteilung der tatsächlichen Leberfunktion sowie deren Schädigung kann in einem isolierten Modell nur bedingt beurteilt werden.

6.1.2 Operation

Um genaue und reproduzierbare Resultate zu erzielen, sind mikrochirurgische Fähigkeiten und ein akkurates Setting im Perfusionssystem notwendig. Um diese Voraussetzungen zu schaffen, bedurfte es einer Einarbeitungszeit von ca. acht Monaten. Zur Etablierung des Modells wurde von Februar 2012 bis Oktober 2012 zunächst die Operationstechnik erlernt. Dabei wurden 82 Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250g operiert. Diese Tiere sind nicht in die endgültige Statistik aufgenommen worden. Herr Leon Philip erlernte die Technik der Reperfusion im Zeitraum von Februar 2012 bis Oktober 2012. Dabei erlernte er das Blutabnehmen aus der *Aorta abdominalis* an 132 Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 400-450g.

Anästhesie

Die Operation wurde wie unter 4.2.3 beschrieben unter Allgemeinanästhesie mit Isofluran durchgeführt. Bei einem niedrigen Blut- Gas- Verteilungskoeffizienten von 1,40 ist die Narkose dabei sehr gut steuerbar. Daneben wirkt Isofluran bronchodilatatorisch und hat eine geringere Hepatotoxizität als andere Anästhetika (Walter 2016, 39). Isofluran hat jedoch eine ausgeprägt atemdepressive Wirkung (Althaus 2010, 126), so dass eine engmaschige kontinuierliche Beurteilung der thorakalen Atemexkursionen notwendig ist.

Hepatektomie

Im Zuge der Operation kann es durch die Luxation des Darmgekröses nach extraabdominell zu einer Darmischämie kommen. Dies galt es durch regelmäßige Kontrolle der Darmperfusion an Hand der Farbe und der Peristaltik zu beurteilen und gegebenenfalls zu korrigieren. Außerdem können minimale Kompressionstraumata der Leber zu Thrombosierungen einzelner Leberabschnitte führen, die einen maßgeblichen Effekt auf die Höhe der Transaminasen sowie auf die portale Flussrate ausüben. Daher war es von entscheidender Bedeutung, auf Kompressionen mit sofortiger Dekompression zu reagieren.

Ein relevanter Parameter zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit der Methodik war die Dauer der Hepatektomie. Mit zunehmender Explantationsdauer nimmt die Zeit der warmen Ischämie und somit des hepatozellulären Schadens zu. Daher sind die Versuchstiere von der statistischen Auswertung ausgeschlossen worden, bei denen die Hepatektomie eine Dauer von 40 Minuten überschritten hat.

Gallengangsligatur

Um im Rahmen der Reperfusion Galle zu asservieren, war eine Kanülierung des *Ductus hepaticus* notwendig. Die Kanülierung mit einem Polyethylenröhrchen (I.D.0.58mm/O.D. 0.0965mm) konnte durch eine distale Ligatur vereinfacht werden. Hierdurch füllte sich der Gallengang und dessen Diameter nahm zu. Durch Anspannen des prall gefüllten Gallengangs war die Kanülierung nach der Inzision mit einer mikrochirurgischen geschwungenen Federschere erleichtert. Dabei galt es die Gallengangskanüle so zu platzieren, dass sie nicht zu weit vorgeschoben wurde und den Gallefluss des rechten Leberlappens okkludierte. Bei Versuchstier #27 war von einer solchen Situation auszugehen, da im Rahmen der Reperfusion keine Galle gefördert wurde, obwohl sich die Leber vollständig perfundiert zeigte.

Portalvenenkanülierung

Die Portalvenenkanülierung wurde jeweils vor Beginn der Reperfusion durchgeführt. Um die kalte Ischämie nicht zu unterbrechen, wurde das Gefäß, in dem die Leber konserviert wurde, auf Eis gebettet. Hierbei war es jedoch unvermeidbar, dass es während der Kanülierung zu Temperaturschwankungen im Konservierungsmedium kam.

Mit Hilfe des Mikroskops wurden die *suprahepatische V.cava* und anschließend die *infrahepatische V.cava* kanüliert. Dabei war darauf zu achten, dass die Gefäße vom umliegenden Fettgewebe befreit und die Kanülierung ohne Einschluss von Luftblasen durchgeführt wurde. Luftblasen können während der Reperfusion zur Ausbildung von Thromben im perfundierten Lebergewebe führen.

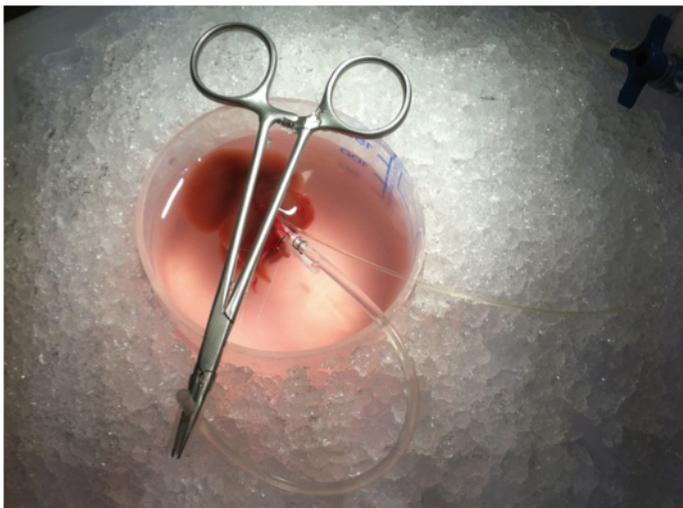


Abb. 23 explantierte Leber, die Pfortader, der Gallengang und die V. cava sind entsprechend kanüliert

6.1.3 Ischämie

Die zu Beginn dieser Versuchsreihe angestrebte kalte Ischämie von 44 Stunden (Redaelli et al. 2002), welche auf Vorarbeiten mit UW-Lösung beruhten, führte mit HTK-Lösung zu derart ausgeprägten Leberschäden, dass von einem vollständigen Leberschaden ausgegangen werden musste. Daher wurde die kalte Ischämie auf 24 Stunden verkürzt. Hierbei zeigte sich ein reproduzierbarer cholestatischer Leberschaden, ohne eine vollständige Leberdestruktion zu riskieren. Die Arbeiten von Huet et al zeigten, dass eine kalte Ischämie von 42 Stunden mit einer 100 prozentigen Mortalität einhergeht wohingegen eine kalte Ischämie von 24 Stunden mit einem 100 prozentigen Überleben einhergeht (Huet et al. 2004).

6.1.4 Konservierung

Das Konservierungsmedium dient neben der kalten Aufbewahrungsmöglichkeit der Aufrechterhaltung der hepatischen Homöostase, der Unterstützung des Lebermetabolismus sowie der Verzögerung des Zellschadens.

Zu Beginn dieser experimentellen Arbeiten erfolgte die Konservierung der explantierten Leber in UW-Lösung. Hierbei handelt es sich um eine hochvisköse kolloidale Lösung (HES) mit hoher Kalium- und niedriger Natrium-Konzentration. Die Viskosität führt zu einer Mikrozirkulationsstörung; das Kalium zu einer Kardioplegie (Belzer und Southard 1988).

Aufgrund von Lieferengpässen musste auf ein anderes Medium zurückgegriffen werden, sodass HTK-Brettschneider'sche Lösung zur Konservierung verwendet wurde. Diese hat eine geringerer Viskosität und Kaliumkonzentration mit dem geringeren Risiko einer Kardioplegie bei Reperfusion (Adam, Cailliez und Karam 2017). Insgesamt war das Outcome nach Lebertransplantation bei beiden Konservierungsmeiden vergleichbar (Lema Zuluaga, Serna Agudelo und Zuleta Tobón 2013).

Diese Untersuchungen zeigten, dass die Konservierung in HTK-Brettschneider'sche-Lösung zu einem ausgeprägterem Ischämieschaden führte, sodass von die initiale Ischämiezeit von 44 auf 24 Stunden reduziert werden konnte. Studien zeigten jedoch, dass es keinen signifikanten Unterschied des IRS nach Konservierung in UW-Lösung oder HTK-Brettschneider'sche-Lösung gab. Dabei lagen die Kosten der Konservierung mit HTK deutlich unter denen mit UW-Lösung (Martínez et al. 2014).

