

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

**Expressionsmuster hepatischer microRNAs und
Schädigungsmarker bei einer an der Rattenleber induzierten
warmen partiellen Ischämie mit Reperfusion:
Einfluss von ischämischer Präkonditionierung oder
pharmakologischer Vorbehandlung mit Taurin,
einem TNF- α -Antagonisten oder einem IL-1-Rezeptorantagonisten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Lisa Cornelia Kessler

2020

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

gez.:

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

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Braun

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Amin Polzin

Zusammenfassung

Leberteilresektionen und Lebertransplantationen führen zu einem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) der Leber, der mit einer Steigerung der postoperativen Morbidität und Mortalität assoziiert ist. Aufgrund der großen klinischen Relevanz des IRS ist die hepatoprotektive Präkonditionierung von besonderem Interesse. Da die zugrunde liegenden Mechanismen bisher unvollständig verstanden sind, wurde in dieser Studie die Bedeutung von microRNAs (miRNAs) für die hepatische Präkonditionierung untersucht und in Beziehung zu protektiven Effekten der Interventionen gesetzt.

In einem *in vivo*-Experiment der Ratte wurde die partielle warme Ischämie und Reperfusion (IR) der Leber sowie der Einfluss einer Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra), einem TNF- α -Antagonisten sowie der ischämischen Präkonditionierung (IPC) untersucht. Es zeigte sich gegenüber der IR-Gruppe ein protektiver Effekt der Taurinvorbehandlung sowie der IPC anhand der Leberenzyme AST, ALT und LDH. Zur Quantifizierung des oxidativen Stresses wurde in dieser Arbeit die MDA-Konzentration sowie als Surrogatparameter der Akkumulation neutrophiler Granulozyten die MPO-Aktivität im Lebergewebe bestimmt. Als wichtiges hepatoprotektives Enzym wurde die Expression der HO-1 mRNA im Lebergewebe gemessen. miRNAs, für die bereits in anderen Studien Expressionsänderungen bei pathophysiologischen Veränderungen der Leber gezeigt werden konnten, wurden hinsichtlich ihrer hepatischen Expression nach IR bzw. nach Vorbehandlung mit nachfolgender IR untersucht (let-7b, let-7c, miR-21, miR-122, miR-142-3p, miR-148a und miR-223). Um mögliche Zielstrukturen der veränderten miR-223 zu identifizieren, wurde eine TargetScan-Analyse durchgeführt.

In dieser Arbeit konnte kein Einfluss der hepatoprotektiven Vorbehandlung mit Taurin oder Präkonditionierung mit IPC auf MDA-Konzentration, MPO-Aktivität oder HO-1 mRNA-Expression nachgewiesen werden. Für die Vorbehandlung mit einem IL-1ra oder TNF- α -Antagonisten zeigte sich kein Anhalt für eine protektive Wirkung und ebenfalls kein Einfluss auf MDA-Konzentration, MPO-Aktivität und mRNA-Expression der HO-1. Nach Vorbehandlung mit Taurin zeigte sich im Vergleich mit alleiniger IR eine signifikant gesteigerte Expression der miR-223. Mögliche Zielstrukturen der miR-223 waren laut TargetScan-Analyse unter anderem DDIT4, RhoB und SIAH1. Diese Zielstrukturen können die Funktion von Neutrophilen oder Makrophagen beeinflussen, sodass möglicherweise die Immunantwort im Rahmen des IRS der Leber durch eine Steigerung der miR-223 nach Vorbehandlung mit Taurin gehemmt werden könnte. Zukünftige Studien müssen den kausalen Zusammenhang einer Expressionssteigerung der miR-223 nach Taurinbehandlung mit dem hepatoprotektiven Effekt näher beleuchten und somit weiter zum Verständnis der Bedeutung der miRNAs für präkonditionierende Mechanismen beitragen.

Summary

Hepatic resection and liver transplantation result in hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI) which leads to an increase in postoperative morbidity and mortality. Due to the high clinical relevance of IRI there is a special interest in hepatoprotective preconditioning. The mechanisms of hepatoprotective preconditioning are still partly unclear. Therefore, it was the aim of this study to evaluate the role of microRNAs (miRNAs) in hepatic preconditioning and the protective effects of ischemic and pharmacological pretreatment.

The partial warm hepatic ischemia and reperfusion (IR) and the influence of pretreatment with taurine, an interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra), a TNF- α antagonist and ischemic preconditioning (IPC) were investigated in an *in vivo*-experiment with rats. The levels of liver enzymes AST, ALT and LDH showed a protective effect for pretreatment with taurine and IPC. To quantify oxidative stress we measured the concentration of MDA as well as MPO activity in liver tissue as a marker of neutrophil accumulation. We also measured the mRNA expression of the important hepatoprotective enzyme HO-1. Furthermore, we determined the expression of selected miRNAs for which other studies have shown altered expression levels due to pathophysiological changes of liver tissue (let-7b, let-7c, miR-21, miR-122, miR-142-3p, miR-148a und miR-223). The miRNA expression was measured after IR as well as after pretreatment and IR. A TargetScan analysis was used to identify possible targets of changed miR-223.

In this study there was no effect of hepatoprotective pretreatment with taurine or IPC on MDA concentration, MPO activity or HO-1 mRNA expression. Pretreatment with an IL-1ra or TNF- α antagonist was not hepatoprotective and showed no effect on MDA concentration, MPO activity or HO-1 mRNA expression. Pretreatment with taurine prior to IR resulted in a significantly higher miR-223 expression compared to IR. Possible miR-223 targets were amongst others DDIT4, RhoB and SIAH1 according to TargetScan. Since all these possible targets affect neutrophil or macrophage function, the immune response during hepatic IRI could be inhibited by an increased miR-223 expression after pretreatment with taurine. Further studies are needed to investigate the causal association between increased miR-223 expression after pretreatment with taurine and the pretreatment's hepatoprotective effect and to thereby contribute to a better understanding of the significance miRNAs may have for preconditioning mechanisms.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	HCV	Hepatitis C-Virus
ALT	Alaninaminotransferase <i>alanine aminotransferase</i>	HClO	Hypochlorige Säure
ASC	<i>apoptosis associated speck-like protein containing CARD domain</i>	HIF-2α	Hypoxie-induzierbarer Transkriptionsfaktor-2 α
AST	Aspartataminotransferase <i>aspartate aminotransferase</i>	HO-1	Hämoxygenase-1 <i>heme oxygenase-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat	HO-2	Hämoxygenase-2
BSA	bovines Serumalbumin	H₂O₂	Wasserstoffperoxid
cDNA	komplementäre DNA	HTA	Hexadecyltrimethylammonium
CO	Kohlenmonoxid	ICG	<i>Indocyanine Green</i>
CYP	Cytochrome der P450-Familie	IGF-1	<i>Insulin-like-growth-factor-1</i>
DAMP	<i>danger associated molecular patterns</i>	IGF-1R	<i>Insulin-like-growth-factor-receptor-1</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	IL-1	Interleukin-1
DDIT4	<i>DNA-damage-inducible transcript 4</i>	IL-1ra	IL-1-Rezeptorantagonist <i>interleukin-1 receptor antagonist</i>
DMSO	Dimethylsulfoximin	IPC	Ischämische Präkonditionierung <i>ischemic preconditioning</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	IR	Ischämie und Reperfusion <i>ischemia reperfusion</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol	IRI	<i>ischemia-reperfusion injury</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	IRS	Ischämie-Reperfusions-Schaden
EFNA-1	Ephrin-A1	KCl	Kaliumchlorid
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>	KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	LDH	Laktatdehydrogenase <i>lactate dehydrogenase</i>
GTP	Guanosintriphosphat	LPO	Lipidperoxidation

LPS	Lipopolysaccharid	Pknox1	<i>Prep 1 homeodomain transcription factor</i>
miRNA	<i>Micro Ribonucleic Acid</i>	PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
miR	miRNA	qRT-PCR	<i>quantitative real time-polymerase chain reaction</i>
MDA	Malondialdehyd <i>malondialdehyde</i>	REDD1	<i>protein regulated in development and DNA damage response 1</i>
mM	Millimolar	Rho	<i>ras homolog family member</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure	RhoB	<i>ras homolog family member B</i>
MPO	Myeloperoxidase	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
mRNA	messengerRNA	RNA	Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Na₂HPO₄		SIAH1	<i>seven in absentia homolog 1</i>
x 2 H₂O	di-Natriumhydrogenphosphat	STAT3	<i>signal transducer and activator of transmission 3</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-kappaB</i>	rRNA	ribosomale RNA
NLRP3	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3</i>	Tab.	Tabelle
NO	Stickstoffmonoxid	TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
NP40	Nonidet P40 Substitute	TBS	Thiobarbitursäure
OD	Optische Dichte	TLR-4	Toll-like-Rezeptor-4
OD₂₆₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge 260nm	TMB	Tetramethylbenzidin
OD₂₈₀	Optische Dichte bei der Wellenlänge 280nm	TMP	1,1,3,3-Tetrametoxipropan
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	TNF-α	<i>Tumornekrosefaktor-α tumor necrosis factor- α</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	U	Units

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Ischämie und Reperfusion der Leber	1
1.1.1 Ischämie-Reperfusions-Schaden	1
1.1.2 Pathophysiologie des hepatischen Ischämie-Reperfusions-Schadens	1
1.1.2.1 Zelluläre Veränderungen bei Ischämie und Reperfusion der Leber	1
1.1.2.2 Vaskuläre Veränderungen bei Ischämie und Reperfusion der Leber	2
1.1.2.3 Biomarker des oxidativen Stresses bei Ischämie und Reperfusion der Leber	5
1.1.2.4 Schadensparameter des hepatischen Ischämie-Reperfusions-Schadens	5
1.1.3 Klinische Bedeutung der hepatischen Ischämie und Reperfusion	6
1.2 Präkonditionierung der Leber	7
1.2.1 Ischämische Präkonditionierung der Leber	8
1.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung der Leber mit einem Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten oder Tumornekrosefaktor- α -Antagonisten	8
1.2.3 Pharmakologische Präkonditionierung der Leber mit Taurin	9
1.2.4 Klinische Anwendung der Präkonditionierung der Leber	10
1.3 microRNA-Expression in der Leber	11
1.3.1 Definition: microRNA	11
1.3.2 microRNA: Bedeutung für Entwicklung und Funktion der Leber	13
1.3.3 Veränderung der microRNA-Expression durch Ischämie und Reperfusion und Präkonditionierung	14
1.4 Ziele der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Versuchstiere	17
2.1.2 Pharmaka	17
2.1.3 Geräte	17
2.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
2.1.5 Puffer und Lösungen	20
2.1.6 Kits und Primer der qRT-PCR	21
2.1.7 Software	23
2.2 <i>in vivo</i>-Versuchsaufbau	23

2.2.1 <i>in vivo</i> -Modell der partiellen warmen Leberischämie	23
2.2.2 Versuchsgruppen.....	24
2.3 Molekularbiologische Untersuchungen	25
2.3.1 RNA-Isolierung.....	25
2.3.2 Spektrophotometrische Messung von Konzentration und Reinheit der RNA	26
2.3.3 Messung der RNA-Intaktheit durch Gelelektrophorese.....	27
2.3.4 Reverse Transkription und qRT-PCR	28
2.3.5 microRNA-Expression.....	30
2.3.5.1 RNA-Transkription für microRNA	30
2.3.5.2 qRT-PCR zur Bestimmung der microRNA-Expression	30
2.3.6 TargetScan-Analyse	31
2.3.7 Genexpression.....	31
2.3.7.1 RNA-Transkription für Genexpression	31
2.3.7.2 qRT-PCR zur Bestimmung der Genexpression.....	31
2.3.8 MDA-Assay	32
2.3.9 MPO-Assay	34
2.4 Statistische Auswertung	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Parameter des hepatischen Ischämie- Reperfusions-Schadens	36
3.1.1 Serumaktivitäten der Enzyme AST, ALT und LDH.....	36
3.1.2 MDA-Konzentration im Lebergewebe	37
3.1.3 MPO-Aktivität im Lebergewebe.....	37
3.2 HO-1 mRNA-Expression im Lebergewebe.....	38
3.3 Ergebnisse der microRNA-Analyse	38
3.3.1 Relative Expression der microRNA-223 in der Leber.....	38
3.3.2 Relative Expression von let-7b, let-7c, microRNA-21, microRNA-122, microRNA-142-3p und microRNA-148a in der Leber	39
3.4 Ergebnisse der TargetScan-Analyse für microRNA-223	40
4 Diskussion.....	42
4.1 Diskussion der Methodik.....	43
4.1.1 Diskussion des <i>in vivo</i> -Modells und der Schadensparameter	43
4.1.2 Begründung der Auswahl der untersuchten microRNAs.....	44
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	46
5 Literaturverzeichnis	56

1 Einleitung

1.1 Ischämie und Reperfusion der Leber

1.1.1 Ischämie-Reperfusions-Schaden

Eine Ischämie ist definiert als fehlende oder verminderte Durchblutung eines Organs oder Gewebes [1]. Bei Wiederherstellung der Durchblutung spricht man von einer Reperfusion. Ein Ischämie-Reperfusions-Schaden (IRS) des betroffenen Organs oder Gewebes bezeichnet die Gesamtheit der schädigenden Vorgänge, die in der Ischämie vor allem durch die Hypoxie und in der Reperfusion durch verschiedene intra- und extrazelluläre Mechanismen vermittelt werden (Übersicht in [2], Abb. 1).

1.1.2 Pathophysiologie des hepatischen Ischämie-Reperfusions-Schadens

1.1.2.1 Zelluläre Veränderungen bei Ischämie und Reperfusion der Leber

In der Ischämiephase liegt eine ausgeprägte Hypoxie vor. Es entsteht ein Adenosintriphosphat (ATP)-Mangel, sodass die Aktivität der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpe abnimmt. Es kommt zur intrazellulären Akkumulation von Natrium und Wasser mit konsekutivem Zellödem [3], das an der Schädigung der Zelle beteiligt ist (Übersicht in [4]). Durch Schädigung von Kupfferzellen, weniger auch von Hepatozyten [5] und Endothelzellen, kommt es zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese spielen eine entscheidende Rolle in der nachfolgenden Reperfusionsphase.

Die hepatische Reperfusion kann in zwei Phasen unterteilt werden. Die frühe Phase der Reperfusion umfasst die ersten zwei Stunden und wird von der späten Phase gefolgt, die bis zu 48 Stunden andauern kann (Übersicht in [2]). Beide Phasen werden durch unterschiedliche Zellen und pathophysiologische Mechanismen des Immunsystems bestimmt.

In der ersten Phase der Reperfusion wird der Schaden hauptsächlich durch Kupfferzellen verursacht, welche proinflammatorische Zytokine freisetzen und durch Freisetzung von ROS oxidativen Stress verursachen. Kupfferzellen werden durch Kontakt mit *danger associated molecular patterns* (DAMP) (Übersicht in [6]) und das im Rahmen der IR aktivierte

Komplementsystem stimuliert [7]. Zu den DAMP gehören unter anderem Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus nekrotischen oder apoptotischen Zellen, mitochondriale Bestandteile und ATP. Hepatozyten, die oxidativem Stress unterliegen, setzen aktiv DAMP frei. Gehen sie durch Apoptose oder Nekrose zugrunde, werden DAMP zusätzlich passiv freigesetzt (Übersicht in [6]). Ihre Wirkung entfalten DAMP durch die Bindung an *pattern recognition receptors* (PRR), zu denen unter anderem der Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) gehört [8], der zum Beispiel auf Kupfferzellen und neutrophilen Granulozyten lokalisiert ist. DAMP stimulieren die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch sinusoidale Endothelzellen, Kupfferzellen und dendritische Zellen (Übersicht in [6]). Die von Kupfferzellen synthetisierten proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [9] und Interleukin-1 (IL-1) spielen dabei in der Reperusionsphase eine besondere Rolle [8] [9]. Die TNF- α -Produktion steigt zu Beginn der Reperusionsphase schnell an und nimmt nach circa fünf Minuten wieder ab. IL-1 wird in der Reperusionsphase kontinuierlich in großen Mengen freigesetzt [10]. Beide Zytokine stimulieren die Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten [11]. Zudem regt TNF- α die Hepatozyten zur Produktion von CXC-Chemokinen an, welche weitere neutrophile Granulozyten anlocken [12]. IL-1 stimuliert zusätzlich die ROS-Produktion durch Neutrophile [13].

In der späten Reperusionsphase wird der IRS durch Neutrophile weiter verstärkt. Neutrophile setzen in großen Mengen ROS frei [14], unter anderem durch Sekretion von Myeloperoxidase (MPO). Die Aktivität der MPO steigt bei der hepatischen IR proportional zu der Anzahl der im Lebergewebe vorhandenen Neutrophilen an [15]. Zusätzlich zu ROS setzen die neutrophilen Granulozyten in der späten Reperusionsphase Enzyme wie Proteasen frei, welche zytotoxisch gegen Hepatozyten wirken [16]. Durch die verschiedenen Mechanismen kommt es durch Neutrophile in der späten Reperusionsphase vermehrt zur Nekrose von Hepatozyten [17].