Bestandteil	g/L	Mmol/l
Pentafraktion	50	NA
Laktobionsäure	35,83	105
Kaliumphosphat	3,4	25
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1,23	5
Raffinose-Pentahydrat	17,83	30
Adenosin	1,34	5
Allopurinol	0,136	1
Gesamt-Gluthation	0,922	3
Kaliumhydroxid	5,61	100
Kaliumhydroxid/Salzsäure	Auf pH 7,4 einstellen	NA
Wasser zur Injektion	q.s.	NA

Tab. 1 Zusammensetzung Belzer UW Lösung

Bestandteile in 1,000ml Custodiol®	entsprechend
0,8766g Natrium-Chlorid	15 mmol/l
0,710g Kalium-Chlorid	9 mmol/l
0,1842g Kaliumhydrogen-2-ketoglutarat	1 mmol/l
0,8132g Magnesium-Chlorid 6 H ₂ O	4 mmol/l
3,7733g Histidin HCL H ₂ O	18 mmol/l
27,9289g Histidin	180 mmol/l
0,4085g Tryptophan	2 mmol/l
5,4615g Mannitol	30 mmol/l
0,0022g Kalziumchlorid 2 H ₂ O	0,015 mmol/l

Tab. 1 Zusammensetzung HTK-Brettschneider-Lösung(“Prescribing Info | Custodiol HTK” n.d.)

6.1.5 Reperfusion

In dieser Arbeit wurde die monovaskuläre anterograde Perfusion nach Bessems et al, die wohl gebräuchlichste Form der Perfusion (Bessems et al. 2006) angewandt. Hierbei sollte ein Perfusionsdruck von 12mmHg nicht überschritten werden. Eine Elevation des Perfusionsdrucks führt letztlich zu einem Barotrauma in den Lebersinusoiden und somit zu einer Destruktion von Sinusendothelzellen.

6.1.6 Präkondition

In der Vergangenheit wurden verschiedene Methoden zur Präkondition auf ihre Wirksamkeit untersucht. Dabei sind Methoden zur chirurgischen, pharmakologischen sowie gentechnischen Präkondition herausgearbeitet worden.

Ischämische Präkondition

Murray et al beschrieben erstmalig einen kardioprotektiven Effekt einer ischämischen Präkondition (Murry, Jennings and Reimer 1986). Im Anschluss daran folgten einige Studien zur Untersuchung des hepatoprotektiven Effektes einer ischämischen Präkondition. Azzoulay et al. zeigten, dass eine ischämische Präkondition von 10 Minuten mit anschließender 30 minütiger Reperfusion den Anstieg von Serumtransaminasen nach Transplantation signifikant senkt (Azzoulay et al. 2005). Eine neue Metaanalyse zeigte jedoch, dass eine ischämische Präkondition keinen signifikanten Effekt auf den Transaminasenanstieg nach Lebertransplantation hat (Gurusamy et al. 2008). Hier zeigt sich eine deutliche Diskrepanz zwischen tierexperimentellen und klinischen Studien.

Pharmakologische Präkondition

Der IRS ist ein multifaktorieller Prozess. Daher machten es sich einige Arbeitsgruppen zur Aufgabe, die einzelnen Signalwege pharmakologisch zu beeinflussen. Kotsch et al. untersuchten den Effekt einer Methylprednisolontherapie des Spenders umgehend nach Hirntoddiagnose. Hierbei zeigte sich die Konzentration proinflammatorischer Zytokine (IL-2, IL-6, TNF α) sowie serumaktiver Transaminasen signifikant reduziert (Kotsch et al. 2008). Kristo et al. untersuchten die Wirkung einer Infusion von Tacrolimus, einem immunmodulatorischen Calcineurininhibitor, über die Portalvene. Die Untersuchungen zeigten keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration der Transaminasen nach LTX, aber eine reduzierte Genexpression inflammatorischer Moleküle (Kristo et al. 2011).

Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, kommt es während der Reperfusion zu einer Mikrozirkulationsstörung. Diese beruht zum einen auf einer Schädigung der Sinusendothelzellen und zum anderen auf der reduzierten Konzentration von Stickstoffmonoxid (NO), einem endogenen Vasodilatator. Lang et al. untersuchten den Einfluss der Inhalation von Stickstoffmonoxid während der operativen Phase vor Einleitung der Reperfusion. Hierbei zeigte sich eine raschere Reduktion des nach LTX aufgetretenen Transamina-

senanstiegs. Die NO-Inhalation zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Expression proinflammatorischer Zytokine (Lang et al. 2014).

Minou et al. untersuchten den Effekt des volatilen Anästhetikums Sevofluran auf den IRS. Hierbei konnte die Inzidenz eines PNF Spenderorganes mit einer *Steatosis hepatis* reduziert werden (Minou et al. 2012). Beck-Schimmer et al. konnten jedoch in einer multizentrischen randomisiert kontrollierten Studie keinen hepatoprotektiven Effekt nachweisen (Beck-Schimmer et al. 2015).

N-Acetyl-Cystein ist eine synthetische Verbindung, welche einem ausgeprägten *first-pass Effekt* unterliegt. In Hepatozyten wird es in Cystein umgewandelt und dient somit als Baustein des endogenen Radikalpuffers Gluthation (GSH). Tierexperimentelle Studien zeigten eine signifikante Reduktion der Transaminasen nach LTX durch Präkondition mit N-Acetyl-Cystein (Alexandropoulos et al. 2017), wohingegen dieser Effekt in humanen Studien nicht nachweisbar war (Steib et al. 1998; Hilmi et al. 2010).

Rüdiger et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass die TNF α Blockade mittels Pentoxifyllin zu einer Reduktion der Serum Aspartat Aminotransferase sowie zu einem verlängerten Überleben im Mausmodell führt. Dabei schrieb die Arbeitsgruppe dem TNF α eine Apoptose induzierende Rolle in der Leber zu (Rüdiger und Clavien 2002).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Sauerstoffpartialdruck

Diese Versuche zeigten einen niedrigeren Sauerstoffpartialdruck in der Gruppe der mit Etanercept präkonditionierten Tiere. Ein niedriger Sauerstoffpartialdruck bei gleichbleibendem Kohlendioxidpartialdruck spricht für einen gesteigerten Sauerstoffverbrauch. Es ist davon auszugehen, dass der höhere Sauerstoffverbrauch auf einen erhöhten Sauerstoffumsatz zurückzuführen ist, der wiederum durch eine größere Anzahl an funktionsfähigen Hepatozyten zu erklären ist.

Parenchymatöse Schädigung durch Ischämie und Reperfusion

Zur Evaluation des hepatischen Schadens nach kalter Ischämie und Reperfusion wurde die hepatischen Transaminasen (AST, ALT) sowie die Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt. AST und ALT sind Enzyme der hepatischen Gluconeogenese. Die ALT findet sich ausschließlich in der Leber, wohingegen die AST auch in Herz, Nieren, Gehirn, Pankreas und Erythrozyten zu finden sind. Daher gilt die ALT als ein spezifischer Marker für einen hepatischen Parenchymschaden. Die ALT befindet sich ausschließlich im Zytosol. Die Aspartat-Aminotransferase (AST) findet sich sowohl im Zytosol als auch im Mitochondrium.

Ein Serumkonzentrationsanstieg der Transaminasen spricht für einen Schaden der hepatzellulären Membran mit erhöhter Permeabilität (Dietel, Suttorp und Zeitz 2008, 2376). Dabei ermöglicht die absolute Erhöhung der Serumkonzentration der Transaminasen bei mangelnder Korrelation keine prognostische Aussage. Serumkonzentrationserhöhungen von mehr als 1000 U/l sprechen jedoch für einen ischämischen oder toxischen Leberschaden (Dietel, Suttorp und Zeitz 2008, 2376).

Vorausgegangene Arbeiten zeigten, dass die Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens zu einem Anstieg der TNF α Konzentration führt (Karatzas et al. 2014). Dabei führt das proinflammatorische Zytokin TNF α neben IL-1 sowie Interferon- γ zu vermehrter Sauerstoffradikalproduktion. Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, führen Sauerstoffradikale über Lipidperoxidation zur Desintegration von Membranbestandteilen und somit zu einer erhöhten Membranpermeabilität. Hierbei kommt es unter anderem zum Ausschwemmen von AST und ALT.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten nach kalter Ischämie einen stetigen Anstieg der Serumtransaminasen während der Reperfusion. Dabei lagen die Werte der Serumtransaminasen (AST, ALT) der Gruppe 2 (nicht präkonditioniert) zu Beginn unter denen der Gruppe 3 (präkonditioniert). Nach 90 minütiger Reperfusion zeigten sich jedoch im Vergleich höhere Konzentrationen der Serumtransaminasen in Gruppe 2. Hierbei lag jedoch kein signifikanter Unterschied vor.

Mahmoud El Shazly et al. zeigten in ihrer Studie 2012, dass TNF α den Ischämie- und Reperfusionsschaden fördert und eine TNF α -Inhibition unter anderem mit Infliximab und Pentoxifyllin zur Reduktion des IRS führt. Diese Reduktion wurde unter anderem auf eine Reduktion des oxidativen Stresses sowie eine reduzierte Expression von TNF α , TNF1R und NF- κ B zurückgeführt. Darüber hinaus konnte in Studien gezeigt werden, dass eine TNF α -Inhibition den intestinalen IRS minimiert. Das Ausmaß der Wirkung der TNF α Hemmung war dabei abhängig von der Etanercept-Konzentration. Dabei schienen niedrige Konzentrationen von 1 mg/kg TNF α zu blockieren und die Transaminasen AST und ALT sowie die hepatozelluläre Apoptose zu reduzieren. Hohe Konzentrationen an Etanercept von 8mg/kg führten zu einem Anstieg der Transaminasen und der hepatozellulären Apoptose. Das heißt, dass ein protektiver Effekt bei niedrigen Konzentrationen zu erwarten ist (Y. Dong et al. 2016).

Einen Zusammenhang zwischen Apoptosereduktion und damit verbundenem reduzierten Leberparenchymschaden zeigte eine Studie, die eine intestinale ischämische Präkondition und deren Einfluss auf den hepatischen IRS untersucht hat. Hierbei zeigte sich in der Gruppe der intestinalen ischämischen Präkondition eine gesteigerte Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 sowie eine reduzierte Expression apoptotischer Proteine wie Bax und NF- κ Bp65. Dabei legt die Studie nahe, dass eine intestinale ischämische Präkondition die hepatozelluläre Apoptose mildert und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reduziert und dadurch den hepatozellulären Parenchymschaden minimiert (XUE et al. 2016).

Die Laktat-Dehydrogenase ist ein unspezifisches Enzym, welches jedoch sehr früh bei Hypoxie oder oxidativem Stress im Blut nachzuweisen ist (Dave, Maru und Jain 2016). Sie ist neben der Leber auch in Gehirn, Niere sowie Muskelzellen zu finden. Da das IPRL Modell ein *ex vivo* Modell ist, kann die LDH hier jedoch als leberspezifischer Marker zur Detektion eines oxidativen Stresses oder einer Hypoxie herangezogen wer-

den. Diese Arbeit zeigt zu Beginn der Reperfusion minimal höhere Serumkonzentrationen für LDH in Gruppe 3. Nach 120 minütiger Reperfusion stieg jedoch die Serumkonzentration der Gruppe 2 deutlich an und lag damit über dem Mittelwert der Serumkonzentrationen der Gruppe 3. Es handelte sich um einen nicht signifikanten Unterschied (siehe Abb. 15).

Die Arbeiten von Jiao et al 2014 zeigten, dass Etanercept sowie eine Präkondition mit geringen Dosen von TNF α Serumtransaminasen senken und den Leberparenchymschaden reduzieren (Jiao et al. 2014). Anders als erwartet zeigte diese Arbeit keinen signifikanten Effekt einer pharmakologischen Präkondition mit Etanercept auf die Serumkonzentration der AST und ALT.

Hepatische Funktionsparameter

Zur Beurteilung der globalen hepatischen Funktion wurde die während der Reperfusion produzierte Galle über den *Ductus choledochus* asserviert. Darüber hinaus diente die Galleproduktion als Parameter für einen hepatischen Schaden und als Indikator für den Ischämie und Reperfusionsschaden (Nieuwenhuijs et al. 2006).

Die Galleproduktion ist das Ergebnis einer osmotischen Filtration, bei der aktive Transportprozesse sowie osmotische Diffusion eine Rolle spielen (Reshetnyak 2013). Dabei entspricht die hepatische Gallensäuresekretion einer passiven transhepatischen Filtration von Wasser und Elektrolyten aus dem Blut in das Lumen der Gallengangskanälchen. Diese Filtration erfolgt entlang eines osmotischen Gradienten, der wiederum durch einen aktiven ATP-abhängigen Transport organischer und anorganischer Ionen aufgebaut wird (Meier 1989). Dabei wird die Transportrichtung osmotisch aktiver Gallensäuren durch die Polarität der Hepatozyten von basal nach apikal vorgegeben (Treyer und Müsch 2013). Durch Ischämie kommt es zur Depletion energiereicher Phosphate und so zum Verfall des osmotischen Gradienten und zum Stillstand der Gallensäuresekretion. Dies führt letztlich zum Rückstau der Gallensäure und somit zur intrahepatischen Cholestase. Durch die Wiederaufnahme der Leberperfusion im Rahmen der Reperfusion werden radikale Sauerstoffspezies gebildet. Diese wiederum schädigen insbesondere Cholangiozyten, was die Cholestase verstärkt. (Roma und Sanchez Pozzi 2008)

Das Volumen der sezernierten Galle der isoliert extrakorporal reperfundierten Leber weicht von der *intrakorporal* reperfundierten Leber deutlich ab. Dies liegt unter ande-

rem am Fehlen hormoneller Einflussfaktoren sowie an dem nicht vorhandenem enterohepatischen Kreislauf.

Diese Arbeit zeigte ein größeres Volumen ($313,75\mu\text{l}/180\text{min}$) an produzierter Galle nach Präkondition mittels Etanercept. Dabei handelt es sich jedoch nicht um eine signifikante Änderung der Galleproduktion nach Inhibition von $\text{TNF}\alpha$ mittels Etanercept.

Studien zeigen, dass $\text{TNF}\alpha$, welches durch Kupfferzellen produziert wird, zu einem progredientem hepatozellulären Schaden führt (Tilg 2001;Hoebe et al. 2001). Durch Präkondition mittels Etanercept wurde durch Reduktion des IRS eine reduzierte intrahepatische Cholestase sowie eine raschere Erhöhung von der durch Ischämie induzierten ATP-Depletion erwartet. Ein Einfluss der Galleproduktion durch Präkondition mittels Etanercept konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

Portale Flussrate

Die portale Flussrate gibt Aufschluss darüber, mit welcher Geschwindigkeit die Reperfusion voranschreitet.

Diese Arbeit zeigte eine leicht gesteigerte portale Flussrate nach Präkonditionierung mittels Etanercept, wobei sie zu Beginn der Reperfusion (5 Minuten) sowie am Ende der Reperfusion (180 Minuten) ein Signifikanzniveau erreichte.

Durch die Schädigung der Endothelzellen im Rahmen der Reperfusion kommt es zum Verlust der Barrierefunktion der Endothelzellen und somit zur Leukozytenmigration ins umliegende Parenchym (Vollmar et al. 1994; Hartmut Jaeschke 2003; Konishi und Lentsch 2017). Dies führt zur Inflammation mit interstitiellem Ödem und somit zur Kompression der Lebersinusoide, was dann zu einem erhöhten intravasalen Widerstand und zur reduzierten Perfusion führt. Gallengänge sowie Lebervenen sind die vorherrschende Quelle für $\text{TNF}\alpha$ (Loffreda et al. 1997). Durch Präkondition mittels Etanercept wird dort ausgeschütteter $\text{TNF}\alpha$ blockiert. Damit kann der gesteigerten Gefäßpermeabilität (Wisse et al. 2008) und dem daraus folgenden Parenchymödem entgegen gewirkt werden.

Wie bereits unter 1.2.2 beschrieben, stimuliert $\text{TNF}\alpha$ die Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen. Diese führen letztlich zur intravasalen Leukozytenadhärenz mit einhergehender Stase sowie einer Inflammationsreaktion durch Neutrophilenmigra-

tion ins umliegende Gewebe. Dabei korreliert die gestörte Mikrozirkulation mit dem Anstieg an hepatischen Transaminasen (ALT, AST) (Xie et al. 2018).

Zusätzlich kommt es zu einer Dysbalance zwischen vasokonstriktiven (ET-1) und vasodilatativen (NO) Substanzen, welche sich schließlich in einer sinusoidalen Stase äußert und den portalvenösen Fluss reduziert. Studien haben gezeigt, dass der Regulation einer NO/ET-1-Dysregulation eine wichtige Rolle zur Reduktion des IRS zu kommt (Rubbo, Darley-Usmar und Freeman 1996; Abu-Amara et al. 2012). Stickstoffmonoxid (NO) wird durch die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) katalysiert und aus L-Arginin gebildet. Diese Reaktion benötigt NADPH sowie O₂ (Deutzmann et al. 2008, 633). Es gibt verschiedene Isoformen der Stickstoffsynthase (NOS). Unter physiologischen Bedingungen stellt die endotheliale Stickstoffsynthase (e-NOS) den Hauptlieferanten von NO endothelialer Zellen dar (Domenico 2004). Stimuliert wird sie durch intravasale Scherkräfte (Kolluru et al. 2010) und metabolischen Stress (Bouma et al. 2010), wie er im Rahmen der Ischämie auftritt. Das durch die e-NOS produzierte NO unterdrückt die Endothelinproduktion der Endothelzellen. Darüber hinaus ist NO ein endogener TNF α -Inhibitor und somit in der Lage, den IRS zu minimieren (Katsumi et al. 2009). Wie unter 1.4 beschrieben, stimuliert TNF α unter anderem die iNOS, welche zu einer massiven NO-Produktion führt und eine zytotoxische Wirkung aufweist. Ob NO eine zytoprotektive oder eine zytotoxische Wirkung hat, ist abhängig von der Konzentration. Dabei führt eine NO-Überproduktion zur Apoptose (Choi et al. 2002). Die in diesen Arbeiten verbesserte portalvenöse Flussrate kann somit unter anderem mit einer gehemmten i-NOS Aktivierung und einer NO induzierten Vasodilatation im Endothelbett erklärt werden.