1.1.2.2 Vaskuläre Veränderungen bei Ischämie und Reperfusion der Leber

Zusätzlich zu den oben beschriebenen zellulären Veränderungen werden bei der hepatischen IR auch vaskuläre Veränderungen verursacht, die ebenfalls zum IRS beitragen (Abb. 1). Durch den induzierten Endothelzellschaden wird die mikrovaskuläre Integrität gestört (Übersicht in [18]). Das sinusoidale Lumen wird kleiner, was in einer Abnahme der sinusoidalen Perfusion resultiert [3]. Durch eine verlängerte Passagezeit in den Lebersinusoiden haben Leukozyten vermehrt Kontakt zu Endothelzellen, sodass es zur

Leukostase und dadurch zu einer weiteren Abnahme der sinusoidalen Perfusion kommt [19]. Außerdem kommt es durch die hepatische IR zu einer Dysbalance von Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) [20] [21] und Kohlenmonoxid (CO) [22]) und Vasokonstriktoren wie Endothelin [23] [24] (Abb. 1). Sowohl für CO [25] [26] als auch für NO [27] [28] konnte eine hepatoprotektive Wirkung gegen den IRS nachgewiesen werden. Endothelin hingegen, dessen Konzentration im Blut von Lebervenen und der *Vena portae* während der Reperfusionsphase der hepatischen IR signifikant ansteigt [29], führt zu einer Störung der Mikrozirkulation [30]. Durch Blockade von Endothelin kann der histologisch nachgewiesene Leberzellschaden bei der hepatischen IR signifikant gesenkt werden [31].

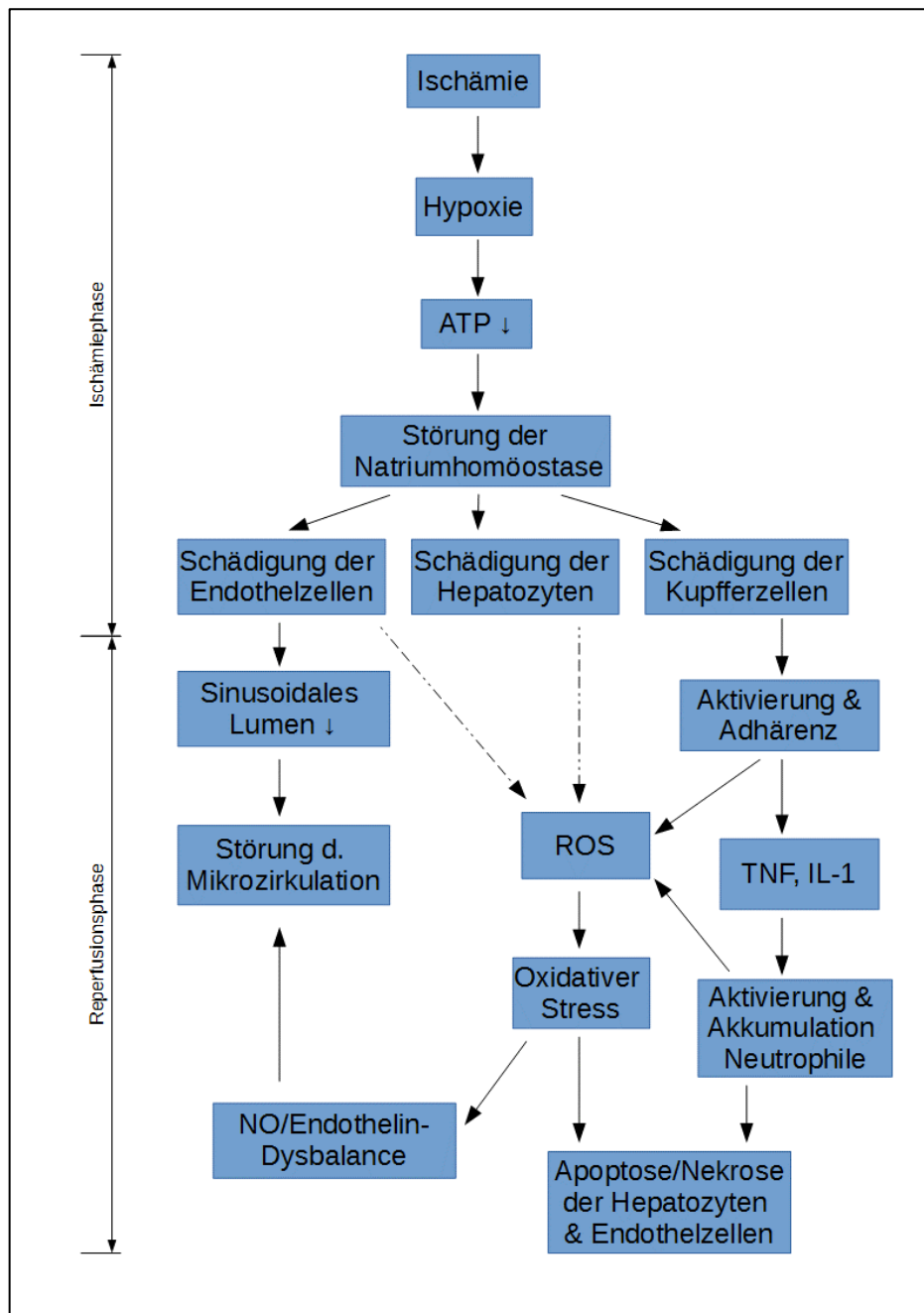


Abb. 1: Schematische Darstellung des Ischämie-Reperusions-Schadens der Leber.

Die Mechanismen des IRS sind stark vereinfacht und schematisch abgebildet. Durch die Ischämie kommt es zur Hypoxie mit nachfolgendem ATP-Mangel, der zur Störung der Natriumhomöostase führt. Bereits in der Ischämiephase und vermehrt in der anschließenden Reperusionsphase kommt es zur Schädigung der Endothelzellen, Hepatozyten und Kupfferzellen. Daraus resultiert eine Verengung des sinusoidalen Lumens mit Störung der Mikrozirkulation, welche durch die NO/Endothelin-Dysbalance verstärkt wird. Es kommt zur Freisetzung von ROS, oxidativem Stress und zum Zelltod der Hepatozyten und Endothelzellen. In der frühen Phase der Reperfusion wird der IRS vor allem durch die Kupfferzellen vermittelt, die nach vermehrter Aktivierung und Adhärenz TNF- α und IL-1 freisetzen. Hierdurch folgt die Aktivierung und Akkumulation der Neutrophilen, durch die der IRS vor allem in der späten Phase der Reperfusion vermittelt wird. ATP: Adenosintriphosphat. ROS: Reaktive Sauerstoffspezies. TNF- α : Tumornekrosefaktor- α . IL-1: Interleukin-1. NO: Stickstoffmonoxid.

1.1.2.3 Biomarker des oxidativen Stresses bei Ischämie und Reperfusion der Leber

Nach initialem Sauerstoffmangel in der Ischämiephase steht in der Reperfusionsphase der hepatischen IR wieder mehr Sauerstoff zur Verfügung, sodass mehr ROS generiert werden können und die Zellen zunehmend oxidativem Stress ausgesetzt sind. Durch den oxidativen Stress kommt es unter anderem zur Lipidperoxidation (LPO) [32]. Bei der LPO entsteht durch die Reduktion von Wasserstoffperoxid ein Hydroxylradikal. Das Radikal löst eine Kettenreaktion aus, die zu Oxidation und Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren führt (Übersicht in [33]). Während der Reperfusionsphase werden auf diese Weise Membranlipide der Zellmembran sowie der Membran von Mitochondrien und anderen subzellulären Strukturen oxidiert [34] [35] [36]. Dadurch wird die Konfiguration der Lipiddoppelschicht verändert, wodurch die Membran rigider und fragiler wird, sodass zum Beispiel durch Destruktion der Mitochondrienmembran die ATP-Synthese gestört wird [36]. Das Produkt der LPO ist Malondialdehyd (MDA), welches als Indikator oxidativen Stresses nach IR in erhöhter Konzentration im Lebergewebe vorliegt [37].

Neben MDA ist das Enzym Hämoxigenase-1 (HO-1) ein weiterer, hoch-sensitiver Indikator des oxidativen Stresses (Übersicht in [38]). Die Hämoxigenase katalysiert den initialen und limitierenden Schritt beim Abbau von Häm zu CO, freiem Eisen und Biliverdin unter Verbrauch von Sauerstoff [39]. Es gibt zwei Isoformen der Hämoxigenase, die induzierbare HO-1 und die konstitutive Isoform Hämoxigenase 2 (HO-2) (Übersicht in [40]). Die Expression der HO-1 (Synonym: heat shock protein 32) kann durch oxidativen Stress induziert werden, während sich die Expression der HO-2 hierdurch nicht verändert [41].

1.1.2.4 Schadensparameter des hepatischen Ischämie-Reperfusions-Schadens

Etablierte Schadensparameter des hepatischen IRS sind die Enzymaktivitäten der Aspartataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT) und Laktatdehydrogenase (LDH) (Übersicht in [2]). In klinischen und experimentellen Studien werden die Enzymaktivitäten als Schadens- und Verlaufsparemeter des IRS angesehen. Zudem besteht eine Korrelation der Enzymaktivitäten mit der histologisch erfassten Leberschädigung [17] [42].

Als Ergänzung oder Alternative zu den oben genannten Schadensparametern kann beim IRS der Leber auch die Einschränkung der Leberfunktion quantifiziert werden. Zur

Quantifizierung können statische Parameter wie die Bilirubinkonzentration im Plasma oder die Prothrombinzeit bestimmt werden. Als dynamischer Test kann zum Beispiel die *Indocyanine Green (ICG) -Clearance* verwendet werden, die im *in vivo*-Modell der partiellen warmen IR der Leber signifikant abnimmt [43]. ICG ist ein fluoreszierender Farbstoff, der intravenös verabreicht werden kann und über die Galle ausgeschieden wird. Die Ausscheidung ist sowohl abhängig von der Durchblutung als auch der Funktion der Leber, sodass beide Parameter Einfluss auf die ICG-Clearance haben (Übersicht in [44]).

1.1.3 Klinische Bedeutung der hepatischen Ischämie und Reperfusion

Die IR der Leber wird in zwei Formen unterteilt. Unter warmer IR versteht man IR bei Körpertemperatur, das Organ ist zum Zeitpunkt der Ischämie innerhalb und Teil des Organismus. Die kalte IR geht mit geringeren Temperaturen des Organs einher, dabei befindet sich das Organ zumeist extrakorporal im Rahmen einer Organtransplantation (zum Beispiel zu Transportzwecken) [45]. Beide Formen führen zu einem IRS. Im folgenden Teil soll vor allem auf die klinische Bedeutung der warmen IR eingegangen werden, da diese Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen ist. Eine warme IR der Leber wird im klinischen Zusammenhang bei Leberteilresektionen und Lebertransplantationen, beim hypovolämischen und hämorrhagischen Schock induziert. Zudem kann es auch bei der operativen Versorgung ausgedehnter Leberverletzungen notwendig sein, eine hepatische warme IR zu induzieren.

Bei Leberteilresektionen und Lebertransplantationen besteht das Risiko einer ausgeprägten intraoperativen Blutung, deren Ausmaß mit der perioperativen Morbidität und Mortalität korreliert [46] [47]. Gelegentlich besteht aufgrund des intraoperativen Blutverlustes die Notwendigkeit der Gabe von Blutprodukten, die das Risiko von Infektionen [48] sowie Tumorrezidiven nach partieller Hepatektomie bei hepatozellulärem Karzinom [49] und bei Metastasen eines kolorektalen Karzinoms erhöht [50].

Um das intraoperative Blutungsrisiko zu minimieren, können vaskulär-okkludierende Verfahren angewandt werden. Der Blutzufuss zur Leber kann zum Beispiel durch das sogenannte Pringle-Manöver temporär unterbrochen werden (Übersicht in [51]). Dabei werden die Gefäße der Leberpforte, die *Arteria hepatica propria* und die *Vena portae*, geklemmt, sodass es zu einer kurzfristigen Ischämie der Leber kommt. Weitere vaskulär-okklusive Verfahren sind unter anderem die *hemihepatic vascular occlusion* mit

Unterbrechung der Blutzufuhr zum rechten oder linken Leberlappen oder die *total hepatic vascular exclusion* mit Klemmen der Gefäße der Leberpforte, der infrahepatischen *Vena cava inferior* und der *Venae hepaticae* und konsekutiver Unterbrechung der Blutzufuhr und des Blutabflusses der Leber (Übersicht in [51]).

Durch die Anwendung vaskulär-okkludierender Verfahren bei Leberteilresektionen, Lebertransplantationen oder der operativen Versorgung von Leberverletzungen entsteht eine warme IR. Bei der Lebertransplantation wird zusätzlich zur warmen IR, die im Rahmen der Leberteilresektion beim Spender induziert wird, eine kalte IR während der Lagerung des Organs nach Entnahme auf Eis bei 0 °C bis 4 °C [45] sowie eine weitere Phase der warmen IR durch die Reperfusion nach Transplantation des Organs verursacht [52] [53].

Der durch die IR entstehende oxidative Stress korreliert bei der Leberteilresektion mit der Dauer des angewandten Pringle-Manövers [54]. Vor allem bei bestehender Vorerkrankung weist die Leber eine erhöhte Empfindlichkeit für den IRS auf. Bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung erhöht die IR während der Leberteilresektion die Morbidität und Mortalität [55]. Bei Patienten mit hepatischer Makrosteatose ist der IRS größer und die Komplikationsrate insgesamt höher [56].

Bei der Lebertransplantation ist der hepatische IRS ein entscheidender Faktor für das Outcome der Patienten und in bis zu zehn Prozent der Fälle Ursache für ein frühes Organversagen (Übersicht in [18]). Zudem kann der IRS die Inzidenz der akuten Abstoßungsreaktion erhöhen und die Wiederherstellung der Funktion der Spenderleber verzögern [57].

1.2 Präkonditionierung der Leber

Als Präkonditionierung wird die ischämische oder pharmakologische Vorbehandlung eines Organs vor der IR bezeichnet mit dem Ziel, die Toleranz des Organs gegenüber dem IRS zu erhöhen. In *in vivo*-Untersuchungen und teilweise auch in klinischen Studien konnte sowohl für die ischämische Vorbehandlung der Leber als auch für die Vorbehandlung der Leber mit verschiedenen Pharmaka eine protektive Wirkung gegen den IRS nachgewiesen werden. Im folgenden Teil werden verschiedene mögliche Formen einer Präkonditionierung der Leber dargestellt.

1.2.1 Ischämische Präkonditionierung der Leber

Bei der ischämischen Präkonditionierung (IPC) schwächen kurze, nicht-letale Episoden einer Organischämie die Wirkung eines nachfolgenden potentiell letalen IRS ab [58]. Die für das Myokard schon 1986 nachgewiesene Organprotektion durch IPC [59] konnte auch für ischämische Ereignisse der Leber nachgewiesen werden. Bei der hepatischen IR zeigte sich *in vivo* eine protektive Wirkung der IPC sowohl bei gesunden [60] als auch bei steatotischen Lebern [61]. Die IPC verminderte *in vivo* den durch den IRS bedingten oxidativen Stress und konnte die Schädigung des Lebergewebes durch neutrophile Granulozyten in der späten Phase der IR abschwächen [37]. Die Aktivitäten der ALT und AST wurden durch eine Präkonditionierung der Leber mittels IPC signifikant gesenkt [62] [63].

Als ein weiterer hepatoprotektiver Mechanismus wurde die Induktion der HO-1 durch IPC identifiziert. HO-1 katalysiert den Abbau von freiem Häm, das durch ROS-vermittelte Lyse von Erythrozyten im Rahmen eines IRS vermehrt freigesetzt wird. Da freies Häm seinerseits zur Bildung von ROS beiträgt, schwächt die HO-1 den oxidativen Stress ab (Übersicht in [18]). In einer klinischen Studie von Patel et al. zeigte sich eine HO-1-Induktion durch IPC bei Leberteilresektionen [64]. In einer weiteren klinischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass der Anstieg der HO-1-Expression bei Lebertransplantationen mit geringerem Schaden und verbesserter Funktion des Organs korreliert [65]. Auch *in vivo* wurde die hepatoprotektive Wirkung einer HO-1-Induktion vor dem IRS bestätigt. Durch Induktion von HO-1 wurde eine Hepatoprotektion bei warmer [66] [67] [68] [69] und kalter IR [70] [71] [72] [73] bewirkt. Die Anwendung der HO-1-Induktion in klinischen Studien ist jedoch limitiert durch die Toxizität der *in vivo* genutzten Induktoren wie etwa Cobaltprotoporphyrin. Derzeit sind noch keine HO-1-Induktoren für den menschlichen Organismus etabliert.