Pulitano et al. zeigten in ihrer Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Endothelinkonzentration im Serum und Parametern der Mikrozirkulation. Dieser Zusammenhang wird wiederum zur Detektion eines frühen Organversagens nach Transplantation herangezogen.

7 Fazit

Mit den Versuchen der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss des TNF α -Inhibitors Etanercept auf den hepatischen IRS bei einer Konservierung in HTK-Lösung sowie nach einer kalten Ischämie von 24 Stunden untersucht. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Etanercept auf ausgewählte hepatische Schädigungs- sowie Funktionsparameter.

Im Gegensatz zu anderen Studien, die den Einfluss eines TNF α -Inhibitors auf den IRS während einer *in vivo* Cholestase durch Okklusion des *Ductus choledochus* untersuchen, verfolgte diese Arbeit das Ziel, Aussagen zur Wirkung einer TNF α -Inhibition auf den IRS, machen zu können, wie sie im Rahmen einer Lebertransplantation erfolgen würde.

Die Konservierung in HTK-Lösung ging, anders als in UW-Lösung, mit einem ausgeprägterem Leberschaden nach kalter Ischämie von 44 Stunden einher. Daher wurde die kalte Ischämiezeit auf 24 Stunden reduziert.

Die Untersuchung serologischer Parameter, des kleinen Blutbildes (Hb, Htk, Leukozyten, Thrombozyten) sowie der serumaktiven Enzyme (LDH, AST, ALT, AP) zeigten keinen protektiven Effekt von Etanercept auf den IRS.

Unter Etanercept konnte der Anstieg serumaktiver Enzyme, der für einen hepatischen IRS spricht, nicht signifikant reduziert werden.

Unter Etanercept zeigte sich eine signifikant verbesserte portale Flussrate zu Beginn der Reperfusion sowie am Ende der Reperfusion.

Zur weiteren Untersuchung des Effektes einer TNF α -Inhibition mittels Etanercept kann die Durchführung von Apoptose-Nachweis mittels TUNEL-Essay sowie eine histologische Aufarbeitung der Leber nützlich sein.

Inwiefern eine Präkondition mittels Etanercept eine klinische Anwendung findet, muss durch weitere experimentelle und insbesondere klinische Studien geklärt werden.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abu-Amara**, Mahmoud, Shi Yu Yang, Alexander Seifalian, Brian Davidson, and Barry Fuller. 2012. "The Nitric Oxide Pathway--Evidence and Mechanisms for Protection against Liver Ischaemia Reperfusion Injury." *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 32 (4): 531–43. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02755.x>.
- Adam**, R., V. Cailliez, and V. Karam. 2017. "Evaluation of HTK Preservation Solutions in Liver Transplantation: A Long-Term Propensity-Based Analysis of Outcome From the European Liver Transplant Registry." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 17 (2): 585–86. <https://doi.org/10.1111/ajt.14009>.
- Alexandropoulos**, Dimitrios, Gerasimos V. Bazigos, Ilias P. Doulamis, Aspasia Tzani, Panagiotis Konstantopoulos, Nikolitsa Tragotsalou, Agathi Kondipafiti, et al. 2017. "Protective Effects of N-Acetylcystein and Atorvastatin against Renal and Hepatic Injury in a Rat Model of Intestinal Ischemia-Reperfusion." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 89 (May): 673–80. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.086>.
- Aldinger**, Ingo. 2005. *Chirurgische Forschung*. Georg Thieme Verlag.
- Althaus**, Felix R. 2010. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin: 131 Tabellen*. Georg Thieme Verlag.
- Azoulay**, Daniel, Massimo Del Gaudio, Paola Andreani, Philippe Ichai, Mylène Sebag, René Adam, Olivier Scatton, et al. 2005. "Effects of 10 Minutes of Ischemic Preconditioning of the Cadaveric Liver on the Graft's Preservation and Function: The Ying and the Yang." *Annals of Surgery* 242 (1): 133–39.
- Baker**, S. J., and E. P. Reddy. 1998. "Modulation of Life and Death by the TNF Receptor Superfamily." *Oncogene* 17 (25): 3261–70. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202568>.
- Bazzoni**, Flavia, and Bruce Beutler. 1996. "The Tumor Necrosis Factor Ligand and

Receptor Families." *New England Journal of Medicine* 334 (26): 1717–25.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199606273342607>.

Beck-Schimmer, Beatrice, John M. Bonvini, Erik Schadde, Philipp Dutkowski, Christian E. Oberkofler, Mickael Lesurtel, Michelle L. DeOliveira, et al. 2015. "Conditioning With Sevoflurane in Liver Transplantation: Results of a Multicenter Randomized Controlled Trial." *Transplantation* 99 (8): 1606–12.
<https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000644>.

Beger, H.-G., A. Schwarz, U. B. Brückner, and W. Hartel. 2013. *Forschung in der Chirurgie: Konzepte, Organisation, Schwerpunkte: Eine Bestandsaufnahme — Universitäre Einrichtungen*. Springer-Verlag.

Belzer, F. O., and J. H. Southard. 1988. "Principles of Solid-Organ Preservation by Cold Storage." *Transplantation* 45 (4): 673–76.

Bessems, M., N. A. 't Hart, R. Tolba, B. M. Doorschodt, H. G. D. Leuvenink, R. J. Ploeg, T. Minor, and T. M. van Gulik. 2006a. "The Isolated Perfused Rat Liver: Standardization of a Time-Honoured Model." *Laboratory Animals* 40 (3): 236–46. <https://doi.org/10.1258/002367706777611460>.

Bouma, Hjalmar R., Marlies E. Ketelaar, Benito A. Yard, Rutger J. Ploeg, and Robert H. Henning. 2010. "AMP-Activated Protein Kinase as a Target for Preconditioning in Transplantation Medicine." *Transplantation* 90 (4): 353–58.
<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181e7a3aa>.

Caldwell-Kenkel, Jane C., Robert T. Currin, Yukio Tanaka, Ronald G. Thurman, and John J. Lemasters. 1989. "Reperfusion Injury to Endothelial Cells Following Cold Ischemic Storage of Rat Livers." *Hepatology* 10 (3): 292–99.
<https://doi.org/10.1002/hep.1840100307>.

Caldwell-Kenkel, J. C., R. T. Currin, Y. Tanaka, R. G. Thurman, and J. J. Lemasters. 1991. "Kupffer Cell Activation and Endothelial Cell Damage after Storage of Rat Livers: Effects of Reperfusion." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 13 (1): 83–95.

Caldwell-Kenkel, J. C., R. G. Thurman, and J. J. Lemasters. 1988. "Selective Loss of Nonparenchymal Cell Viability after Cold Ischemic Storage of Rat Livers." *Transplantation* 45 (4): 834–37.

- Caraceni**, Paolo, Ho S Ryu, David H van Thiel, and AndréB Borle. 1995. "Source of Oxygen Free Radicals Produced by Rat Hepatocytes during Postanoxic Reoxygenation." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1268 (3): 249–54. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(95\)00077-6](https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)00077-6).
- Carini**, R., G. Bellomo, A. Benedetti, R. Fulceri, A. Gamberucci, M. Parola, M. U. Dianzani, and E. Albano. 1995. "Alteration of Na⁺ Homeostasis as a Critical Step in the Development of Irreversible Hepatocyte Injury after Adenosine Triphosphate Depletion." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 21 (4): 1089–98.
- Carini**, Rita, Riccardo Autelli, Giorgio Bellomo, and Emanuele Albano. 1999. "Alterations of Cell Volume Regulation in the Development of Hepatocyte Necrosis." *Experimental Cell Research* 248 (1): 280–93. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4408>.
- Chen**, Xiao-Bo, and Ming-Qing Xu. 2014. "Primary Graft Dysfunction after Liver Transplantation." *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* 13 (2): 125–37. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(14\)60023-0](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(14)60023-0).
- Choi**, Byung-Min, Hyun-Ock Pae, Seon Il Jang, Young-Myeong Kim, and Hun-Taeg Chung. 2002. "Nitric Oxide as a pro-Apoptotic as Well as Anti-Apoptotic Modulator." *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35 (1): 116–26.
- Clavien**, P. A., J. R. Sanabria, A. Upadhaya, P. R. Harvey, and S. M. Strasberg. 1993. "Evidence of the Existence of a Soluble Mediator of Cold Preservation Injury." *Transplantation* 56 (1): 44–53.
- Clemens**, M. G., M. Bauer, B. H. Pannen, I. Bauer, and J. X. Zhang. 1997. "Remodeling of Hepatic Microvascular Responsiveness after Ischemia/reperfusion." *Shock (Augusta, Ga.)* 8 (2): 80–85.
- Dancygier**, Henryk. 2013. *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*. Springer-Verlag.
- Dave**, Anupama, Laxmi Maru, and Astha Jain. 2016. "LDH (Lactate Dehydrogenase): A Biochemical Marker for the Prediction of Adverse Outcomes in Pre-Eclampsia and Eclampsia." *Journal of Obstetrics and Gynaecology of India* 66 (1): 23–29. <https://doi.org/10.1007/s13224-014-0645-x>.