1.2.2 Pharmakologische Präkonditionierung der Leber mit einem Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten oder Tumornekrosefaktor- α -Antagonisten

Für eine pharmakologische Präkonditionierung der Leber vor der IR könnte nach Ergebnissen bisheriger Studien ein IL-1-Rezeptorantagonist oder ein TNF- α -Antagonist angewendet werden. Die Präkonditionierung mit einem IL-1ra hemmte *in vivo* die Atrophie und Degeneration der Hepatozyten nach warmer Ischämie der Leber, die Leukozytenadhäsion an Sinusoid-Endothelzellen und die Produktion von ROS [13]. Im Modell der partiellen warmen Ischämie der Rattenleber stieg bei der IR die IL-1- und die TNF- α -Konzentration im

Lebergewebe an. Durch Präkonditionierung mit einem IL-1ra intravenös vor Beginn der Ischämie wurde sowohl die TNF- α -Konzentration als auch der Grad der Nekrose des Lebergewebes signifikant gesenkt. Nach Resektion des nicht-geschädigten Leberanteils nach partieller IR konnte die 7-Tage-Überlebensrate durch Präkonditionierung mit einem IL-1ra *in vivo* von 30% auf 80% gesteigert werden [74]. Eine durch Gentransfer des IL-1ra-Gens induzierte erhöhte Konzentration des IL-1ra führte bei 90-minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion der Leber *in vivo* zu einer Reduktion der Enzymaktivität von AST und ALT und zur Reduktion der TNF- α -Konzentration [75].

Auch durch die Präkonditionierung mit einem TNF- α -Antagonisten kann der IRS der Leber vermindert werden. In *in vivo*-Studien zur IR von Rattenlebern konnten nach Präkonditionierung mit einem TNF- α -Antagonisten intravenös vor Beginn der Ischämie [8] oder vor Beginn der Reperfusion [76] signifikant niedrigere ALT-Aktivitäten [8] [76], LDH-Aktivitäten und MDA-Serumkonzentrationen [76] nachgewiesen werden. Ben-Ari et al. konnten den protektiven Effekt der prä-ischämischen Gabe eines TNF- α -Antagonisten in einem Modell mit isolierten Rattenlebern bestätigen [77]. Auch die TNF- α -Hemmung durch Pentoxifyllin führte *in vivo* zu einer Erhöhung der Überlebensrate [78] und einer verminderten AST-Aktivität [78] [79] sowie einer verminderten ALT-Aktivität, LDH-Aktivität und hepatischen MDA-Konzentration [79] nach IR.

1.2.3 Pharmakologische Präkonditionierung der Leber mit Taurin

Eine weitere Substanz, für die *in vivo* eine protektive Wirkung gegen den IRS der Leber nachgewiesen werden konnte, ist die schwefelhaltige Aminosäure-ähnliche Verbindung Taurin (Abb. 2). Taurin (Synonym: 2-Aminoethansulfonsäure) ist die häufigste Aminosäure-ähnliche Verbindung im Lebergewebe. Die hohe Konzentration wird durch exogene Aufnahme und endogene Synthese beim Abbau der Aminosäuren Cystein und Methionin aufrechterhalten (Übersicht in [80]). Taurin hat eine molare Masse von 125,148 g/mol (Summenformel $C_2H_7NO_3S$).

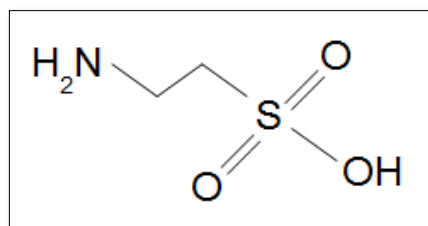


Abb. 2: Strukturformel Taurin.

Mehrere Studien konnten Anhaltspunkte für die protektive Wirkung von Taurin bei kalter IR der Leber liefern. In einer Studie mit isolierten Rattenlebern wurde sowohl durch die Zugabe von Taurin in die Perfusionslösung als auch durch orale Taurinaufnahme vor kalter IR der Rattenleber ein protektiver Effekt induziert [81]. Im Modell der kalten IR mit anschließender Lebertransplantation wurde die Überlebensrate des Transplantats durch Präkonditionierung mit Taurin dosisabhängig von 60% auf 100% gesteigert. Die Aktivitäten der AST, ALT und LDH wurden dosisabhängig gesenkt. Histologisch zeigte sich eine Reduktion der Leberschädigung, des nekrotischen Gewebes und der Leukozyteninfiltration sowie immunhistochemisch eine Abnahme der TNF- α -Expression [82]. Die Präkonditionierung mit Taurin intravenös zehn Minuten vor Resektion der Leber und anschließender kalter IR senkte *in vivo* die Kupfferzellaktivität und Leukozytenadhäsion und verbesserte die sinusoidale Perfusion [88].

Auch bei der warmen IR der Leber fanden sich Hinweise auf eine protektive Wirkung des Taurins. In der oben genannten Studie zeigte sich nach oraler Gabe von Taurinlösung für sieben Tage eine signifikante Reduktion der LDH-Freisetzung aus der Leber [81]. In einer weiteren Studie mit perfundierten Rattenlebern fanden sich Anhaltspunkte für die protektive Wirkung einer Lösung aus Taurin und Betain [83]. Auch für eine kombinierte intravenöse Gabe von Taurin, Glycin, Alanin, Arginin und Prednisolon konnte eine protektive Wirkung gegen den IRS der Leber nachgewiesen werden [84]. Nach intravenöser Gabe von Taurinlösung 30 Minuten vor IR der Rattenleber mit zusätzlicher Gabe von Lipopolysacchariden (LPS) zeigte sich eine Abnahme der Serumaktivitäten von AST, ALT und LDH, der MDA-Konzentration und MPO-Aktivität im Lebergewebe und der histologisch nachweisbaren Schädigung der Leber [85]. Der protektive Effekt einer intravenösen Tauringabe konnte in weiteren Studien mit täglichen Injektionen für 7 Tage vor IR der Kaninchenleber [86] und intravenöser Applikation zehn Minuten vor Beginn einer warmen IR der Rattenleber [87] bestätigt werden. Zudem zeigte sich, dass durch die intravenöse Tauringabe die Infiltration und Adhäsion von Leukozyten vermindert, die Phagozytose durch Kupfferzellen gehemmt, die TNF- α -Konzentration im Serum gesenkt und die Perfusion der Lebersinusoiden verbessert wird [87].

1.2.4 Klinische Anwendung der Präkonditionierung der Leber

Derzeit existieren noch keine klinisch etablierten Methoden der Präkonditionierung vor IR der Leber (Übersicht in [88]). Im Gegensatz zu den oben genannten Substanzen ist in klinischen

Studien bisher nur der protektive Effekt der IPC untersucht worden. Dabei konnte mehrfach eine protektive Wirkung der IPC nachgewiesen werden. Nach 10-minütiger IPC und 10-minütiger Reperfusion vor Hemihepatektomie zeigte sich eine signifikante Abnahme der ALT- und AST-Aktivität sowie der Anzahl apoptotischer sinusoidaler Endothelzellen [89]. Neben der Abnahme der AST-Aktivität fand sich auch eine Abnahme von MDA durch IPC vor partieller Hepatektomie [90]. Protektive Effekte einer 10-minütigen IPC gegen den IRS zeigten sich in mehreren klinischen Studien auch bei der Lebertransplantation [91] [92]. Der protektive Effekt der IPC vor partieller Hepatektomie war in einer weiteren Studie vor allem bei jüngeren Patienten, Patienten mit *Steatosis hepatis* und bei längerer Ischämiedauer nachweisbar [93]. Auch bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom und Leberzirrhose wurde durch IPC vor partieller Hepatektomie eine Senkung der AST- und ALT-Aktivitäten sowie der Apoptoserate sinusoidaler Endothelzellen induziert [94].

Die Mechanismen, über die eine Präkonditionierung der Leber protektiv wirkt, sind nur teilweise geklärt. Neben der Modulation der Aktivität oder Induktion von Enzymen wie der HO-1 wäre auch eine Veränderung der *Micro Ribonucleic Acid* (microRNA) -Expression im Lebergewebe durch die Präkonditionierung denkbar.

1.3 microRNA-Expression in der Leber

1.3.1 Definition: microRNA

MicroRNAs (miRNAs) sind einzelsträngige, circa 22 Nukleotid-Einheiten lange, nicht-kodierende RNAs. Sie binden an komplementäre Abschnitte in nicht-translatierten Bereichen der messengerRNA (mRNA) und regulieren so Translation oder Degradation der mRNA (Übersicht in [95]). Dadurch sind sie an der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt. Die Genexpression kann durch miRNAs über verschiedene Mechanismen, unter anderem mRNA-Deadenylation, translationale Repression oder Aktivierung, gehemmt oder gesteigert werden.

Durch Transkription und Spaltung von pre-miRNAs, Export aus dem Zellkern sowie nachfolgender Strangselektion werden miRNAs generiert und anschließend nach Bindung an den *RNA-induced silencing complex* (RISC) zur mRNA transportiert (Abb. 3, Übersicht in [96]). Durch den RISC kann nach Bindung einer miRNA der Abbruch der Translation der mRNA oder der Abbau der mRNA induziert werden (Übersicht in [97]). Die Bindung der miRNA an die mRNA erfolgt dabei meistens über die Nukleotide zwei bis sieben der 5'-

Region der miRNA, auch *Seed* genannt, an die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der mRNA (Übersicht in [95] [98]).

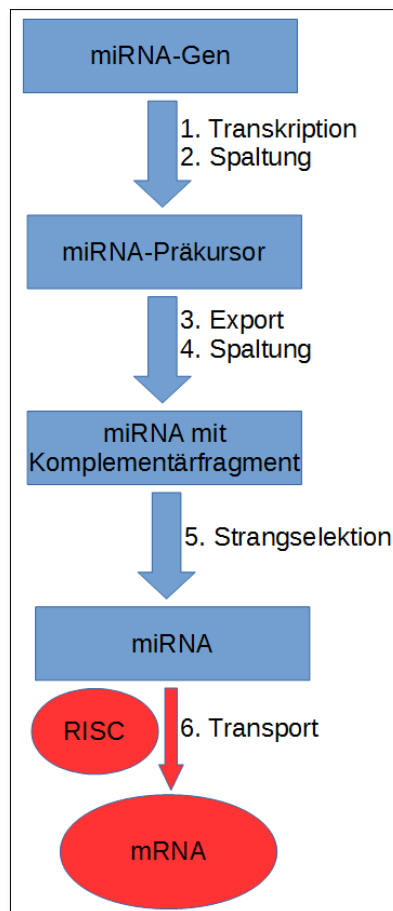


Abb. 3: Genese und Transport der microRNAs.

Angelehnt an Wang et al., 2012 [96]. Die miRNA entsteht in fünf Schritten durch Transkription und Spaltung aus dem miRNA-Gen, nachfolgend durch Export und weitere Spaltung aus dem miRNA-Präkursor und Strangselektion aus der miRNA mit Komplementärfragment. Die entstandene miRNA wird nach Bindung an den RISC zur mRNA transportiert. miRNA: microRNA. RISC: RNA-induced silencing complex. mRNA: messengerRNA.

1.3.2 microRNA: Bedeutung für Entwicklung und Funktion der Leber

MiRNAs spielen bei der embryologischen Entwicklung und dem Stoffwechsel der Leber eine wichtige Rolle. Die leberspezifische miRNA-122 (miR-122) zum Beispiel, die einen Anteil von etwa 70% aller miRNAs in der Leber ausmacht [99], wird bei der Differenzierung des Lebergewebes vermehrt exprimiert (Übersicht in [100]). Die miR-122 ist zudem an der Homöostase des Eisenhaushaltes und des Lipidmetabolismus beteiligt. Durch Antagonisieren der miR-122 *in vivo* wurde die Eisenkonzentration im Lebergewebe und im Plasma reduziert [101]. Das Inhibieren der miR-122 im gesunden Lebergewebe hemmte die Fettsäure- und Cholesterinsynthese [102], senkte den Plasma-Cholesterinspiegel [103] und stimulierte die Fettsäureoxidation [102]. Im Modell einer Diät-induzierten Adipositas *in vivo* bewirkte das Inhibieren der miR-122 eine signifikante Verbesserung der *Steatosis hepatis* [102]. Zudem ist die miR-122 ein Biomarker für einen Leberschaden unterschiedlicher Genese und sowohl beim viral- als auch beim toxisch-bedingten Leberschaden im Plasma in höherer Konzentration vorhanden [104]. Die Erhöhung der miR-122 im Plasma nach hepatischer Schädigung scheint dabei früher nachweisbar zu sein als der Anstieg der ALT- [104] [105] [106] und AST-Aktivität [105].

miRNA-148a (miR-148a) ist eine weitere leberspezifische miRNA, die in Hepatozyten beim Tier [107] und beim Menschen [108] in großen Mengen in der Leber nachgewiesen werden konnte. Die miR-148a ist für die Differenzierung der Hepatoblasten zu Hepatozyten bei der embryologischen Entwicklung wichtig. Im Modell mit fetalen Maus-Hepatoblasten zeigte sich *in vitro*, dass die miR-148a-Expression bei der Differenzierung zu reifen Hepatozyten induziert wird und in den reifen Zellen in großen Mengen vorhanden ist [107]. Für die embryologische Entwicklung der Leber von Bedeutung sind auch miRNAs der let-7-Familie. Diese stellt miRNA-Präkursoren dar und umfasst 13 verschiedene Vertreter. Zur Familie gehören unter anderem let-7b und let-7c, welche im Lebergewebe exprimiert werden [99]. Let-7 miRNAs regulieren die Transkription verschiedener Onkogene und steuern Zellproliferation und Apoptose (Übersicht in [96]). Im adulten Lebergewebe ist die Expression von let-7b und let-7c im Vergleich zum embryonalen Gewebe deutlich gesteigert [109]. Zudem spielen miRNAs der let-7 Familie eine Rolle beim Glucose-Metabolismus. Eine gesteigerte Expression von let-7 miRNAs *in vivo* führte zu Insulinresistenz [110] und verminderter Glucosetoleranz [110] [111].

An der Regulation der Entgiftungs-Funktion der Leber sind verschiedene miRNAs wie die

miRNA-21 (miR-21), miRNA-142-3p (miR-143-3p) und miR-148a beteiligt. Die Expression dieser miRNAs beeinflusst die Aktivität verschiedener Cytochrome der P450-Familie (CYP), einer Enzymfamilie, die für den Abbau von Medikamenten und Chemikalien im Lebergewebe wichtig ist (Übersicht in [112]). Im *in vitro*-Experiment konnte nachgewiesen werden, dass eine gesteigerte Expression der miR-148a mit einer verminderten Expression der mRNA von CYP3A4 einhergeht [113]. In einer klinischen Studie zeigte sich eine negative Korrelation der Expression von miR-21 und miR-142-3p mit der Expression und Aktivität von CYP1A1 und CYP2A6 [114]. miR-21 ist eine der häufigsten miRNAs im Körper. Sie ist nicht Leberspezifisch, kommt in den meisten Gewebearten vor und konnte vielfach in Tumorgewebe vermehrt nachgewiesen werden [115]. Die miR-142-3p ist eine nicht-leberspezifische miRNA, die vor allem bei der Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen eine Rolle spielt [116] [117].

Neben der physiologischen Funktion der oben genannten miRNAs wurden die Expressionsmuster im Lebergewebe und im Plasma auch bei verschiedenen Erkrankungen und Operationen der Leber untersucht. Es zeigten sich Veränderungen der Expression bei chronischer Hepatitis B [104] [118], toxischer Schädigung der Leber [105] [106], Hepatozellulärem Karzinom [119] [120] [121] [122] [123], partieller Hepatektomie [124] [125] [126] [127] [128] und Lebertransplantation [129].

1.3.3 Veränderung der microRNA-Expression durch Ischämie und Reperfusion und Präkonditionierung

Zur Veränderung der miRNA-Expression durch IR und Präkonditionierung der Leber wurden bisher nur wenige Studien durchgeführt. So zeigten sich *in vivo* nach warmer IR der Leber erhöhte miR-122-Level im Serum [130] [131], die mit der Aktivität der hepatischen Schadensparameter AST und ALT korrelierten [132] [131]. Außerdem konnte eine gesteigerte Expression der miR-21 im Serum [131] und der miR-223 im Lebergewebe [131] [133] [134] nachgewiesen werden. MiR-223 ist eine für myeloische Zellen und Lymphozyten spezifische miRNA [135], die zur Differenzierung und Proliferation myeloischer Zellen wie zum Beispiel den neutrophilen Granulozyten beiträgt. Sie reguliert zudem die Aktivität neutrophiler Granulozyten (Übersicht in [136]), die in der späten Reperfusionsphase maßgeblich am IRS beteiligt sind. Für die bei der IR gesteigerte hepatische miR-223-Expression konnte ebenfalls eine Korrelation mit der AST- und ALT-Aktivität im Serum nachgewiesen werden [134].

Der Einfluss von Präkonditionierung und IR auf die Expressionsänderung von miRNAs wurde bisher vor allem am Herz und an der Niere untersucht. Es zeigte sich neben einer gesteigerten Expression zum Beispiel der miR-21 nach warmer IR des Herzens [137] auch, dass der protektive Effekt einer IPC durch Antagonisierung der miR-21 aufgehoben werden konnte [138]. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch für die renale IPC und IR nachgewiesen werden [139] [140].

Auch für die IR der Leber gibt es erste Hinweise, dass miRNAs möglicherweise bei der Vermittlung des protektiven Effektes einer hepatischen Präkonditionierung involviert sein könnten. Nach Präkonditionierung mit IPC oder Sevofluran zeigten sich *in vivo* bei anschließender IR der Leber Veränderungen der miRNA-Expression im Lebergewebe, welche bei beiden Präkonditionierungsmethoden größtenteils übereinstimmten [141]. Da miRNAs außerdem, wie zum Beispiel let-7b, let 7c [142] und miR-122 [143], einen Einfluss auf hepatoprotektive Enzyme wie die HO-1 haben, ergeben sich wichtige Fragestellungen zu der Bedeutung von miRNAs für die hepatische Präkonditionierung.