- Deutzmann**, Rainer, Karin Hauser, Roland Netzker, and Joachim Rassow. 2008. *Duale Reihe: Biochemie*. 2nd ed. Stuttgart: Thieme.
- Dietel**, Manfred, Norbert Suttorp, and Martin Zeitz. 2008. *Harrisons Innere Medizin: Deutsche Ausgabe. In Zusammenarbeit mit der Charité, 3 Bände inkl. Registerband*. 17., veränd. Aufl. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag.
- Domenico**, Regoli. 2004. "Pharmacology of Nitric Oxide: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies." *Current Pharmaceutical Design* 10 (14): 1667–76.
- Dong**, Yulong, Yuzhou Liu, Xingrui Kou, Yingying Jing, Kai Sun, Dandan Sheng, Guofeng Yu, et al. 2016. "The Protective or Damaging Effect of Tumor Necrosis Factor- α in Acute Liver Injury Is Concentration-Dependent." *Cell & Bioscience* 6: 8. <https://doi.org/10.1186/s13578-016-0074-x>.
- Dong**, Zheng, Pothana Saikumar, Joel M. Weinberg, and Manjeri A. Venkatachalam. 2006. "Calcium in Cell Injury and Death*." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1 (1): 405–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100218>.
- Donner**, Markus G., Stephanie Schumacher, Ulrich Warskulat, Jane Heinemann, and Dieter Häussinger. 2007. "Obstructive Cholestasis Induces TNF- α - and IL-1 β -Mediated Periportal Downregulation of Bsep and Zonal Regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2." *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 293 (6): G1134–46. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00079.2007>.
- Donner**, Markus G., Stefan A. Topp, Patricia Cebula, Anna Krienen, Thor Gehrman, Annika Sommerfeld, Roland Reinehr, et al. 2013. "HbG200-Mediated Preinduction of Heme Oxygenase-1 Improves Bile Flow and Ameliorates Pericentral Downregulation of Bsep and Mrp2 Following Experimental Liver Ischemia and Reperfusion." *Biological Chemistry* 394 (1): 97–112.
- Eigler**, F. W., H.-J. Peiper, F. W. Schildberg, J. Witte, and V. Zumtobel. 2013. *Stand und Gegenstand chirurgischer Forschung*. Springer-Verlag.
- Engerson**, T. D., T. G. McKelvey, D. B. Rhyne, E. B. Boggio, S. J. Snyder, and H. P. Jones. 1987. "Conversion of Xanthine Dehydrogenase to Oxidase in Ischemic

Rat Tissues." *The Journal of Clinical Investigation* 79 (6): 1564–70.
<https://doi.org/10.1172/JCI112990>.

Esposito, E., and S. Cuzzocrea. 2009. "TNF-Alpha as a Therapeutic Target in Inflammatory Diseases, Ischemia-Reperfusion Injury and Trauma." *Current Medicinal Chemistry* 16 (24): 3152–67.

Feng, S., N. P. Goodrich, J. L. Bragg-Gresham, D. M. Dykstra, J. D. Punch, M. A. DebbRoy, S. M. Greenstein, and R. M. Merion. 2006. "Characteristics Associated with Liver Graft Failure: The Concept of a Donor Risk Index." *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6 (4): 783–90.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01242.x>.

Ferrigno, Andrea, Plinio Richelmi, and Mariapia Vairetti. 2013. "Troubleshooting and Improving the Mouse and Rat Isolated Perfused Liver Preparation." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, Troubleshooting Pharmacological Methods*, 67 (2): 107–14.
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2012.10.001>.

Fruhauf, N.R., M. Malago, and C.E. Broelsch. 2002. "Ransplantation-Liver Transplantation--Indications and Results." *Medizinische Welt* 53: 361–65.

Ganschow, PD Dr R. 2007. "Krankheiten nach Lebertransplantation." *Monatsschrift Kinderheilkunde* 155 (11): 1048–53. <https://doi.org/10.1007/s00112-007-1613-7>.

Gasbarrini, A., A. B. Borle, H. Farghali, C. Bender, A. Francavilla, and D. Van Thiel. 1992. "Effect of Anoxia on Intracellular ATP, Na⁺i, Ca²⁺i, Mg²⁺i, and Cytotoxicity in Rat Hepatocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 267 (10): 6654–63.

Gores, Gregory J., Louis J. Kost, and Nicholas F. Larusso. 1986. "The Isolated Perfused Rat Liver: Conceptual and Practical Considerations." *Hepatology* 6 (3): 511–17. <https://doi.org/10.1002/hep.1840060331>.

Groot, H. de. 2005. "Die Schädigung viszeraler Organe durch Ischämie und Reperfusion. Abläufe in pathogenetischen Netzwerken." *Zentralblatt für Chirurgie* 130 (3): 202–12. <https://doi.org/10.1055/s-2005-836578>.

- Groot**, H. de, and U. Rauen. 2007. "Ischemia-Reperfusion Injury: Processes in Pathogenetic Networks: A Review." *Transplantation Proceedings* 39 (2): 481–84. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.12.012>.
- Groot**, Herbert de. 2013. "Ein Zusammenspiel vieler Variablen - Die Pathobiochemie der Gewebeschädigung bei der Transplantation," August. <http://duepublico.uni-duisburg-essen.de/go/unikate/1998/10/062-075>.
- Gurusamy**, K. S., Y. Kumar, D. Sharma, and B. R. Davidson. 2008. "Ischaemic Preconditioning for Liver Transplantation." *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 1 (January): CD006315. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006315.pub2>.
- Heinrich**, Peter C., Matthias Müller, and Lutz Graeve. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9., vollständig überarb. Aufl. 2014. Springer.
- Hille**, R., and T. Nishino. 1995. "Flavoprotein Structure and Mechanism. 4. Xanthine Oxidase and Xanthine Dehydrogenase." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (11): 995–1003.
- Hilmi**, Ibtesam A., Zhiyong Peng, Raymond M. Planinsic, Daniela Damian, Feng Dai, Yulia Y. Tyurina, Valerian E. Kagan, and John A. Kellum. 2010. "N-Acetylcysteine Does Not Prevent Hepatorenal Ischaemia-Reperfusion Injury in Patients Undergoing Orthotopic Liver Transplantation." *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 25 (7): 2328–33. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq077>.
- Hoebe**, K. H., R. F. Witkamp, J. Fink-Gremmels, A. S. Van Miert, and M. Monshouwer. 2001. "Direct Cell-to-Cell Contact between Kupffer Cells and Hepatocytes Augments Endotoxin-Induced Hepatic Injury." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 280 (4): G720–28. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.4.G720>.
- Hofmann**, Eberhard. 2006a. *Medizinische Biochemie systematisch*. 4., Aufl. Bremen: UNI-MED.
- Huet**, Pierre-Michel, Marcia R. Nagaoka, Geneviève Desbiens, Esther Tarrab, Anto-

ine Brault, Marie-Pierre Bralet, and Marc Bilodeau. 2004. "Sinusoidal Endothelial Cell and Hepatocyte Death Following Cold Ischemia-Warm Reperfusion of the Rat Liver." *Hepatology* 39 (4): 1110–19. <https://doi.org/10.1002/hep.20157>.

Inoue, Toru, Yukuo Yoshida, Motonobu Nishimura, Kazuhei Kurosawa, and Kunio Tagawa. 1993. "Ca²⁺-Induced, Phospholipase-Independent Injury during Reoxygenation of Anoxic Mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1140 (3): 313–20. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90071-M](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90071-M).

Jaeschke, Hartmut. 2003. "Molecular Mechanisms of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury and Preconditioning." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 284 (1): G15–26. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00342.2002>.

Jaeschke, H., and A. Farhood. 1991. "Neutrophil and Kupffer Cell-Induced Oxidant Stress and Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Liver." *The American Journal of Physiology* 260 (3 Pt 1): G355–62.