1.4 Ziele der Arbeit

Eine IR der Leber wird unter anderem beim hypovolämen und hämorrhagischen Schock sowie bei Leberteilresektionen und Lebertransplantationen induziert. Der resultierende IRS hat Einfluss auf die Morbidität und Mortalität dieser Krankheitsbilder [54] [55] [56] [57]. Obwohl *in vivo*-Untersuchungen gezeigt haben, dass Präkonditionierung eine mögliche Intervention zur Verbesserung des Outcomes nach hepatischem IRS sein könnte, ist bisher kein präkonditionierendes Verfahren der Leber im klinischen Alltag etabliert. Klinisch untersucht wurde die IPC, für die eine protektive Wirkung nachgewiesen werden konnte [89] [90]. Als potentielle pharmakologische Präkonditionierung konnte in *in vivo*-Untersuchungen für mehrere Substanzen eine protektive Wirkung gegen den IRS der Leber nachgewiesen werden. Zu diesen Substanzen gehören sowohl Antagonisten und Rezeptor-Antikörper der proinflammatorischen Zytokine TNF- α [8] und IL-1 [13] als auch die Aminosulfonsäure Taurin [81].

Die vorliegende Studie bearbeitet ein Teilprojekt einer größeren Gesamtstudie zur Untersuchung protektiver Effekte und möglicher Mechanismen einer Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder einem TNF- α -Antagonisten bei partieller warmer Leber-IR. Im Rahmen dieser Gesamtstudie wurde der Effekt der ischämischen beziehungsweise

pharmakologischen Vorbehandlungen auf die Freisetzung der Leberenzyme AST, ALT und LDH als Marker für eine Leberschädigung untersucht.

Die Mechanismen der protektiven Wirkung der Präkonditionierung sind bisher nicht vollständig geklärt. Als ein möglicher Mechanismus wurde die Induktion der HO-1 als wichtiges hepatoprotektives Enzym identifiziert [64] [67].

miRNAs sind klinisch interessant als mögliche Biomarker für einen hepatozellulären Schaden nach IR, könnten aber möglicherweise auch Zielstrukturen für eine therapeutische Intervention zur Abschwächung eines IRS darstellen. Dafür spricht, dass verschiedene miRNAs einen erheblichen Einfluss auf den Leberstoffwechsel haben [101] [103] [110] [114] und ein Zusammenhang zwischen protektiven Effekten der Präkonditionierung und der Veränderung des Expressionsprofils von miRNAs in anderen Organen wie zum Beispiel dem Herzen oder der Niere gezeigt werden konnte [138] [140]. Zudem gibt es auch für die IR der Leber erste Hinweise darauf, dass miRNAs eine Bedeutung für den protektiven Effekt einer Präkonditionierung haben könnten [141]. Diese Bedeutung von miRNAs für protektive Effekte der ischämischen Präkonditionierung beziehungsweise pharmakologischen Vorbehandlung ist allerdings noch unzureichend untersucht.

Aufgrund der großen klinischen Relevanz des hepatischen IRS und des Potentials einer pharmakologischen Präkonditionierung wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen untersucht:

1. Welchen Effekt hat eine IPC beziehungsweise eine Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder einem TNF- α -Antagonisten auf den oxidativen Stress und die Akkumulation neutrophiler Granulozyten im Rahmen der hepatischen IR?
2. Welchen Effekt hat eine IPC beziehungsweise eine Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder einem TNF- α -Antagonisten auf die Expression der Hämoxxygenase-1 als wichtiges hepatoprotektives Enzym im Rahmen der hepatischen IR?
3. Welchen Effekt hat eine IPC beziehungsweise eine Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder einem TNF- α -Antagonisten auf die Expression von miR-21, miR-122, miR-223, miR-142-3p, miR-148a, let-7b und let-7c im Rahmen der hepatischen IR?
4. Können mit einer *in silico*-Analyse Proteine identifiziert werden, die durch Veränderung des miRNA-Profiles nach IPC beziehungsweise Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder einem TNF- α -Antagonisten beeinflusst werden und einen protektiven Effekt vermitteln könnten?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben stammten aus einem *in vivo*-Experiment mit Wistar Ratten zur partiellen warmen IR der Leber. Die Untersuchungen wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen mit der Tierversuchsnummer 87.-51.04.2010.A011 genehmigt. Die *in vivo*-Arbeiten wurden von Frau Dr. med. vet. Claudia Ossowski, seinerzeit veterinärmedizinische Doktorandin, durchgeführt. Als Versuchstiere wurden männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 250-320 g verwendet. Sie hatten bis zur Operation freien Zugang zu Wasser und bis zu 16 Stunden vor Operationsbeginn freien Zugang zu Futter.

2.1.2 Pharmaka

Zur pharmakologischen Vorbehandlung vor partieller warmer IR der Leber wurden Anakinra, Etanercept oder Taurin verwendet. Anakinra ist ein gentechnologisch hergestellter IL-1-ra und wird zur Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Etanercept ist ein TNF- α -Antagonist und wird zur Therapie von rheumatoider Arthritis, adulter chronischer Psoriasis vom Plaque-Typ, Psoriasis-Arthritis, ankylosierender Spondylitis und polyartikulierender juveniler idiopathischer Arthritis verwendet.

Anakinra	Kineret®, Swedish Orphan Biovitrum AB, Stockholm, Schweden
Etanercept	Enbrel®, Pfizer, New York, USA
Taurin	Sigma-Aldrich®, St. Louis MO, USA

2.1.3 Geräte

Laborabzug	Vinitex Airflow-Control, Vinitex Laboratory Systems, Sint Oedenrode, Niederlande
Heizblock	Rotilabo®-Block-Heater H250, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Homogenisator	Dispergierstation T.8.10, Ultra-Turrax [®] , Staufen, Deutschland
Metallpotter	Firma Dick, Deizisau, Deutschland
NanoDrop 1000	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
7300 RealTimePCR Cycler	Applied Biosystems [™] , Foster City, USA
Spannungsgeber der Elektrophorese	Consort Mini ElectrophoresisPower Supply E143, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Spektrophotometer	Synergy 2, BioTek Instruments Inc., Winooski VT, USA
Thermocycler	C1000 [™] Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules CA, USA
Ultraschallbad	Sonorex RK 255 H, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vortexer	Heidolph Reax top, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	VWR [™] Galaxy Mini, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agarose	Roti [®] Garose für die DNA/RNA-Elektrophorese, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Chloroform	Normapur AR for Synthesis, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Complete	Roche AG, Basel, Schweiz
Diethylpyrocarbonat (DEPC) -Wasser	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Dimethylsulfoximin (DMSO)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis MO, USA
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis MO, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (5 mg/ml)	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis MO, USA
Folin-Ciocalteu-Reagenz	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis MO, USA
Formaldehyd	Formaldehyde Solution mind. 37%, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich [®] , St. Louis MO, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hexadecyltrimethylammonium	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumnatriumtartrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Klebefolie zum Versiegeln der 96well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kristalloide Infusionslösung Jonosteril [®]	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Kupfersulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
MPO-Standard	Myeloperoxidase from human leukocytes lyophilized powder, Sigma-Aldrich [®] , St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Fluka Analytical, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Natriumcarbonat	Fluka Analytical, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Natriumhydroxid	Fluka Analytical, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA

n-Butanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NP40 (Nonidet P40 Substitute)	Fluka Analytical, Sigma Aldrich Corporation, St. Louis MO, USA
Phosphorsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Promega Loading Buffer	Promega, Wisconsin, USA
RNase-freies Wasser	Aqua ad iniectabilia Braun, Melsungen, Deutschland
Trizol	life technologies, Carlsbad CA, USA
Reaktionsgefäß (0,2 ml)	Biozym, Wien, Österreich
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sigma 7-9®	Sigma-Aldrich®, St. Louis MO, USA
Sodium Acetat	Sigma-Aldrich®, St. Louis MO, USA
Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich®, St. Louis MO, USA
96well-Platte	96 Well Multiply®-PCR-Plate Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96well-Platte schwarz	96 W black microplate, Greiner Bio-One North America Inc., Monroe NC, USA

2.1.5 Puffer und Lösungen

10x FA Gel Buffer

200 mM 3-MOPS (free acid)

50 mM Sodium Acetat

10 mM EDTA

in 1000 ml DEPC-Wasser

1x FA Gel Running Buffer

100 ml 10x FA Gel Buffer

20 ml 37 %-iges Formaldehyd

880 ml DEPC-Wasser

Loading Buffer

1 ml Promega Loading Buffer

72 µl 37 %iges Formaldehyd

Lysepuffer

10 mM Sigma 7-9 pH 8

1 mM Na-EDTA

400 mM NaCl

10 % Glycerol

0,5 % NP40

1 mM DTT

40 µl/ml Complete

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

1,8 mM KH₂PO₄

1 l destilliertes Wasser

Phosphatpuffer (50mM)

50 mM KH₂PO₄

0,5 % Hexadecyltrimethylammonium

Tetramethylbenzidin-Dimethylsulfoximin

16 mM TMB in

100 % DMSO

Wasserstoffperoxid-Phosphatpuffer

70 µl 30 %iges H₂O₂

30 µl 80 mM KH₂PO₄ (pH 5,4)

2.1.6 Kits und Primer der qRT-PCR

Alle Kits und Primer für die *quantitative real time-polymerase chain reaction* (qRT-PCR) wurden von Applied Biosystems™, Foster City, USA, bezogen.

High Capacity RNA-to-cDNA MasterMix

Master Mix TaqMan® Universal PCR Master Mix, NoAmpErase® UNG

RT Master Mix TaqMan® MicroRNA-Reverse Transcription Kit

TaqMan® 2x Gene Expression MasterMix

Tabelle 1: Zusammensetzung RT Master Mix TaqMan® MicroRNA-Reverse Transcription Kit.

dNTP mix (100 mM total)	0,15 µl
Multiscribe RT enzyme (50 U/µl)	1 µl
10x RT Buffer	1,5 µl
RNAse Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl

Mengenangaben jeweils für eine Probe.

Tabelle 2: Primersequenzen.

Gen	Applied Biosystems Assay ID	NCBI Reference Sequence/ mature miRNA sequence
GAPDH	Rn01775763_g1	NM_017008.3
HO-1 (Hmox 1)	Rn01536933_m1	NM_012580.2
let-7b (hsa-let-7b)	002619	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU
let-7c (hsa-let-7c)	000379	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU
MiR-21 (hsa-miR-21)	000397	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
MiR-122 (hsa-miR-122)	002245	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG
miR-142-3p (hsa-miR-142-3p)	000464	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA
miR-148a (hsa-miR-148a)	000470	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
MiR-223 (hsa-miR-223)	000526	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC
U6 (U6 snRNA)	001973	GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAA TTGGAACGATACAGAGAAGATTAGCATGGC CCCTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTG AAGCGTTCCATATTTT

2.1.7 Software

Gen5™ Datenanalyse-Software	BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA
GenEx 5	MultiD Analyses AB, Göteborg, Schweden
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA
Nanodrop 1000 3.8.0	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
7300 System Software	Applied Biosystems™, Foster City, USA
TargetScanHuman Release 7.1	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA

2.2 *in vivo*-Versuchsaufbau

2.2.1 *in vivo*-Modell der partiellen warmen Leberischämie

Das in dieser Dissertation beschriebene *in vivo*-Modell der partiellen warmen Leberischämie mit Reperfusion bei der Ratte wurde nicht von mir selbst durchgeführt, sondern von Frau Dr. med. vet. Claudia Ossowski, Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (Arbeitsgruppe von Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Braun). Die hierbei gewonnenen Lebergewebeproben wurden bei -80°C gelagert. Meine Arbeit bestand in der Aufbereitung des gefrorenen Lebergewebes und der sich anschließenden Analysen. Da die *in vivo*-Untersuchungen die Grundlage für mein Dissertationsprojekt liefern, ist das hierzu verwendete experimentelle Modell zum besseren Verständnis der Studie in der vorliegenden Dissertationsschrift beschrieben.

Bei den Versuchstieren wurde die Narkose mit intraperitonealer Gabe von Pentobarbital 60 mg/kg eingeleitet und nachfolgend mit intravenöser Gabe von Pentobarbital 24 mg/kg/h aufrechterhalten. Nach der endotrachealen Intubation wurden die Tiere beatmet. Über einen in die *A. carotis* eingelegten arteriellen Zugang wurden Herzfrequenz und Blutdruck aufgezeichnet sowie Blutgasanalysen durchgeführt. Alle Versuchstiere mit Ausnahme der SHAM-Gruppe wurden einer 60-minütigen partiellen warmen Ischämie von 70 % der Leber und einer darauffolgenden 60-minütigen Reperusionszeit unterzogen. Der Zugang zur Leber erfolgte über eine mediane Laparotomie. Der Gallengang wurde präpariert und die Galle abgeleitet. Um die Leberischämie einzuleiten, wurde an der Leberpforte ein Gefäßclip angebracht. Anhand der Verfärbung der Leber wurde beurteilt, ob die Gefäßunterbrechung erfolgreich war. Die Bauchhöhle wurde nach Beginn der Ischämiezeit mit einer Naht verschlossen. Am Ende der 60-minütigen Ischämiezeit wurde die Bauchhöhle wieder eröffnet.

Der Gefäßclip wurde gelöst. Anhand der erneuten Farbänderung des Lebergewebes wurde überprüft, ob das Lebergewebe reperfundiert wurde. Die Reperfusion wurde für eine Dauer von 60 Minuten durchgeführt. Die Bauchhöhle wurde vernäht.

Die Versuchstiere wurden nach Ende der Reperfusionszeit per Pentobarbitalbolus und Exsanguierung euthanasiert. Den Versuchstieren wurde arteriell Blut entnommen, um die Enzymaktivitäten von AST, ALT und LDH bestimmen zu können. Die *Vena cava inferior* wurde zwerchfellnah eröffnet, um die Leber mit Natriumchlorid-Lösung zu spülen. Im Anschluss wurde der ischämische Anteil der Leber entnommen, in etwa 1 cm x 0,5 cm x 0,5 cm große Stücke geschnitten, die Stücke in Probengefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Aufbereitung gelagert.

2.2.2 Versuchsgruppen

Die SHAM-Gruppe wurde nur einer SHAM-Operation unterzogen und erhielt keine IR. Bei den Versuchstieren der IR-Gruppe wurde eine 60-minütige Ischämie und anschließende 60-minütige Reperfusion der Leber durchgeführt. Bei den Versuchstieren der IPC/IR-Gruppe wurde vor Beginn der Leberischämiezeit eine zehn Minuten dauernde Leberischämie zur Präkonditionierung verwendet. Die Bauchdecke wurde in diesen zehn Minuten mit Klemmen verschlossen. Nach zehnminütiger Reperfusionszeit wurde mit der 60-minütigen Leberischämie begonnen. Den Versuchstieren der Taurin/IR-Gruppe wurde vor Versuchsbeginn eine Woche lang 3 %ige Taurinlösung über das Trinkwasser verabreicht. Den Versuchstieren der Etanercept/IR-Gruppe wurden eine Stunde vor Beginn der Leberischämie 8 mg Etanercept pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Den Versuchstieren der Anakinra/IR-Gruppe wurden zu zwei Zeitpunkten, einmal 24 Stunden vor und einmal eine Stunde vor Beginn der Leberischämie, jeweils 100 mg/kg Körpergewicht Anakinra intraperitoneal verabreicht.

Tabelle 3: Versuchsprotokolle nach Versuchsgruppen aufgelistet (n=8 pro Versuchsgruppe).

Versuchsgruppe	Versuchsprotokoll
SHAM-Gruppe	keine Vorbehandlung, 120 Minuten Narkose, Leberpräparation ohne Ischämie-Reperfusion
IR-Gruppe	keine Vorbehandlung, 60 Minuten Ischämie, 60 Minuten Reperfusion
IPC/IR-Gruppe	10 Minuten ischämische Präkonditionierung, 10 Minuten Reperfusion, 60 Minuten Ischämie, 60 Minuten Reperfusion
Taurin/IR-Gruppe	Taurin per os (3 %ige Trinklösung) für sieben Tage, 60 Minuten Ischämie, 60 Minuten Reperfusion
Etanercept/IR-Gruppe	Etanercept 8 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal 60 Minuten vor Ischämie, 60 Minuten Ischämie, 60 Minuten Reperfusion
Anakinra/IR-Gruppe	Anakinra 100 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal 24 Stunden und 60 Minuten vor Ischämie, 60 Minuten Ischämie, 60 Minuten Reperfusion

2.3 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Expression der microRNAs let-7b, let-7c, miR-21, miR-122, miR-142-3p, miR-148a, miR-223 und die Genexpression der HO-1 wurde mittels qRT-PCR gemessen. Hierzu wurde im ersten Schritt die RNA aus dem Lebergewebe isoliert und in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

2.3.1 RNA-Isolierung

Aus dem *in vivo* gewonnenen ischämischen Lebergewebe wurde die RNA isoliert. Hierzu wurden von jeder Probe etwa 50 mg Gewebe abgewogen. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit dem Metallpotter wurden die Proben einzeln pulverisiert. Jede Probe wurde in einem Reaktionsgefäß (2 ml) in 0,5 ml Trizol homogenisiert. Es erfolgte eine

Inkubationszeit von mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 0,1 ml Chloroform wurden die Proben 15 Sekunden lang vorsichtig geschüttelt und zwei bis drei Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proben wurden 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) übertragen, die feste Phase verworfen. Zur wässrigen Phase wurden 0,25 ml 70 %iger Isopropylalkohol hinzugefügt und gevortext.

Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 12.000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen.

Zu der festen Phase der Proben wurde zum Auswaschen des verwendeten Trizols 0,5 ml 75 %iges Ethanol hinzugefügt. Die Proben wurden bei 7.500 g und 4 °C fünf Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde abpipettiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Danach wurden die Proben auf Eis im Abzug getrocknet, bis nur noch das RNA-enhaltende *pellet* im Reaktionsgefäß vorhanden war.

RNAse-freies Wasser wurde im Heizblock auf 95 °C erhitzt. Die *pellets* wurden je nach Größe in 50, 75 oder 100 µl heißem Wasser aufgelöst und gevortext. Die Lösung wurde unverzüglich auf Eis gekühlt.

2.3.2 Spektrophotometrische Messung von Konzentration und Reinheit der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde im NanoDrop 1000 photometrisch bestimmt. Es wurde die optische Dichte (OD) der RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD₂₆₀) gemessen. Aus der OD₂₆₀, der Verdünnung V und einem für RNA spezifischen Multiplikationsfaktor F kann die Konzentration c (µg/ml) der RNA ermittelt werden (siehe Formel).

$$c(\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} * V * F$$

Die Zielwerte der Konzentration lagen zwischen 150 ng/µl und 3000 ng/µl. Gegebenenfalls wurde die Probe erneut mit RNAse-freiem Wasser verdünnt, um diese Werte zu erreichen.

Aus dem Verhältnis von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ kann eine mögliche Kontamination der RNA mit Proteinen festgestellt werden. Der Quotient OD_{260/280} gibt Aufschluss über die Verunreinigung der Nukleinsäuren mit Protein, da Protein im Gegensatz zu Nukleinsäuren nur ein Absorptionsmaximum aufweist. Das Verhältnis von OD₂₆₀:OD₂₈₀ der RNA beträgt 2:1. Bei einem Quotienten $\geq 1,9$ ist eine Verunreinigung unwahrscheinlich. Bei einem photometrisch bestimmten Quotienten unter 1,9 wurde die RNA erneut aus dem Lebergewebe

isoliert und die Messung wiederholt.

Die Proben wurden nach der Messung bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.3 Messung der RNA-Intaktheit durch Gelelektrophorese

Um die Intaktheit der RNA zu überprüfen, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Bei diesem Verfahren wandert die negativ geladene RNA von der Kathode zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller als größere wandern. Zur Messung wurde Ethidiumbromid verwendet, welches mit der RNA interkaliert und Fluoreszenz emittiert. Wenn die RNA nicht durch RNAsen zersetzt worden ist, sind nach der Elektrophorese die 28S- und die 18S-Bande der ribosomalen RNA (rRNA) deutlich voneinander getrennt zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität der beiden Banden steht im Verhältnis von circa 2:1 (28S- zu 18S-Bande).

Zur Herstellung des Gels wurden 1,2 g Agarose, 10 ml 10x FA Gel Puffer und 90 ml DEPC Wasser in einen Erlenmeyerkolben gegeben und im Mikrowellengerät drei Minuten lang erhitzt. Unter dem Abzug wurden 2 µl Ethidiumbromid und 1,8 ml Formaldehyd zugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelform gefüllt. Es wurde an der Seite der Kathode ein Kamm eingesetzt, sodass Taschen für die Proben entstanden. Das Gel härtete 30 Minuten lang aus.

Die Proben wurden vorbereitet, indem 2,5 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µl verdünnt wurden. Es wurden 3 µl Loading Buffer zugegeben. Die vorbereiteten Proben wurden im Thermocycler für eine Dauer von zehn Minuten auf 70 °C erhitzt.

Die Elektrophoresekammer wurde mit 1x FA Running Buffer gefüllt. Der Kamm wurde entfernt und in die entstandenen Taschen wurden je 18 µl Probe pipettiert. Die Elektrophorese wurde für die Dauer einer Stunde bei einer Spannung von 100 Volt durchgeführt.

Nach der Beendigung der Elektrophorese wurden die RNA-Banden visualisiert. Wenn mehr als zwei prominente Banden auftraten oder die 28S- und die 18S-Bande der rRNA in einem Verhältnis von unter 2:1 standen, wurden die vorhergehenden Schritte wiederholt und die Gelelektrophorese wurde erneut durchgeführt.

2.3.4 Reverse Transkription und qRT-PCR

Da die thermostabilen Polymerasen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA-spezifisch sind, wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden RNA-abhängige DNA-Polymerasen, die reversen Transkriptasen, und Primer benötigt.

Als reverse Transkriptase nutzen wir eine rekombinant hergestellte Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase. Für die Analyse der Genexpression wurden Primer verwendet, mithilfe derer die Gesamt-RNA in einzelsträngige cDNA umgeschrieben wird. Für die miRNA-Analyse wurden spezifische TaqMan[®] Micro RNA Assays verwendet, welche nur die Transkription der zu untersuchenden miRNA ermöglichen. Diese Assays enthalten miRNA-spezifische *stem-loop* RT Primer. Die Primer binden mit dem 3'-Ende spezifisch an die miRNA. Am 5'-Ende befindet sich eine universelle *stem-loop* Struktur.

Bei der qRT-PCR erfolgt die Messung der DNA-Menge über die emittierte Fluoreszenz. In dieser Arbeit wurden hierfür TaqMan-Sonden verwendet. Diese Sonden nutzen den *Fluorescence resonance energy transfer* (FRET, Abb. 4). Dabei befindet sich an der Sonde am 5'-Ende ein Fluoreszenz-emittierendes Fluorochrom (*Reporter*), am 3'-Ende ein nicht fluoreszierendes Fluorochrom (*Quencher*) und damit verbunden ein *Minor groove binder*. *Minor groove binder* erhöhen die Schmelztemperatur ohne Erhöhung der Sondenlänge und ermöglichen so eine geringere Sondenlänge. Die Sonde wird bei der Synthese durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Dadurch entfernen sich Reporter und Quencher voneinander und es kann eine zunehmende Fluoreszenz gemessen werden, die zur Menge der PCR-Produkte proportional ist.

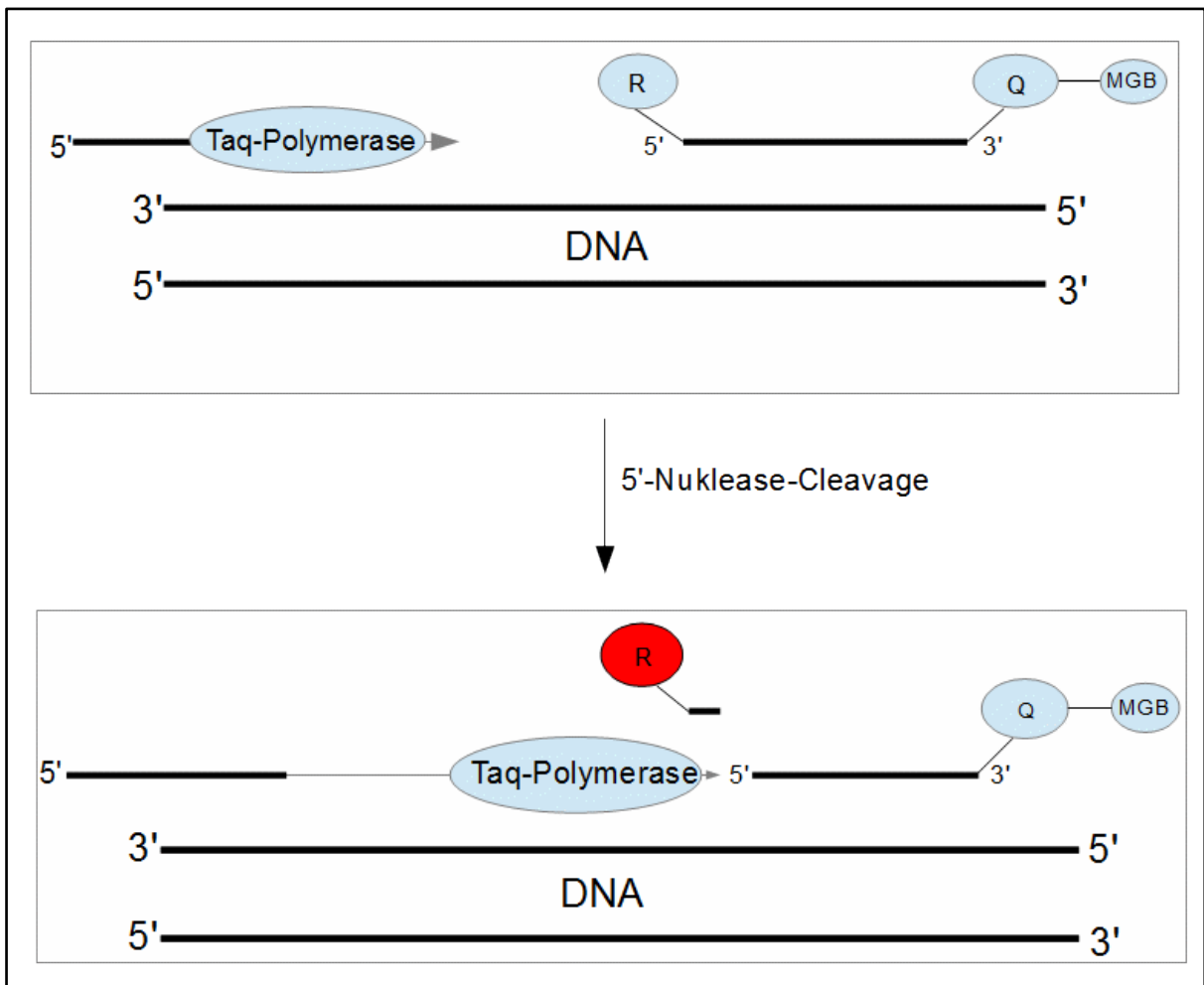


Abb. 4: Fluorescence resonance energy transfer (FRET).

Modifiziert nach [144]. Beim FRET wird im Rahmen der DNA-Synthese bei der PCR durch die Taq-Polymerase mittels 5'-Nuklease-Cleavage der Reporter von der Sonde freigesetzt. Hierdurch kommt es zur zunehmenden Fluoreszenz. R: Reporter, Q: Quencher, MGB: Minor groove binder, R (rot): freigesetzter, fluoreszierender Reporter.

Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression der HO-1 und der Expression der miRNAs wurde die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt. Für die relative Quantifizierung der miRNAs wurde als *housekeeper* die small RNA U6, für die Quantifizierung der HO-1 die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. So kann die gemessene Expression der PCR-Produkte relativ auf die Expression des *housekeepers* normalisiert werden. Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden als $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Werte angegeben. Hierbei ist C_T der *Threshold Cycle*, also der Zyklus in der PCR, in dem das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert T (*Threshold*) erreicht. Der *Threshold Cycle* liegt in der exponentiellen Phase der DNA-Amplifikation. In dieser Phase kann die DNA am genauesten quantifiziert werden. Der ΔC_T -Wert ergibt sich aus den C_T -Werten der zu untersuchenden Substanzen abzüglich

der C_T -Werte der *housekeeper*. Aus den ΔC_T -Werten wird durch Bezug auf die Kontrollgruppe der $\Delta\Delta C_T$ -Wert ermittelt. Die Expression der zu untersuchenden Substanzen der Interventionsgruppen in Relation zur Kontrollgruppe wird berechnet mit der Ratio $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

2.3.5 microRNA-Expression

2.3.5.1 RNA-Transkription für microRNA

Die RNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf eine Zielkonzentration von 2 ng/ μ l verdünnt. Grundlage war die im Nanodrop ermittelte RNA-Konzentration. Es wurden 10 ng RNA pro Reaktion eingesetzt, entsprechend 5 μ l von jeder Probe. Dem RT Master Mix wurden 4,16 μ l RNase-freies Wasser hinzugefügt. Zur RNA wurden 7 μ l RT Master Mix und 3 μ l RT Primer 5x hinzugefügt.

Die Proben wurden kurz zentrifugiert. Die vorbereitete RNA wurde während der reversen Transkription im Thermocycler in drei Phasen erhitzt: 30 Minuten bei 16 °C, 30 Minuten bei 42 °C und fünf Minuten bei 85 °C. Im Anschluss an die Transkription wurde die cDNA bis zur Entnahme bei 12 °C im Thermocycler aufbewahrt.

2.3.5.2 qRT-PCR zur Bestimmung der microRNA-Expression

Die optimale Verdünnung der cDNA wurde mithilfe einer Standardkurve ermittelt. Die cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Für die miRNAs let-7b und let-7c wurde eine Verdünnung von 1:50, für miR-21, miR-142-3p, miR-148a, miR-223 und U6 eine Verdünnung von 1:10 und für die miR-122 eine Verdünnung von 1:100 verwendet.

Für die qRT-PCR wurden in die Wells je 1 μ l TaqMan[®] MicroRNA Assay 20x, 10 μ l TaqMan[®] Universal PCR Master Mix und 8 μ l Nuklease-freies Wasser pipettiert. Es wurde pro Well 1 μ l DNA hinzugegeben. Für jede Probe wurden Doppelwerte angesetzt. Als Kontrolle der Assays wurde 1 μ l RNase-freies Wasser in ein Well pipettiert. Die 96well-Platte wurde auf Eis gekühlt. Die 96well-Platte wurde mit Klebefolie versiegelt, für eine Minute bei 4 °C zentrifugiert und im 7300 RealTimePCR Cycler gemessen. Nach initialem Erhitzen auf 50 °C für 2 Minuten erfolgte die Denaturierung der cDNA bei 95 °C für 10 Minuten und anschließend die Amplifikation mit 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95 °C und einer Minute bei 60 °C. Als Ergebnisse wurden ΔC_T -Werte ermittelt.

2.3.6 TargetScan-Analyse

Zur Ermittlung potentieller Zielstrukturen der untersuchten miRNAs wurde eine TargetScan-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde TargetScanHuman Release 7.1 genutzt. Beim TargetScan werden potentielle Ziel-mRNAs einer miRNA durch die zur *Seed*-Region passenden 3'UTR-Regionen bestimmt [145]. Dabei werden in verschiedenen Spezies konservierte 3'UTR-Regionen ermittelt [98]. Als potentielle Zielstrukturen einer miRNA wurden in dieser Arbeit mRNAs mit einem *Cumulative weighted context score* [146] von -0,4 bis -1 gewertet.

2.3.7 Genexpression

2.3.7.1 RNA-Transkription für Genexpression

Für die Messung der Genexpression von HO-1 wurde die RNA in DNA transkribiert. Hierzu wurde die RNA auf eine Konzentration von 1 µg in 16 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Es wurde ein Reaktionsmix aus 16 µl RNA und 4 µl High Capacity RNA-to-cDNA MasterMix pipettiert und für einige Sekunden zentrifugiert. Im Thermocycler wurde die RNA zur Transkription in drei Phasen erhitzt: 5 Minuten bei 25 °C, 30 Minuten bei 42 °C und 5 Minuten bei 85 °C. Im Anschluss wurde die cDNA bis zur Entnahme bei 12 °C im Thermocycler aufbewahrt.

2.3.7.2 qRT-PCR zur Bestimmung der Genexpression

Für die cDNA wurde mithilfe einer Standardkurve die optimale Verdünnung ermittelt. Die cDNA wurde für die Bestimmung von GAPDH und HO-1 mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt.

Zur Bestimmung der Genexpression mittels qRT-PCR wurden in jedes Well 1 µl TaqMan® Gene Expression Assay 20x und 10 µl TaqMan® 2x Gene Expression MasterMix in die auf Eis gekühlte 96well-Platte pipettiert. Es wurden pro Probe 9 µl DNA hinzugegeben. Als Kontrollwert wurden 9 µl RNase-freies Wasser verwendet. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die 96well-Platte wurde versiegelt, für eine Minute bei 4 °C zentrifugiert und im 7300 RealTimePCR Cycler gemessen. Die Amplifikation erfolgte wie bei der qRT-PCR zur Bestimmung der miRNA-Expression nach Erhitzen auf 50 °C für 2 Minuten und Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten in 40 Zyklen von 15 Sekunden bei

95 °C und einer Minute bei 60 °C. Als Ergebnisse wurden Δ CT-Werte bestimmt.

2.3.8 MDA-Assay

Als Marker für die LPO kann MDA gemessen werden [147] [148]. MDA ist eine *thiobarbituric acid reactive substance* (TBAR), also eine Substanz, welche mit Thiobarbitursäure (TBS) reagiert und dadurch quantifiziert werden kann [149]. Ein Molekül MDA reagiert mit zwei Molekülen TBS. Es bildet sich ein roter Farbstoff [150]. Die durch diesen Farbstoff verursachte Extinktion kann spektrophotometrisch gemessen werden. Die MDA-Konzentration im Lebergewebe wurde in dieser Arbeit ausschließlich für die Versuchsgruppen SHAM, IR, IPC/IR und Taurin/IR bestimmt.

Je etwa 50 mg der Lebergewebeproben wurden in einem Reaktionsgefäß abgewogen. Durch Auflösen von 0,575 g Kaliumchlorid (KCl) in 50 ml destilliertem Wasser wurde eine 1,15 %ige KCl-Lösung erstellt. Die Proben wurden nach Hinzufügen von 500 µl der KCl-Lösung homogenisiert. Vom Homogenisat jeder Probe wurden 0,25 ml in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. 0,3 g TBS wurden in 50 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Es wurden 0,5 ml der verdünnten TBS und 1,5 ml 1 %ige Phosphorsäure hinzugegeben und gevortext. Die Proben wurden 45 Minuten lang bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurde den Proben je 2 ml n-Butanol hinzugefügt, um eine mögliche Interferenz von Hämoglobin und Hämoglobinderivaten zu minimieren. Die Proben wurden bei 3500 rpm 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen. Die Extinktion wurde im Spektrophotometer bei Wellenlängen von 535 nm und 520 nm gemessen und die Differenz der Extinktion beider Wellenlängen bestimmt. Zur Quantifizierung von MDA wurde eine Standardreihe mit Malonaldehydbisdimethylacetal (Synonym: 1,1,3,3-Tetrametoxypentan (TMP)) erstellt. Dazu wurde TMP einer Konzentration von 20 nmol/ml mit 1,15 %iger KCl-Lösung auf Konzentrationen von 10, 5 und 2,5 nmol/ml verdünnt. Die Standardreihe wurde spektrophotometrisch gemessen und eine Standardkurve erstellt. Durch Bezug auf die Standardkurve wurde die Konzentration der MDA in nmol/ml ermittelt.

Die MDA-Konzentration wurde auf die mittels Lowry-Verfahren bestimmte Proteinkonzentration bezogen. Das Verfahren nach Lowry ermöglicht eine Quantifizierung mittels Spektrophotometer. Es beruht auf zwei Schritten. In einem ersten Schritt reagieren in alkalischer Lösung die vorhandenen Proteine mit Kupfer. Diese Reaktion wird als Biuret-Reaktion bezeichnet. Im zweiten Schritt wird Folin-Ciocalteu-Reagenz durch die mit Kupfer vorbehandelten Proteine reduziert, sodass die gelbe Farbe des Reagenzes in blaue Färbung

umgewandelt wird [151]. Die Extinktion, die durch die Blaufärbung entsteht, wird spektrophotometrisch gemessen. Um die Extinktion als Proteinkonzentration quantifizieren zu können, wurde jeweils eine Standardkurve durch Messung verschiedener definierter Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry wurde den mit KCl-Lösung homogenisierten Proben Lysepuffer hinzugegeben und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde fünf Minuten lang bei 4 °C und 16060 g zentrifugiert. Der Überstand mit dem isolierten Protein wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 2 µl abpipettiert und in einem Verhältnis von 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt. Für die Standardkurve wurde eine Standardreihe erstellt. Hierzu wurde BSA mit destilliertem Wasser zu aufsteigenden Konzentrationen eingestellt. Neben den Verdünnungen wurde destilliertes Wasser gemessen (Tab. 4).

Tabelle 4: Bovines Serumalbumin-Standardreihe zur Proteinquantifizierung.

Standard Nummer	Menge BSA (µl)	Menge Wasser (µl)	Zielkonzentration BSA (µg/ml)
0	0	500	0
1	31,2	468,7	12,5
2	62,5	437,5	25
3	125	375	50
4	250	250	100
5	375	125	150
6	500	0	200

Für die Proteinbestimmung wurde eine Lösung (Lösung 1) aus den Reagenzien A, B und C (Tab. 5) im Verhältnis 1:10:10 hergestellt. Eine weitere Lösung (Lösung 2) wurde hergestellt, indem Folin-Ciocalteu-Reagenz mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1 verdünnt wurde.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Reagenzien der Proteinquantifizierung nach Lowry.

Reagenz	Salz	Lösungsmittel
Reagenz A	10 g Natriumbicarbonat	500 ml 0,1 M Natriumhydroxid
Reagenz B	2 g Kaliumnatriumtartrat	100 ml destilliertes Wasser
Reagenz C	1 g Kupfersulfat	100 ml destilliertes Wasser

Je 100 µl des Standards beziehungsweise der verdünnten Proben wurden in Reaktionsgefäße pipettiert. Es wurden 500 µl der Lösung 1 hinzugegeben und gevortext. Anschließend wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 50 µl der Lösung 2 hinzugegeben, erneut gevortext und mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Probe wurden 200 µl in einer 96-well-Platte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Durch Bezug auf die gemessene Standardreihe wurde die Gesamt-Proteinkonzentration der Probe berechnet, hiernach wurde die MDA-Konzentration durch Bezug auf die Gesamt-Proteinkonzentration in nmol/mg Protein bestimmt.

2.3.9 MPO-Assay

Als Marker der Akkumulation neutrophiler Granulozyten beim IRS kann die Analyse der MPO-Aktivität herangezogen werden [152] [153]. Zur Quantifizierung von Peroxidasen kann Benzidin genutzt werden. Peroxidasen katalysieren die Oxidation von Benzidin zu einem blau gefärbten Diimin [154]. Für die Messung der MPO-Aktivität wurde ein Assay mit Tetramethylbenzidin (TMB) genutzt [155]. TMB reagiert mit Wasserstoffperoxid. Dabei wird Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert und TMB zum blauen Diimin oxidiert. Die durch die Blaufärbung verursachte Extinktion wird spektrophotometrisch gemessen. Die MPO-Aktivität im Lebergewebe wurde in dieser Arbeit ebenfalls nur für die Versuchsgruppen SHAM, IR, IPC/IR und Taurin/IR bestimmt.

Für den MPO-Assay wurden etwa 50 mg jeder Lebergewebeprobe in einem Reaktionsgefäß abgewogen. Das Gewebe wurde in je 500 µl Phosphatpuffer homogenisiert. Im Phosphatpuffer war Hexadecyltrimethylammonium (HTA) enthalten. HTA bewirkt als Detergens, dass MPO aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird [156]. Anschließend wurden die Proben für 30 Sekunden im Ultraschallbad sonifiziert. Die Proben wurden drei Mal in flüssigem Stickstoff gefroren, wieder aufgetaut und erneut für 30 Sekunden im Ultraschallbad sonifiziert. Hiernach wurden die Proben für zwei Stunden bei 60 °C im Thermocycler inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben bei 4000 g und 4 °C für zwölf Minuten zentrifugiert. Vom Überstand der Proben wurden 20 µl abpipettiert und in je eine Vertiefung einer 96well-Platte gefüllt. Es wurden 10 µl TMB-Dimethylsulfoximin (DMSO) und 70 µl Wasserstoffperoxid (H₂O₂) -Phosphatpuffer hinzugegeben. Die Platte wurde fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 655 nm gemessen. Zur

Quantifizierung wurde eine Standardreihe erstellt, indem MPO-Standard-Lösung einer Konzentration von 10 µg/ml auf Konzentrationen von 10, 7, 5, 2,5 und 1,25 µg/l verdünnt wurde. Die Extinktion der Standardreihe wurde gemessen und eine Standardkurve erstellt. Durch Bezug auf die Standardkurve wurde die MPO-Aktivität in U/g Lebergewebe ermittelt.

2.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Enzym-Aktivitäten von AST, ALT, LDH und MPO sowie der MDA-Konzentration wurden mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse der Enzym-Aktivitäten AST, ALT und LDH wurden im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. med. vet. Ossowski statistisch ausgewertet. Die Daten wurden mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung geprüft. Für normalverteilte Daten wurden jeweils Mittelwerte und Standardabweichung bestimmt. Zur Beurteilung signifikanter Veränderungen der AST-, ALT- und LDH-Aktivität wurde ein *One-Way-ANOVA* mit Dunnetts-post-hoc-Test angewandt. Zur Beurteilung signifikanter Veränderungen der MPO-Aktivität und MDA-Konzentration wurde ein *One-Way-ANOVA* mit selected pairs und post-hoc-Bonferroni-Korrektur angewandt. Die Signifikanz von Veränderungen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test bestimmt.

Die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse erfolgte mit GenEx 5 (MultiD Analyses AB, Göteborg, Schweden). Die Expression der HO-1 mRNA und die Expression der miRNAs miR-21, miR-122, miR-142-3p, miR-148a und miR-223 sowie der miRNA-Präkursoren let-7b und let-7c wurden auf die SHAM-Gruppe normiert. Zur Beurteilung signifikanter Veränderungen wurde ein *One-Way-ANOVA* groups vs. control mit IR als Kontrollgruppe verwendet. Signifikanz wurde jeweils definiert als $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

Als hepatische Schadensparameter lagen aus der Dissertation von Frau Dr. med. vet. Ossowski die Enzymaktivitäten AST, ALT und LDH des Serums vor. Zur Veranschaulichung sind diese Ergebnisse hier nochmals mit Erlaubnis von Frau Dr. med. vet. Ossowski tabellarisch aufgeführt. In eigenen Messungen wurde der oxidative Stress anhand der MDA-Konzentration sowie die hepatische Neutrophilenakkumulation anhand der MPO-Aktivität im Lebergewebe ermittelt (es wurden die Gruppen mit signifikant verändertem Enzymprofil betrachtet). Die Analyse der hepatischen mRNA-Expression der HO-1 sowie der miRNA-Expression (miRNAs 21, 122, 233, 142-3p, 148a, let-7b und let-7c) betrachtete die Interventionsgruppen im Vergleich zur IR-Gruppe.

3.1 Parameter des hepatischen Ischämie- Reperfusions-Schadens

3.1.1 Serumaktivitäten der Enzyme AST, ALT und LDH

Für die Enzyme AST, ALT und LDH wurden signifikant gesteigerte Aktivitäten bei der IR-Gruppe im Vergleich zur SHAM-Gruppe nachgewiesen. Eine IPC verringerte den anhand dieser Enzyme ermittelten IRS signifikant. Zudem konnte durch eine Vorbehandlung mit Taurin eine signifikante Reduzierung der AST- und LDH-Aktivität erzielt werden. Die Enzym-Aktivitäten der Versuchsgruppen Etanercept/IR und Anakinra/IR wiesen keine signifikanten Unterschiede zur IR-Gruppe auf (Tab. 6).

Tabelle 6: Serumaktivitäten von AST, ALT und LDH.

Versuchsgruppe	n	AST [U/l]	ALT [U/l]	LDH [U/l]
SHAM	8	125 ± 67 ★	72 ± 76 ★	527 ± 268 ★
IR	8	1936 ± 912	2043 ± 1154	11029 ± 5942
IPC/IR	8	1105 ± 364 ★	1233 ± 450 ★	6164 ± 2318 ★
Taurin/IR	8	981 ± 370 #	1125 ± 601	4073 ± 3327 #
Etanercept/IR	8	1756 ± 865	1983 ± 1133	9977 ± 7225
Anakinra/IR	8	1303 ± 800	1482 ± 1131	6143 ± 4485

Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung. Es wurden die Gruppen SHAM und IPC/IR gegen IR (★ $p < 0,05$ gegen IR) und die Gruppen Taurin/IR, Etanercept/IR und Anakinra/IR gegen IR getestet (# $p < 0,05$ gegen IR). n: Gruppengröße.

3.1.2 MDA-Konzentration im Lebergewebe

Die MDA-Konzentration im Lebergewebe wurde für die Versuchsgruppen SHAM, IR, IPC/IR und Taurin/IR bestimmt. Es konnte so untersucht werden, ob eine signifikante Änderung des hepatischen Enzymprofils durch IR (vs. SHAM) beziehungsweise IPC und Taurin (vs. IR) mit einer gleichsinnigen Änderung der hepatischen Lipidperoxidation als Parameter des oxidativen Stresses einhergeht. Die IPC/IR-Gruppe wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Es konnten weder signifikante Veränderungen der MDA-Konzentration nach IR im Vergleich zu SHAM noch nach Intervention mit IPC oder Taurin im Vergleich zu IR festgestellt werden (Tab. 7).

Tabelle 7: MDA-Konzentration im Lebergewebe.

Versuchsgruppe	n	MDA [nmol/mg Protein]
SHAM	8	0,12 ± 0,07
IR	8	0,13 ± 0,06
IPC/IR	8	0,13 ± 0,03
Taurin/IR	8	0,36 ± 0,65

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung.
n: Gruppengröße.

3.1.3 MPO-Aktivität im Lebergewebe

Die Aktivität der MPO wurde ebenfalls ausschließlich für die SHAM-, IR-, IPC/IR- und Taurin/IR-Gruppe bestimmt. Hierdurch sollte untersucht werden, ob durch IR neben der signifikanten Zunahme der Schadensparameter auch eine signifikante Zunahme der Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Leber stattfindet, und ob Taurin die Neutrophilenakkumulation vermindern kann. Die MPO-Aktivität der IPC/IR-Gruppe wurde auch hier im Sinne einer Positivkontrolle bestimmt.

Im Lebergewebe der IR-Gruppe war die MPO-Aktivität im Vergleich zur SHAM-Gruppe nicht signifikant erhöht. Die Intervention mit IPC beziehungsweise Taurin veränderte die MPO-Aktivität im Vergleich zu IR nicht (Tab. 8).

Tabelle 8: MPO-Aktivität im Lebergewebe.

Versuchsgruppe	n	MPO [U/g Lebergewebe]
SHAM	8	0,24 ± 0,05
IR	8	1,57 ± 3,69
IPC/IR	8	0,47 ± 0,71
Taurin/IR	8	0,23 ± 0,04

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. n: Gruppengröße.

3.2 HO-1 mRNA-Expression im Lebergewebe

Es wurde die Expression der HO-1 mRNA der Interventionsgruppen IPC/IR, Taurin/IR, Etanercept/IR und Anakinra/IR mit der Expression der IR-Gruppe verglichen. Keine der Interventionen führten zu einer signifikanten Änderung der mRNA-Expression von HO-1 (Tab. 9).

Tabelle 9: Relative HO-1 mRNA-Expression.

Versuchsgruppe	n	HO-1
IR	8	0,99 ± 0,30
IPC/IR	8	0,98 ± 0,37
Taurin/IR	8	0,87 ± 0,44
Etanercept/IR	8	0,98 ± 0,22
Anakinra/IR	8	1,0 ± 0,54

Daten sind angegeben als Mittelwerte ± Standardabweichung. Die HO-1 mRNA-Expression wurde durch Bezug auf die SHAM-Gruppe relativiert. HO-1: HO-1 mRNA. n: Gruppengröße.

3.3 Ergebnisse der microRNA-Analyse

3.3.1 Relative Expression der microRNA-223 in der Leber

Es wurde die Expression der miR-223 der IPC/IR-, Taurin/IR-, Etanercept/IR- und Anakinra/IR-Gruppe mit der IR-Gruppe verglichen. Der Vergleich ergab nur für die Taurin/IR-Gruppe einen signifikanten Anstieg der Expression der miR-223 (Abb. 5 und Tab. 10).

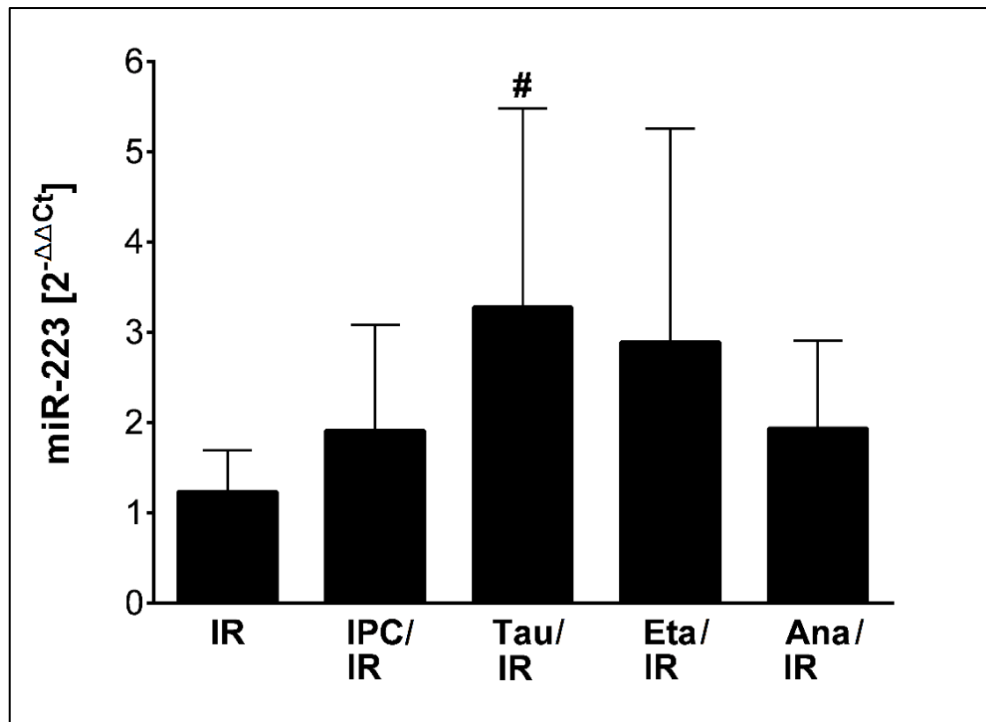


Abb. 5: Relative Expression der microRNA-223.