Jiao, Shu-Fan, Kai Sun, Xiao-Jing Chen, Xue Zhao, Ning Cai, Yan-Jun Liu, Long-Mei Xu, Xian-Ming Kong, and Li-Xin Wei. 2014. "Inhibition of Tumor Necrosis Factor Alpha Reduces the Outgrowth of Hepatic Micrometastasis of Colorectal Tumors in a Mouse Model of Liver Ischemia-Reperfusion Injury." *Journal of Biomedical Science* 21 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-1>.

Kalden, Joachim R. 2002. "Emerging Role of Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Rheumatic Diseases." *Arthritis Research* 4 Suppl 2: S34–40.

Karatzas, Theodore, Anna-Aikaterini Neri, Maria-Eleni Baibaki, and Ismene A. Dontas. 2014. "Rodent Models of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury: Time and Percentage-Related Pathophysiological Mechanisms." *The Journal of Surgical Research* 191 (2): 399–412. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.06.024>.

Karow, Thomas. 2014. *Pharmakologie Und Toxikologie 2015 Th. Karow*. Karow.

Katsumi, Hidemasa, Makiya Nishikawa, Hiroyuki Yasui, Fumiyoshi Yamashita, and

- Mitsuru Hashida. 2009. "Prevention of Ischemia/reperfusion Injury by Hepatic Targeting of Nitric Oxide in Mice." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 140 (August): 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.07.013>.
- Kerr**, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–57.
- Kischkel**, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Kramer, and M. E. Peter. 1995. "Cytotoxicity-Dependent APO-1 (Fas/CD95)-Associated Proteins Form a Death-Inducing Signaling Complex (DISC) with the Receptor." *The EMBO Journal* 14 (22): 5579–88.
- Kolluru**, Gopi Krishna, Swaraj Sinha, Syamantak Majumder, Ajit Muley, Jamila H. Siamwala, Ravi Gupta, and Suvro Chatterjee. 2010. "Shear Stress Promotes Nitric Oxide Production in Endothelial Cells by Sub-Cellular Delocalization of eNOS: A Basis for Shear Stress Mediated Angiogenesis." *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 22 (4): 304–15. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2010.02.004>.
- Konishi**, Takanori, and Alex B. Lentsch. 2017. "Hepatic Ischemia/Reperfusion: Mechanisms of Tissue Injury, Repair, and Regeneration." *Gene Expression* 17 (4): 277–87. <https://doi.org/10.3727/105221617X15042750874156>.
- Kotsch**, Katja, Frank Ulrich, Anja Reutzel-Selke, Andreas Pascher, W. Faber, P. Warnick, S. Hoffman, et al. 2008. "Methylprednisolone Therapy in Deceased Donors Reduces Inflammation in the Donor Liver and Improves Outcome after Liver Transplantation: A Prospective Randomized Controlled Trial." *Annals of Surgery* 248 (6): 1042–50. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e318190e70c>.
- Kristo**, Ivan, Julia Wilflingseder, Alexander Kainz, Julian Marschalek, Thomas Wekerle, Ferdinand Mühlbacher, Rainer Oberbauer, and Martin Bodingbauer. 2011. "Effect of Intraportal Infusion of Tacrolimus on Ischaemic Reperfusion Injury in Orthotopic Liver Transplantation: A Randomized Controlled Trial." *Transplant International: Official Journal of the European Society for*

Organ Transplantation 24 (9): 912–19. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2011.01284.x>.

Lang, John D., Alvin B. Smith, Angela Brandon, Kelley M. Bradley, Yuliang Liu, Wei Li, D. Ralph Crowe, et al. 2014. “A Randomized Clinical Trial Testing the Anti-Inflammatory Effects of Preemptive Inhaled Nitric Oxide in Human Liver Transplantation.” *PloS One* 9 (2): e86053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086053>.

Lauber, Dr K., I. H. Engels, and S. Wesselborg. 2004. “Apoptose: Prinzipien der Apoptosesignaltransduktion.” *Der Onkologe* 10 (1): S58–61. <https://doi.org/10.1007/s00761-003-0645-4>.

Lautz, H. U., F. W. Schmidt, M. J. Müller, and R. Pichlmayr. 1989. “Indikationen und Kontraindikationen der Lebertransplantation.” *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 114 (38): 1456–61. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1066783>.

Lemasters, J. J., C. J. Stemkowski, S. Ji, and R. G. Thurman. 1983. “Cell Surface Changes and Enzyme Release during Hypoxia and Reoxygenation in the Isolated, Perfused Rat Liver.” *The Journal of Cell Biology* 97 (3): 778–86.

Lema Zuluaga, G. L., R. E. Serna Agudelo, and J. J. Zuleta Tobón. 2013. “Preservation Solutions for Liver Transplantation in Adults: Celsior versus Custodiol: A Systematic Review and Meta-Analysis with an Indirect Comparison of Randomized Trials.” *Transplantation Proceedings* 45 (1): 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.02.031>.

Loffreda, S., R. Rai, S. Q. Yang, H. Z. Lin, and A. M. Diehl. 1997. “Bile Ducts and Portal and Central Veins Are Major Producers of Tumor Necrosis Factor Alpha in Regenerating Rat Liver.” *Gastroenterology* 112 (6): 2089–98.

Männel, D.N., and B. Echtenacher. 1999. “TNF in the Inflammatory Response.” In *Chemical Immunology and Allergy*, edited by R.S. Jack, 74:141–61. Basel: KARGER. <http://www.karger.com/doi/10.1159/000058757>.

Martínez, Jorge, Jean P. Bächler, Fabrizio Moisan, Javiera Torres, Ignacio Duarte, Rosa María Pérez, Carlos Benítez, et al. 2014. “[Outcomes using two preservation solutions (UW/HTK) in liver transplantation from brain death do-

nors].” *Revista Medica De Chile* 142 (10): 1229–37.
<https://doi.org/10.4067/S0034-98872014001000001>.

Medema, J. P., C. Scaffidi, F. C. Kischkel, A. Shevchenko, M. Mann, P. H. Krammer, and M. E. Peter. 1997. “FLICE Is Activated by Association with the CD95 Death-Inducing Signaling Complex (DISC).” *The EMBO Journal* 16 (10): 2794–2804. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2794>.

Meier, P. J. 1989. “The Bile Salt Secretory Polarity of Hepatocytes.” *Journal of Hepatology* 9 (1): 124–29.

Miller, L. L., C. G. Bly, M. L. Watson, and W. F. Bale. 1951. “The Dominant Role of the Liver in Plasma Protein Synthesis; a Direct Study of the Isolated Perfused Rat Liver with the Aid of Lysine-Epsilon-C14.” *The Journal of Experimental Medicine* 94 (5): 431–53.

Minou, Andrei F., Alexander M. Dzyadzko, Aliaksei E. Shcherba, and Oleg O. Rummo. 2012. “The Influence of Pharmacological Preconditioning with Sevoflurane on Incidence of Early Allograft Dysfunction in Liver Transplant Recipients.” *Anesthesiology Research and Practice* 2012: 930487. <https://doi.org/10.1155/2012/930487>.

Montalvo-Jave, Eduardo E., Tomas Escalante-Tattersfield, Jose A. Ortega-Salgado, Enrique Piña, and David A. Geller. 2008. “Factors in the Pathophysiology of the Liver Ischemia-Reperfusion Injury.” *The Journal of Surgical Research* 147 (1): 153–59. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.06.015>.

Moore, Derek E., Irene D. Feurer, Theodore Speroff, D. Lee Gorden, J. Kelly Wright, Ravi S. Chari, and C. Wright Pinson. 2005. “Impact of Donor, Technical, and Recipient Risk Factors on Survival and Quality of Life after Liver Transplantation.” *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)* 140 (3): 273–77. <https://doi.org/10.1001/archsurg.140.3.273>.

Murry, C. E., R. B. Jennings, and K. A. Reimer. 1986. “Preconditioning with Ischemia: A Delay of Lethal Cell Injury in Ischemic Myocardium.” *Circulation* 74 (5): 1124–36.

“National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Liver2 Transplantation-June 20–23, 1983.” 1984. *Hepatology* 4 (S1): 107S –

110S. <https://doi.org/10.1002/hep.1840040725>.

Nieuwenhuijs, Vincent B., Menno T. De Bruijn, Robert T. A. Padbury, and Gregory J. Barritt. 2006. "Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury: Roles of Ca²⁺ and Other Intracellular Mediators of Impaired Bile Flow and Hepatocyte Damage." *Digestive Diseases and Sciences* 51 (6): 1087–1102. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-8014-y>.

Oberholzer, Martin J. 2001. *Pathologie verstehen. Molekulare Grundlagen der allgemeinen Pathologie*. Stuttgart u.a.: Thieme, Stuttgart.

Peralta, Carmen, Mónica B. Jiménez-Castro, and Jordi Gracia-Sancho. 2013. "Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury: Effects on the Liver Sinusoidal Milieu." *Journal of Hepatology* 59 (5): 1094–1106. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.06.017>.