Relative miR-223-Expression [2^{-ΔΔCt}] in Bezug auf die Werte der SHAM-Gruppe, dargestellt als Mittelwerte + Standardabweichung. IR: IR-Gruppe; IPC/IR: IPC/IR-Gruppe; Tau/IR: Taurin/IR-Gruppe; Eta/IR: Etanercept/IR-Gruppe; Ana/IR: Anakinra/IR-Gruppe. # signifikanter Unterschied zu IR (p<0,05).

Tabelle 10: Relative microRNA-223-Expression.

Versuchsgruppe	n	miR-223
IR	8	1,23 ± 0,46
IPC/IR	8	1,91 ± 1,17
Taurin/IR	8	3,28 ± 2,20 #
Etanercept/IR	8	2,89 ± 2,37
Anakinra/IR	8	1,94 ± 0,97

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Die miR-223-Expression wurde relativiert durch Bezug auf die SHAM-Gruppe. # signifikanter Unterschied (p<0,05) zu IR. n: Gruppengröße.

3.3.2 Relative Expression von let-7b, let-7c, microRNA-21, microRNA-122, microRNA-142-3p und microRNA-148a in der Leber

Auch die Expression der miRNAs miR-21, miR-122, miR-142-3p und miR-148a sowie der miRNA-Präkursoren let-7b und let-7c der Interventionsgruppen IPC/IR, Taurin/IR, Etanercept/IR und Anakinra/IR wurde mit der Expression der IR-Gruppe verglichen. Es

zeigten sich für keine der miRNAs oder miRNA-Präkursoren signifikante Unterschiede der relativen Expression (Tab. 11).

Tabelle 11: Relative Expression von microRNA-21, microRNA-122, microRNA-142-3p, microRNA-148a, let-7b und let-7c.

Versuchsgruppe	n	Werte	miR-21	miR-122	miR-142-3p	miR-148a	let-7b	let-7c
IR	8	MW	2,70	0,97	1,12	1	1,46	1,09
		±	1,16	0,48	0,63	0,42	0,65	0,44
IPC/IR	8	MW	2,44	1,07	1,71	1,21	1,24	1,39
		±	2,28	0,83	1,59	0,76	0,77	0,88
Taurin/IR	8	MW	3,38	0,93	1,16	1,80	2,13	1,25
		±	2,50	0,32	0,39	1,05	1,36	0,37
Etanercept/IR	8	MW	2,53	1,25	1,02	1,77	1,59	1,20
		±	1,84	0,54	0,37	1,49	0,88	0,43
Anakinra/IR	8	MW	2,48	1,11	1,03	1,04	0,10	1,88
		±	1,35	0,31	0,37	0,57	0,67	1,52

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Die Expression der miRNAs wurde durch Bezug auf die SHAM-Gruppe relativiert. MW: Mittelwert. n: Gruppengröße.

3.4 Ergebnisse der TargetScan-Analyse für microRNA-223

Bei der TargetScan-Analyse möglicher Zielstrukturen der miR-223 wurden insgesamt 22 Gene mit einem *cumulative weighted context score* von -0,4 oder weniger ermittelt. Hierzu gehören unter anderem *ras homolog family member B* (RhoB), *DNA-damage-inducible transcript 4* (DDIT4) und *seven in absentia homolog E3 ubiquitin protein ligase 1* (SIAH1) (Tab. 12).

Tabelle 12: Ergebnisse der TargetScan-Analyse für microRNA-223.

Gen	Gennamen	Synonyme	cwcs
RHOB	ras homolog family member B	ARHB, RhoB, MST081, RHOH6, ARH6	-0,83
LELP1	late cornified envelope-like proline-rich 1		-0,76
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	REDD1, REDD-1, FLJ20500, RTP801, Dig2	-0,76
MMP16	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	C8orf57, DKFZp761D112, MT3-MMP	-0,75
PTS	6-pyruvoyltetrahydropterin synthase	PTPS	-0,69
RDH10	retinol dehydrogenase 10 (all-trans)	SDR16C4	-0,63
Sep 08	septin 8	KIAA0202, SEP2	-0,59
FBXO8	F-box protein 8	FBX8, FBS	-0,58
HLF	hepatic leukemia factor	MGC33822	-0,54
ACVR2A	activin A receptor, type IIA	ACVR2, ACTRII	-0,52
SP3	Sp3 transcription factor	SPR-2	-0,51
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	RBTN2, RBTN1, RHOM2, TTG2	-0,5
FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase	SEL-10, AGO, FLJ11071, CDC4, FBW7, FBX30, FBXW6, SEL10	-0,49
MTFR1L	mitochondrial fission regulator 1-like	FAM54B	-0,48
SIAH1	siha E3 ubiquitin protein ligase 1	hSIAH1	-0,45
ANKS1B	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1B	AIDA-1, cajalin-2, ANKS2, EB-1	-0,44
PHF20L1	PHD finger protein 20-like 1	FLJ21615, FLJ13649, TDRD20B, CGI-72, MGC64923	-0,44
GPR155	G protein-coupled receptor 155	PGR22, DEPDC3, FLJ31819, DEP.7	-0,43
SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	GLUT, GLUT1, DYT18, DYT9, CSE, HTLVR	-0,42
RASA1	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	GAP, p120, p120GAP, CM-AVM, p120RASGAP, RASA	-0,41
UBE2Q2	ubiquitin-conjugating enzyme E2Q family member 2	DKFZp762C143	-0,4
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	PRO2194, FACL3, ACS3	-0,4

Gen: Abkürzung des Gennamens. cwcs: cumulative weighted context score.

4 Diskussion

Die warme IR der Leber ist klinisch von großer Bedeutung, da sie zum Beispiel im Rahmen von Lebertransplantationen und Leberteilresektionen auftritt. Das Ausmaß des dabei entstehenden IRS hat großen Einfluss auf den Erfolg der Lebertransplantation (Übersicht in [18]) und auf Mortalität und Morbidität nach Leberteilresektionen [55]. Vor allem *in vivo*-Untersuchungen legen nahe, dass die Präkonditionierung der Leber endogene protektive Mechanismen induziert, die einem IRS entgegenwirken könnten. In klinischen Studien ist bisher nur für die ischämische Präkonditionierung eine protektive Wirkung beim IRS der Leber nachgewiesen worden. So konnten Anhaltspunkte für die protektive Wirkung der IPC bei partieller Hepatektomie [89] [90] [93] [94] und Lebertransplantation [91] [92] gefunden werden. Ein protektiver Effekt der pharmakologischen Präkonditionierung konnte bei warmer IR bisher ausschließlich in experimentellen *in vivo*-Studien nachgewiesen werden. Hinweise auf eine protektive Wirkung fanden sich dabei sowohl für die Anwendung eines IL-1ra [74] [157] als auch für den Einsatz von TNF- α -hemmenden Substanzen [8] [76] [78]. Auch für die pharmakologische Vorbehandlung mit Taurin gibt es mehrere Studien, welche auf eine protektive Wirkung bei der IR der Leber hindeuten [86] [87].

Die Wirkmechanismen der Präkonditionierung vor einer IR der Leber sind komplex und bisher nur teilweise verstanden. Ebenfalls nur wenige Ergebnisse liegen bisher zur Präkonditionierung und dadurch bedingte Veränderungen der miRNA-Expression vor. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass miRNAs als spezifische Biomarker mit dem Ausmaß einer Leberschädigung korrelieren [158] [159] [160] [161] [162]. Besonders der frühere Beginn der Expressionssteigerung der miRNAs gegenüber herkömmlichen Schadensparametern könnte es ermöglichen, durch gezielte frühe Intervention die klinischen Verläufe möglicherweise günstig zu beeinflussen. Ob miRNAs auch in protektive Mechanismen wie die hepatische Präkonditionierung involviert sind, ist bisher unzureichend untersucht. Es wurde deshalb in dieser Arbeit der Einfluss der IPC und der pharmakologischen Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder einem TNF- α -Antagonisten auf die Expression ausgewählter miRNAs, den oxidativen Stress, die Myeloperoxidase als Surrogatparameter der Neutrophilenakkumulation sowie die Expression der HO-1 als hepatoprotektives Enzym im Modell der partiellen Leberischämie untersucht. Durch Vorbehandlung mit Taurin und durch IPC wurde eine Reduzierung des Leberschadens nach IR erreicht. Die Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder einem TNF- α -Antagonisten hatten keinen Effekt auf den oxidativen Stress, die Myeloperoxidase als

Parameter der Akkumulation neutrophiler Granulozyten oder die HO-1-Expression. Es zeigte sich eine gesteigerte Expression der miR-223 nach Vorbehandlung mit Taurin im Rahmen der hepatischen IR. Weitere Veränderungen der miRNA-Expression durch die verschiedenen Methoden der Vorbehandlung zeigten sich nicht. Mittels TargetScan-Analyse wurden Proteine identifiziert, die durch die gesteigerte miR-223-Expression beeinflusst werden und möglicherweise den protektiven Effekt der Vorbehandlung mit Taurin vermitteln könnten. Im Folgenden sollen die Methodik, die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten miRNAs sowie die Ergebnisse diskutiert werden.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Diskussion des *in vivo*-Modells und der Schadensparameter

Im Modell der partiellen IR der Leber, das in dieser Arbeit untersucht wurde, war die Dauer von Ischämie und Reperfusion jeweils 60 Minuten. Wichtig für den Nachweis protektiver Effekte von IPC und pharmakologischen Vorbehandlungen war die Induktion einer hepatischen Schädigung durch IR, die einerseits zu einer signifikanten Erhöhung der Leberenzyme im Vergleich zur SHAM-Gruppe führte, andererseits aber keine fulminante Leberschädigung verursachte, die nicht durch protektive Mechanismen beeinflussbar gewesen wäre. Aufgrund der Literaturrecherche [163], aber auch aufgrund von Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe wurde die untersuchte IR-Zeit gewählt. Dieser frühe Untersuchungszeitpunkt wurde außerdem ganz gezielt gewählt, um Hinweise auf frühe Biomarker (insbesondere miRNAs) und mögliche therapeutische Zielstrukturen zu erhalten. Für die IPC wurde ein Zeitintervall von 10 Minuten Ischämie und 10 Minuten Reperfusion angewendet, da mit diesem Vorgehen ein starker protektiver Effekt auf dem Boden eigener Voruntersuchungen erwartbar war. Eine Steigerung der Ischämie-Zeit geht laut Literaturrecherche nicht mit einer Erhöhung des protektiven Effektes einher [61] [164] [165].

Ein Mechanismus der oxidativen Schädigung von Gewebe ist die LPO, deren Produkt MDA ist [166]. Daher wurde als Parameter der oxidativen Schädigung des Lebergewebes und der LPO in dieser Arbeit MDA anhand eines TBARS-Assays quantifiziert. Mittels TBARS-Assay konnte in mehreren Studien eine Veränderung der MDA-Konzentration bei der IR und IPC der Leber nachgewiesen werden [37] [61] [167] [168] [169].

Zu den Zellen, die bei der IR der Leber maßgeblich zum IRS beitragen, gehören neutrophile Granulozyten [170]. In dieser Arbeit wurde deshalb die MPO-Aktivität als Surrogatparameter

der hepatischen Akkumulation neutrophiler Granulozyten bestimmt, die bei der IR der Leber proportional zur Zellzahl der Neutrophilen erhöht ist [15].

4.1.2 Begründung der Auswahl der untersuchten microRNAs

In dieser Arbeit wurde die Expression ausgewählter miRNAs mittels qRT-PCR quantifiziert. Es wurden miRNAs ausgewählt, die anhand bereits existierender Studien zur partiellen Hepatektomie, Lebertransplantation oder isolierten IR der Leber durch einen IRS beeinflusst werden (Tab. 13).

In mehreren *in vivo*-Studien konnten signifikante Veränderungen der miR-223-Expression bei IR, Transplantation oder Teilresektion der Leber aufgezeigt werden (Tab. 13). Yu et al. wiesen nach IR eine signifikant gesteigerte Expression der miR-223 im Lebergewebe von Mäusen nach, die zudem mit der Aktivität der Schadensparameter AST und ALT korrelierte [134]. Auch in Studien zur Lebertransplantation zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der miR-223 im Lebergewebe [129]. Eine im Gegensatz dazu signifikant niedrigere miR-223-Expression wiesen Raschzok et al. *in vivo* bei partieller Hepatektomie der Rattenleber nach [128]. Die miR-223 wurde zusätzlich zu den genannten Studien auch deswegen ausgewählt, da möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der miR-223 und der Aktivierung von Neutrophilen während eines IRS der Leber besteht [14] [170]. Ergebnisse mehrerer Studien legen nahe, dass die miR-223 eine Rolle sowohl bei der Hämatopoese [135] [171] [172] als auch bei der Neutrophilenaktivierung [173] und inflammatorischen Wirkung der Neutrophilen [174] spielt.

Für die miR-21 konnten in verschiedenen Studien zur partiellen Hepatektomie und Lebertransplantation Veränderungen der Expression gezeigt werden. Nach partieller Hepatektomie wurde mehrfach eine signifikant erhöhte miR-21-Expression nachgewiesen [124] [125] [126] [127]. Ng et al. zeigten zudem, dass durch Inhibieren der miR-21-Expression die Proliferation und dadurch die Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie gestört wird [125]. In Bezug auf die Lebertransplantation gibt es unterschiedliche Ergebnisse [129] [175] (Tab.13). Interessant ist die miR-21 im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich, da nach IPC von Herz [138] oder Niere [140] eine signifikant höhere miR-21-Expression nachgewiesen werden konnte und durch Gabe von antagomir-21 gezeigt werden konnte, dass die miR-21 für die Vermittlung der protektiven Wirkung der IPC des Herzens [138] und der Niere [140] essentielle Bedeutung hat.

Veränderungen der Expression von miR-122 und miR-148a bei der Lebertransplantation wurden in einer Studie von Farid et al. nachgewiesen. Im Lebergewebe zeigte sich eine signifikante Abnahme der relativen Expressionen von miR-122 und miR-148a, welche mit der Dauer der warmen IR korrelierten. Zudem war die Expression der beiden miRNAs im Serum von Patienten mit Abstoßungsreaktion nach Transplantation erhöht im Vergleich zu der Expression bei Patienten ohne Abstoßungsreaktion [108] (Tab. 13). Zusätzlich zu diesen Studienergebnissen, welche Hinweise auf eine mögliche Rolle der miR-122 bei der IR der Leber geben, ist die miR-122 auch noch interessant, weil sie leberspezifisch und die häufigste miRNA im Lebergewebe ist [99]. Sie konnte nicht nur bei der IR, sondern auch bei Leberschäden anderer Genese erhöht im Plasma nachgewiesen werden [176].

Für diese Arbeit auch von Interesse waren let-7b und let-7c, Mitglieder der let-7-Familie von miRNA-Präkursoren, und die miR-142-3p. In mehreren Studien wurde eine veränderte Expression von let-7b und let-7c nach partieller Hepatektomie nachgewiesen, welche je nach Zeitpunkt der Messung unterschiedlich war [127] [175]. Hinweise darauf, dass die miR-142-3p eine Rolle beim IRS der Leber spielen könnte, gibt eine Studie von Schug et al. Diese zeigte, dass miR-142-3p nach partieller Hepatektomie signifikant häufiger zum RISC rekrutiert wird [177].

Tabelle 13: Übersicht über bisherige Studienergebnisse zur microRNA-Expression bei Ischämie und Reperfusion der Leber, partieller Hepatektomie und Lebertransplantation.

Autor	Studienart	Operation	miRNA-Trend	Ergebnisse
[134]	<i>in vivo</i> (Maus)	IR	miR-223 ↑	Gesteigerte miR-223-Expression nach IR. Korrelation mit AST- und ALT-Aktivität.
[124]	<i>in vivo</i> (Maus)	Part. Hep.	miR-21 ↑	Gesteigerte miR-21-Expression 12 h nach part. Hep.
[125]	<i>in vivo</i> (Maus)	Part. Hep.	miR-21 ↑	Stark gesteigerte miR-21-Expression 18 h nach part. Hep. Bei Inhibition des Anstiegs: Proliferation und Regeneration gestört.
[126]	<i>in vivo</i> (Maus)	Part. Hep.	miR-21 ↑	Gesteigerte Expression von miR-21 18 h und 36 h nach part. Hep.
[177]	<i>in vivo</i> (Maus)	Part. Hep.	miR-142-3p ↑	Messung der miRNA-Rekrutierung zum RISC 1 h, 36 h und 48 h nach part. Hep. Gesteigerte Rekrutierung der miR-142-3p.
[127]	<i>in vivo</i> (Ratte)	Part. Hep.	miR-21 ↑ let-7 ↑↓	Gesteigerte miR-21 und let-7-Expression 3 h nach part. Hep. Niedrigere let-7-Expression nach 24 h.
[128]	<i>in vivo</i> (Ratte)	Part. Hep.	miR-223 ↓ let-7b ↓ let-7c ↓	Niedrigere Expression der miR-223 12 h und 24 h nach part. Hep. Niedrigere Expression von let-7b und let-7c 24 h nach part. Hep.