Petrat, Frank, Kerstin Boengler, Rainer Schulz, and Herbert de Groot. 2012. "Glycine, a Simple Physiological Compound Protecting by yet Puzzling Mechanism(s) against Ischaemia–reperfusion Injury: Current Knowledge." *British Journal of Pharmacology* 165 (7): 2059–72. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01711.x>.

pfizermed. 2015. "pfizermed.de: Enbrel® 25/50 mg Fertigspritze - Medikamente A - Z - Medikamente." April 2015. <https://www.pfizermed.de/medikamente/medikamente-a-bis-z/enbrelr-2550-mg-fertigspritze.htm>.

"Prescribing Info | Custodiol HTK." n.d. Accessed September 22, 2016. <http://www.custodiol.com/prescribing-info/>.

Pschyrembel, Willibald. 2014. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. 266., aktualisierte Aufl. Berlin: De Gruyter.

Redaelli, Claudio A., Ying-Hua Tian, Thomas Schaffner, Monika Ledermann, Hans U. Baer, and Jean-François Dufour. 2002. "Extended Preservation of Rat Liver Graft by Induction of Heme Oxygenase-1." *Hepatology* 35 (5): 1082–92. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33067>.

Reshetnyak, Vasilij Ivanovich. 2013. "Physiological and Molecular Biochemical

Mechanisms of Bile Formation." *World Journal of Gastroenterology* 19 (42): 7341–60. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i42.7341>.

Riemann, Jürgen Ferdinand, Wolfgang Fischbach, Peter R. Galle, and Joachim Mössner. 2007. *Gastroenterologie in Klinik und Praxis: Das komplette Referenzwerk für Klinik und Praxis*. 1st ed. Vol. 2. 2 vols. Thieme: Thieme.

Rodeck, Burkhard, and Klaus-Peter Zimmer. 2013. *Pädiatrische Gastroenterologie, Hepatologie und Ernährung*. Springer-Verlag.

Roma, Marcelo G., and Enrique J. Sanchez Pozzi. 2008. "Oxidative Stress: A Radical Way to Stop Making Bile." *Annals of Hepatology* 7 (1): 16–33.

Rubbo, H., V. Darley-USmar, and B. A. Freeman. 1996. "Nitric Oxide Regulation of Tissue Free Radical Injury." *Chemical Research in Toxicology* 9 (5): 809–20. <https://doi.org/10.1021/tx960037q>.

Rüdiger, Hannes A., and Pierre-Alain Clavien. 2002. "Tumor Necrosis Factor Alpha, but Not Fas, Mediates Hepatocellular Apoptosis in the Murine Ischemic Liver." *Gastroenterology* 122 (1): 202–10.

Russo, Lucia, Jorge Gracia-Sancho, Héctor García-Calderó, Giusi Marrone, Juan Carlos García-Pagán, Guillermo García-Cardeña, and Jaime Bosch. 2012. "Addition of Simvastatin to Cold Storage Solution Prevents Endothelial Dysfunction in Explanted Rat Livers." *Hepatology* 55 (3): 921–30. <https://doi.org/10.1002/hep.24755>.

Salvesen, G. S., and V. M. Dixit. 1999. "Caspase Activation: The Induced-Proximity Model." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20): 10964–67.

Schmid-Schönbein, Geeert, and D. Neil Granger. 2013. *Molecular Basis for Microcirculatory Disorders*. Springer Science & Business Media.

Schulze-Osthoff, K., D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg, and M. E. Peter. 1998. "Apoptosis Signaling by Death Receptors." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 254 (3): 439–59.

Serracino-Inglott, Ferdinand, Nagy A Habib, and Robert T Mathie. 2001. "Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury." *The American Journal of Surgery* 181 (2):

160–66. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(00\)00573-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(00)00573-0).

- Shuh**, Maureen, Humberto Bohorquez, George E. Loss, and Ari J. Cohen. 2013. “Tumor Necrosis Factor- α : Life and Death of Hepatocytes During Liver Ischemia/Reperfusion Injury.” *The Ochsner Journal* 13 (1): 119–30.
- Siegenthaler**, Walter, and Hubert Erich Blum. 2013. *Klinische Pathophysiologie*. Georg Thieme Verlag.
- Starzl**, T E, C G Groth, L Brettschneider, I Penn, V A Fulginiti, J B Moon, H Blanchard, A J Martin, and K A Porter. 1968. “Orthotopic Homotransplantation of the Human Liver.” *Annals of Surgery* 168 (3): 392–415.
- Steib**, A., G. Freys, F. Collin, A. Launoy, G. Mark, and K. Boudjema. 1998. “Does N-Acetylcysteine Improve Hemodynamics and Graft Function in Liver Transplantation?” *Liver Transplantation and Surgery: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 4 (2): 152–57.
- Stirpe**, F., E. della Corte, and With the technical assistance of E. Lorenzoni. 1969. “The Regulation of Rat Liver Xanthine Oxidase CONVERSION IN VITRO OF THE ENZYME ACTIVITY FROM DEHYDROGENASE (TYPE D) TO OXIDASE (TYPE O).” *Journal of Biological Chemistry* 244 (14): 3855–63.
- Strasberg**, Steven M., Todd K. Howard, Ernesto P. Molmenti, and Martin Hertl. 1994. “Selecting the Donor Liver: Risk Factors for Poor Function after Orthotopic Liver Transplantation.” *Hepatology* 20 (4): 829–38. <https://doi.org/10.1002/hep.1840200410>.
- Strassburg**, Univ-Prof Dr C. P., and M. P. Manns. 2009. “Lebertransplantation.” *Der Internist* 50 (5): 550–60. <https://doi.org/10.1007/s00108-008-2268-8>.
- Susin**, Santos A., Hans K. Lorenzo, Naoufal Zamzami, Isabel Marzo, Bryan E. Snow, Greg M. Brothers, Joan Mangion, et al. 1999. “Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor.” *Nature* 397 (6718): 441–46. <https://doi.org/10.1038/17135>.
- Szabó**, I., and M. Zoratti. 1992. “The Mitochondrial Megachannel Is the Permeability Transition Pore.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 24 (1): 111–

17.

- Tang**, P., null Hung M-C, and J. Klostergaard. 1996. "Human pro-Tumor Necrosis Factor Is a Homotrimer." *Biochemistry* 35 (25): 8216–25. <https://doi.org/10.1021/bi952182t>.
- Tapuria**, Niteen, Sameer Junnarkar, Mahmoud Abu-Amara, Barry Fuller, Alexander M. Seifalian, and Brian R. Davidson. 2012. "Modulation of Microcirculatory Changes in the Late Phase of Hepatic Ischaemia-Reperfusion Injury by Remote Ischaemic Preconditioning." *HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association* 14 (2): 87–97. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2011.00407.x>.
- Tilg**, H. 2001. "Cytokines and Liver Diseases." *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien De Gastroenterologie* 15 (10): 661–68.
- Torti**, F. M., B. Dieckmann, B. Beutler, A. Cerami, and G. M. Ringold. 1985. "A Macrophage Factor Inhibits Adipocyte Gene Expression: An in Vitro Model of Cachexia." *Science* 229 (4716): 867–69. <https://doi.org/10.1126/science.3839597>.
- Treyer**, Aleksandr, and Anne Müsch. 2013. "Hepatocyte Polarity." *Comprehensive Physiology* 3 (January): 243–87. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120009>.
- Vollmar**, B., J. Glasz, R. Leiderer, S. Post, and M. D. Menger. 1994. "Hepatic Microcirculatory Perfusion Failure Is a Determinant of Liver Dysfunction in Warm Ischemia-Reperfusion." *The American Journal of Pathology* 145 (6): 1421–31.
- Walter**, Striebel Hans. 2016. *Anästhesie - Intensivmedizin - Notfallmedizin: Für Studium und Ausbildung*. Schattauer Verlag.
- Wang**, Cun-Yu, Marty W. Mayo, Robert G. Korneluk, David V. Goeddel, and Albert S. Baldwin. 1998. "NF- κ B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress Caspase-8 Activation." *Science* 281 (5383): 1680–83. <https://doi.org/10.1126/science.281.5383.1680>.
- Wanner**, G. A., W. Ertel, P. Müller, Y. Höfer, R. Leiderer, M. D. Menger, and K. Messmer. 1996. "Liver Ischemia and Reperfusion Induces a Systemic Inflamma-

tory Response through Kupffer Cell Activation.” *Shock (Augusta, Ga.)* 5 (1): 34–40.

Wanner, G. A., P. Müller, R. Leiderer, M. D. Menger, and PD Dr W. Ertel. 1995. “Ischämie-Reperfusion der Leber führt über eine Aktivierung von Kupfferzellen zu einer lokalen und systemischen Inflammation mit Gewebedestruktionen in verschiedenen Organen.” In *Chirurgisches Forum '95 für experimentelle und klinische Forschung*, edited by Professor Dr Hans G. Beger, Professor Dr G. Hierholzer, Professor Dr J. Seifert, and Professor Dr W. Hartel, 415–18. Langenbecks Archiv für Chirurgie 95. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-79621-0_85.

Wanner, G. A., P. Müller, M. D. Menger, and W. Ertel. 1996. “Anti-TNF- α Antikörper reduzieren die proinflammatorische Antwort nach Ischämie/Reperfusion der Leber in vivo.” Edited by Professor Dr Hans G. Beger, Dr D. Birk, Dr L. Staib, Professor Dr R. Pichlmayr, Professor Dr J. Seifert, and Professor Dr W. Hartel. *Chirurgisches Forum '96 für experimentelle und klinische Forschung*, Langenbecks Archiv für Chirurgie, , 101–4.

Will, Horst. 2014. *Molekularbiologie kurz und bündig*. Springer-Verlag.

Wolff, Hans-Peter, and Thomas R. Weihrauch. 2014. *Internistische Therapie: 2014/2015*. 20th ed. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.

Xie, Fang, Xiang Fei, Ming-Bo Zhang, Yan Zhang, Hong-Wei Wang, Jie Tang, Wen-Bo Tang, and Yu-Kun Luo. 2018. “Quantitative Evaluation of Hepatic Microvascular Perfusion after Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits by Contrast-Enhanced Ultrasound Perfusion Imaging.” *Ultrasound in Medicine & Biology*, February. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2018.01.004>.

XUE, TONG-MIN, LI-DE TAO, JIE ZHANG, PEI-JIAN ZHANG, XIA LIU, GUO-FENG CHEN, and YI-JIA ZHU. 2016. “Intestinal Ischemic Preconditioning Reduces Liver Ischemia Reperfusion Injury in Rats.” *Molecular Medicine Reports* 13 (3): 2511–17. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4817>.

1.

9 **Abbildungsverzeichnis**

<i>Abb. 1 Der extrinsische Weg der Apoptoseinduktion.....</i>	<i>10</i>
<i>Abb. 2 Der intrinsische Weg der Apoptoseinduktion.....</i>	<i>11</i>
<i>Abb. 3 Wirkspektrum von TNFα.....</i>	<i>13</i>
<i>Abb. 4 Molekularer Aufbau des Etanercept.....</i>	<i>15</i>
<i>Abb. 6 Situs nach Längslaparatomie.....</i>	<i>22</i>
<i>Abb. 7 Situs nach Luxation des Darmgekröses.....</i>	<i>22</i>
<i>Abb. 8 Reperfusionssystem Skizze.....</i>	<i>23</i>
<i>Abb. 9 Reperfusionsvorrichtung.....</i>	<i>23</i>
<i>Abb. 10 Verlauf der Hämoglobinkonzentration[g/dl].....</i>	<i>31</i>
<i>Abb. 11 Verlauf des Hämatokrits[%].....</i>	<i>32</i>
<i>Abb. 12 Verlauf der Leukozytenzahl[10³/mm³].....</i>	<i>33</i>
<i>Abb. 13 Verlauf der Thrombozytenzahl[10³/mm³].....</i>	<i>34</i>
<i>Abb. 14 Verlauf des pH- Wertes.....</i>	<i>35</i>
<i>Abb. 15 Verlauf des pCO₂[mmHg].....</i>	<i>36</i>
<i>Abb. 16 Verlauf des pO₂[mmHg].....</i>	<i>37</i>
<i>Abb. 17 Verlauf der Laktatdehydrogenase[U/l].....</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 18 Verlauf der Aspartat-Aminotransferase[U/l].....</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 19 Verlauf der Alanin-Aminotransferase[U/l].....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 20 Verlauf der Alkalische Phosphatase[U/l].....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 21 Verlauf der portalen Flussrate[ml/min].....</i>	<i>42</i>
<i>Abb. 22 Galleproduktion nach Ischämie- und Reperfusion(IR) sowie nach Präkondition mit Etanercept und Ischämie-und Reperfusion (Etanercept + IR):.....</i>	<i>43</i>
<i>Abb. 23 explantierte Leber, die Pfortader, der Gallengang und die V. cava sind entsprechend kanüliert.....</i>	<i>46</i>

10 Anhang

Versuchs-#	Pra-kondition?	Hepatektomiedatum	Hepatektomie-Uhrzeit	Operationsdauer	Datum der Reperfusion	Uhrzeit der Reperfusion
1	nein	24. Oktober 2012	3:30 PM	50min	26. Oktober 2012	11:45 AM
2	nein	29. Oktober 2012	2:04 PM	42min		
3	nein	31. Oktober 2012				
4	nein	6. November 2012	1:33 PM	40min	14. November 2012	1:40 PM
5	nein					
6	nein	13. November 2012	1:33 PM	36min	14. November 2012	1:40 PM
7	nein					
8	nein					
9	nein	27. November 2012	1:18 PM	36min	28. Nov.. 12	1:33 PM
10	nein					
11	nein					
12	nein	28. November 2012	6:00 PM	32min	30. Nov.. 12	1:50 PM
13	nein					
14	nein	10. Dezember 2012	12:43 PM	40min	12. Dez.. 12	9:00 AM
15	nein					
16	nein	18. Dezember 2012	1:56 PM	30min	19. Dez.. 12	2:20 PM
17	nein					
18	nein					
19	nein					
20	nein	14. Februar 2013		28min		
21	nein	14. Februar 2013		25min		
22	nein	14. Februar 2013		15min		
23	nein	14. Februar 2013		16min		
24	nein	4. März 2013	10:40 AM	28min	5. März. 13	11:08 AM
25	nein	5. März 2013	11:40 AM	28min	6. März. 13	
26	nein	18. April 2013	10:51 AM		19. Apr.. 13	11:50 AM
27	nein	23. Mai. 2013	3:08 PM		24. Mai. 13	3:15 PM
28	nein	22. August 2013	12:48 PM		23. Aug.. 13	12:55 PM
29	nein	16. September 2013	2:10 PM	35min	17. Sep.. 13	2:20 PM
30	nein	17. September 2013	1:14 PM	30min	18. Sep.. 13	1:44 PM
31	nein	18. September 2013	2:17 PM	28min		
32	Ja	19. September 2013	12:38 PM	40min	20. Sep.. 13	12:52 PM
33	Ja	23. September 2013	1:30 PM		24. Sep.. 13	1:50 PM
34	Ja					
35	Ja	24. September 2013	4:15 PM		25. Sep.. 13	4:25 PM
36	Ja					
37	Ja					
38	Ja	26. September 2013	11:00 AM		27. Sep.. 13	11:10 AM
39	Ja	30. September 2013	11:53 AM		1. Okt.. 13	11:55 AM
40	Ja	1. Oktober 2013	5:00 PM		2. Okt.. 13	5:20 PM
41	Ja	1. Oktober 2013	12:28 PM		2. Okt.. 13	12:45 PM
42	Ja	2. Oktober 2013	4:30 PM		3. Okt.. 13	4:55 PM
43	Ja	8. Oktober 2013	11:05 AM		9. Okt.. 13	11:30 AM

44	Ja	9. Oktober 2013	12:15 PM	9. Okt. 13	
45	Ja	9. Oktober 2013	3:30 PM	10. Okt. 13	3:50 PM
46	Ja	10. Oktober 2013	12:06 PM	11. Okt. 13	12:30 PM

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei den nachstehenden Personen bedanken, ohne die die Anfertigung sowie die Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wären:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Stefan Topp, meinem Doktorvater, für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die persönliche Betreuung, insbesondere bei der Erlernung des operativen Abschnittes meiner Experimente.

Ich danke Herrn PD Dr. med. Markus Donner für die wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Leon Philipp möchte ich für die sehr enge Zusammenarbeit im Labor und die Durchführung der Reperfusion danken. Die zahlreichen Stunden, die uns nicht selten an unsere Grenzen brachten, werden mir stets in Erinnerung bleiben.

Frau Dr. med. Carmen Barthuber danke ich für die Auswertung unserer Blutproben.

Ich bedanke mich bei der Arbeitsgruppe für die tatkräftige Unterstützung während der experimentellen Phase.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Jochen Windfuhr für die abschließende Motivation zur Finalisierung des Promotionsvorhabens und die berufsbegleitende Unterstützung danken.

Tief verbunden und dankbar bin ich meinem Verlobten Ralph Männer für die Unterstützung unter anderem auch bei der Durchsicht des Manuskripts und den moralischen Beistand bei der Vollendung der Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme. Sie ermöglichten mir zum einen das Studium der Humanmedizin, unterstützten mich in meinem Vorhaben zur Erlangung des Doktorgrades und standen mir zu jeder Zeit liebevoll zur Seite. Danke.