[175]	<i>in vivo</i> (Ratte)	Part. Hep. Lebertx	Part. Hep.: miR-21 ↑↓ let-7b ↑↓ let-7c ↑↓ Lebertx: miR-21 ↓ let-7b ↓ miR-223 ↑	Restleber nach part. Hep.: Zunächst gesteigerte, dann niedrigere miR-21-, let-7b- und let-7c-Expression. Transplantat (2 Tage nach Lebertx): Niedrigere Expression der miR-21 und let-7b; gesteigerte Expression der miR-223 (ca. 6-fach höher).
[108]	klinische Studie	Lebertx	Lebergewebe: miR-122 ↓ miR-148a ↓ Serum: miR-122 ↑ miR-148a ↑	Lebergewebe aus Transplantat nach 60 Minuten Reperfusion: Niedrigere miR-122- und miR-148a-Expression und Korrelation der Expression mit Dauer der warmen Ischämie. Serum von gesunden Pat. verglichen mit Serum von Pat. nach Transplantation: Gesteigerte miR-122- und miR-148a-Expression. Serum von Pat. nach Transplantation und akuter Abstoßungsreaktion des Transplantats: Gesteigerte Expression der miR-122 verglichen mit Serum mehrere Monate nach akuter Abstoßungsreaktion.
[129]	klinische Studie	Lebertx	miR-21 ↑ miR-223 ↑	Vergleich der Biopsie vor Entnahme und nach Transplantation und 90 Minuten Reperfusion. Gesteigerte miR-21- und miR-223-Expression.

Die Expression wurde jeweils im Lebergewebe gemessen und die Signifikanz verglichen mit SHAM-operierten Tieren berechnet, wenn nicht anderweitig angegeben. IR: Modell der Ischämie und Reperfusion. Lebertx: Lebertransplantation. Part. Hep.: partielle Hepatektomie. Pat.: Patienten.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In dem untersuchten *in vivo*-Modell der warmen IR der Leber waren die Serumaktivitäten der Schadensparameter AST, ALT und LDH der IR-Gruppe im Vergleich zu SHAM signifikant erhöht. Diese Ergebnisse sprechen in Übereinstimmung mit vorherigen Studien [3] [37] [163] dafür, dass eine 60-minütige partielle Ischämie und 60-minütige Reperfusion der Leber einen messbaren Schaden zufügt. Ebenfalls im Einklang mit vorherigen Studien [61] [168] [178] [167] [179] zeigten sich signifikant geringere AST-, ALT- und LDH-Aktivitäten nach 10-minütiger ischämischer Präkonditionierung und 10-minütiger Reperfusion mit anschließender IR der Leber. Es konnte also eine protektive Wirkung der IPC beim IRS der Leber nachgewiesen werden, sodass die IPC in Bezug auf die pharmakologische Vorbehandlung in dieser Arbeit als Positivkontrolle gewertet werden kann. Die AST-Aktivität und die LDH-Aktivität der Taurin/IR-Gruppe waren signifikant niedriger als in der IR-Gruppe. Es konnte

also eine protektive Wirkung der Vorbehandlung mit Taurin nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt den protektiven Effekt von Taurin, welcher in anderen Studien nach Vorbehandlung vor hepatischer IR mit längerer Reperfusionsdauer gezeigt werden konnte [81] [86] [87] [85]. Die ALT-Aktivität der Taurin/IR-Gruppe war in dieser Arbeit nicht signifikant reduziert im Vergleich mit der IR-Gruppe. Die Enzymaktivitäten der Etanercept/IR-Gruppe und der Anakinra/IR-Gruppe waren in dieser Arbeit im Vergleich zur IR-Gruppe ebenfalls nicht vermindert. Es konnte also keine protektive Wirkung des TNF- α -Antagonisten oder des IL-1ra nachgewiesen werden.

Für die MDA-Konzentration als Parameter der oxidativen Schädigung des Lebergewebes konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen SHAM-Gruppe und IR-Gruppe nachgewiesen werden. Damit konnten die Ergebnisse anderer Studien, in denen eine signifikant höhere MDA-Konzentration nach IR der Leber nachgewiesen werden konnten, nicht bestätigt werden. In mehreren Studien wurden längere IR-Zeiten [169] [168] als in dieser Arbeit angewandt, sodass eine mögliche Erklärung hierfür die gewählte Dauer der hepatischen IR sein könnte.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls keine Veränderung der MDA-Konzentration durch IPC oder pharmakologische Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder einem TNF- α -Antagonisten im Rahmen der hepatischen IR erzielt werden. Im Gegensatz hierzu konnte eine Reduktion der MDA-Konzentration durch IPC mit anschließender IR der Leber [37] [61] [167] [168] [169] und auch durch Vorbehandlung mit Taurin mit nachfolgender IR der Leber [85] in anderen Studien nachgewiesen werden. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch auch nach alleiniger IR der Leber keine höhere MDA-Konzentration vorlag, ist die fehlende Reduktion der MDA-Konzentration durch die Präkonditionierung am ehesten dadurch zu erklären.

Die MPO-Aktivität als Marker der Akkumulation neutrophiler Granulozyten war in dieser Arbeit nach IR der Leber im Mittel etwa 6-fach, aber aufgrund der großen Streuung nicht signifikant erhöht. Damit konnten Ergebnisse vorheriger Studien nicht bestätigt werden, in denen sich eine Zunahme der MPO-Aktivität im Rahmen der hepatischen IR zeigte. Komatsu et al. konnten die signifikante Zunahme der MPO-Aktivität im Vergleich zu SHAM bereits nach 25-minütiger partieller Ischämie und 30-minütiger Reperfusion nachweisen [15]. In weiteren Studien gelang ein Nachweis erhöhter MPO-Aktivität nach Ischämie von 45 Minuten [178] bis 90 Minuten Dauer [168] und Reperfusion einer Dauer von zwei Stunden [167], drei Stunden [168], vier Stunden [178] oder sechs Stunden [61].

Eine mögliche Ursache der in dieser Arbeit ausbleibenden signifikanten Zunahme der MPO-

Aktivität könnte sein, dass vor allem in der späten Phase der Reperfusion Neutrophile an der Entstehung des IRS beteiligt sind [14] [37] [170]. In dieser Arbeit wurde mit einer Reperfusionsdauer von einer Stunde gezielt die frühe Phase der Reperfusion untersucht. In den oben genannten Studien, in welchen signifikante Ergebnisse nachgewiesen werden konnten, wurde meist eine längere Reperfusionsdauer von mindestens zwei Stunden gewählt. Für die Reperfusionsdauer von zwei Stunden liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Im Gegensatz zu Ergebnissen von Jin et al., die eine signifikant höhere MPO-Aktivität nach zwei Stunden Reperfusion aufzeigten [167], bestand in einer Studie von Serafin et al. nach zwei Stunden Reperfusion noch keine signifikante Veränderung. Diese konnte erst nach sechs Stunden Reperfusion nachgewiesen werden [61]. Auch für die Reperfusionsdauer von 30 Minuten existieren unterschiedliche Ergebnisse. Während Komatsu et al. eine höhere MPO-Aktivität nachweisen konnten [15], zeigte sich in der Studie von Jin et al. bei Messung nach 30 Minuten Reperfusion noch nicht die signifikant höhere Aktivität nach IR oder die Reduktion der MPO-Aktivität durch IPC, welche nach zwei Stunden bestand [167].

Auch die in anderen Studien nachgewiesene Reduktion der MPO-Aktivität durch IPC [61] [168] [167] oder Vorbehandlung mit Taurin mit anschließender IR der Leber [85] konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Dies ist jedoch wahrscheinlich dadurch begründet, dass bereits keine signifikant höhere Aktivität der MPO nach alleiniger IR der Leber nachgewiesen werden konnte.

Als Enzym mit einer potentiell protektiven Wirkung gegen oxidativen Stress wurde die HO-1 bestimmt, durch deren Induktion in mehreren Studien der IRS der Leber vermindert werden konnte [67] [68] [69]. In dieser Arbeit wurde die auf den *housekeeper* GAPDH normierte HO-1 mRNA-Expression der IR-Gruppe mit der relativen HO-1-Expression nach Präkonditionierung mit IPC und Vorbehandlung mit Taurin, Etanercept als TNF- α -Antagonist und Anakinra als IL-1ra und anschließender IR verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

Auch eine alleinige IR der Leber ohne Präkonditionierung kann zu einer vermehrten Expression der HO-1 führen [169] [180]. Bei Studien, in denen eine Präkonditionierung mit IPC und nachfolgender IR der Leber angewandt wurde, zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit eine Induktion der HO-1 durch IPC und IR im Vergleich zu alleiniger IR der Leber [169] [181]. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die IPC zwar bei nachfolgender IR der Leber eine zusätzliche Induktion der HO-1 bewirkt, diese jedoch nach einstündiger Reperfusionszeit der nachfolgenden IR noch nicht messbar ist. In einer Studie von Massip-Salcedo et al. wurde eine IPC mit 5 Minuten Ischämie und 10

Minuten Reperfusion sowie nachfolgende partielle IR mit einer Stunde Ischämie und 24 Stunden Reperfusion bei Ratten durchgeführt. Es konnte erst nach 24 Stunden Reperusionszeit der IR eine signifikant gesteigerte HO-1-Expression nach IPC und IR im Vergleich zu alleiniger IR nachgewiesen werden. Nach sechs Stunden Reperfusion konnte noch keine signifikant gesteigerte HO-1-Expression festgestellt werden [181]. Auch Yun et al. führten eine Studie mit IPC und anschließender partieller IR der Rattenleber durch. Es wurde eine IPC mit 10 Minuten Ischämie und 10 Minuten Reperfusion sowie nachfolgend eine IR mit 90 Minuten Ischämie und Reperfusion bis zu einer Versuchsdauer von insgesamt 24 Stunden durchgeführt. Sie konnten nach IPC und anschließender IR nach insgesamt 24 Stunden eine HO-1-Induktion durch IPC im Vergleich zu alleiniger IR nachweisen, welche nach 6 Stunden noch nicht messbar war [169].

Eine weitere mögliche Erklärung für die ausbleibende Induktion der HO-1 nach IPC und IR im Vergleich zur alleinigen IR in dieser Arbeit könnte sein, dass die HO-1 bei der IR der Leber nicht nur ein protektives Enzym [67] [68] ist, sondern auch ein Marker für oxidativen Stress [41]. In einer Studie von Braun et al. zeigte sich eine signifikant gesteigerte HO-1-Expression nach alleiniger IPC, alleiniger IR sowie IPC mit nachfolgender IR jeweils im Vergleich zu SHAM. Zudem wurde eine signifikant gesteigerte Expression nach IR im Vergleich mit IPC nachgewiesen, jedoch nicht nach IPC und IR im Vergleich zu IPC [178]. Möglich wäre also, dass durch die IPC zwar die HO-1-Expression als protektiver Mechanismus induziert wird, eine weitere Steigerung der HO-1-Expression durch die IR im Sinne eines Schadensparameters aber durch die protektive Wirkung der IPC aufgehoben wird.

Zum Zusammenhang von Taurin und HO-1 liegen Studien vor, welche im Gegensatz zu dieser Arbeit eine Veränderung der HO-1-Induktion durch Taurin nachweisen konnten. In diesen Studien wurde aber keine IR, sondern ein Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes bei Ratten angewandt. In einer Studie von Yao et al. wurde nach Gabe von Streptozotocin eine Induktion der HO-1 in Leber und Niere der untersuchten Ratten nachgewiesen. Nach Gabe von Taurin zeigte sich eine signifikante Reduktion der Streptozotocin-induzierten HO-1-Expression im Nierengewebe sowie eine nicht-signifikante Reduktion der HO-1-Expression im Lebergewebe [182]. Im Gegensatz dazu zeigten Wang et al. eine signifikant gesteigerte HO-1-Expression im Herzmuskelgewebe von Ratten nach Gabe von Taurin und Streptozotocin im Vergleich mit alleiniger Gabe von Streptozotocin [183]. Ob diese veränderte Expression von HO-1 durch Taurin an das Vorhandensein des Diabetes mellitus in diesem Modell gekoppelt ist, ist bisher nicht geklärt. Hierfür könnte sprechen, dass in der Studie von Wang et al. durch alleinige Gabe von Taurin ohne

Streptozotocin keine HO-1-Induktion nachgewiesen werden konnte [183]. Eine weitere mögliche Erklärung der ausbleibenden Veränderung der HO-1-Expression in dieser Arbeit könnte sein, dass die Veränderung der HO-1-Expression organspezifisch zwar in Nieren- und Herzmuskelgewebe, nicht aber im Lebergewebe durch Taurin induziert wird. Hierfür könnte sprechen, dass in der Studie von Yao et al. zwar eine signifikante Reduktion der HO-1-Expression durch Taurin in der Niere, nicht aber in der Leber nachgewiesen werden konnte [182].

Zur Anwendung eines TNF- α -Antagonisten oder eines IL-1ra im Rahmen der hepatischen IR liegen bisher keine Studien vor, welche Hinweise auf eine HO-1-Induktion geben. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten daher dafür sprechen, dass die Vorbehandlung mit einem TNF- α -Antagonisten oder IL-1ra mit nachfolgender IR keine HO-1-Induktion im Vergleich zu alleiniger IR bewirkt, allerdings müssten zukünftig noch weitere Zeitpunkte der Reperfusion untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde die relative Expression der ausgewählten miRNAs miR-21, miR-122, miR-142-3p, miR-148a, miR-223 und der miRNA-Präkursoren let-7b und let-7c untersucht. Verglichen wurde die relative Expression der IR-Gruppe mit der relativen Expression der Interventionsgruppen mit ischämischer Präkonditionierung oder pharmakologischer Vorbehandlung vor nachfolgender IR der Leber. Es wurde ein signifikanter Unterschied der miR-223-Expression in der Taurin/IR-Gruppe nachgewiesen. Die anderen Interventionsgruppen wiesen auch erhöhte Mittelwerte im Vergleich zu IR auf, allerdings waren aufgrund der hohen Streuung die Unterschiede nicht signifikant. Da die Vorbehandlung mit Taurin in dieser Arbeit nachweislich einen protektiven Effekt hatte, stellte sich die Frage, ob die miR-223 Anteil an der Vermittlung dieses protektiven Effektes haben könnte.

Die miR-223 ist gemäß einer klinischen Studie von Ward et al. in neutrophilen Granulozyten die am häufigsten vorkommende miRNA [184] und spielt eine Rolle bei der Differenzierung von myeloischen Zellen zu Granulozyten [171] [172]. Da der IRS der Leber zu großen Teilen durch neutrophile Granulozyten vermittelt wird, wäre eine gesteigerte miR-223-Expression beim IRS sowie eine verminderte miR-223-Expression nach protektiver Präkonditionierung vor IR der Leber denkbar. In Einklang mit dieser Hypothese zeigte sich in einer Studie von Yu et al. eine gesteigerte Expression der miR-223 bei der IR der Leber, die mit der Aktivität der Schadensparameter AST und ALT korrelierte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die miR-223 eine Rolle beim IRS der Leber spielen könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen im Gegensatz dazu eher für eine mögliche protektive Wirkung der miR-223 bei einem IRS der Leber, da eine Vorbehandlung mit Taurin zu einer Expressionssteigerung

der miR-223 bei gleichzeitiger Reduzierung des enzymatisch gemessenen Leberschadens geführt hat.

Eine potentielle protektive Wirkung der miR-223 könnte zum Beispiel durch eine Modulation der Aktivität neutrophiler Granulozyten begründet sein. Hierzu zeigten Johnnidis et al. in einem *in vivo*-Experiment mit miR-223-*knockout*-Mäusen, dass die miR-223 die Aktivierung von Neutrophilen hemmt [173]. Bauernfeind et al. fanden in einer Studie Hinweise darauf, dass die miR-223 die Aktivierung von IL-1 durch das *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family, pyrin domain-containing 3* (NLRP3) -Inflammasom in Neutrophilen hemmt und dadurch eine antiinflammatorische Wirkung hat [174]. Im folgenden Teil soll die Frage beantwortet werden, ob potentielle Zielstrukturen der miR-223 eine protektive Wirkung der Taurin-Vorbehandlung bei der hepatischen IR vermitteln könnten.

Für einige der durch die TargetScan-Analyse ermittelten potentiellen Zielstrukturen der miR-223 konnte in bisherigen Studien bereits ein Zusammenhang mit anderen bei IR protektiven miRNAs nachgewiesen werden, sodass die Vermittlung eines protektiven Effektes auch der miR-223 denkbar wäre. Hierzu gehören DDIT4 (Synonym: *protein regulated in development and DNA damage response 1* (REDD1)) und RhoB. DDIT4 wird durch oxidativen Stress und Hypoxie induziert und spielt eine Rolle beim Zellwachstum (Übersicht in [185]). Eine gesteigerte Expression von DDIT4 konnte *in vivo* bei durch Diquat induziertem oxidativen Stress der Leber [186] und bei der kardialen IR nachgewiesen werden [187]. Chen et al. zeigten *in vitro*, dass die Induktion von miRNA-221 bei der kardialen IR *in vivo* DDIT4 inhibiert und nachweislich eine protektive Wirkung mit erhöhter Zellzahl sowie verminderter LDH-Sekretion hat [188]. In einer Studie von Skendros et al. zum familiären Mittelmeerfieber zeigte sich außerdem, dass durch Induktion von DDIT4 die Funktion neutrophiler Granulozyten moduliert und unter anderem die Freisetzung von IL-1 β reguliert wird [189].

RhoB ist ein Guanosintriphosphat (GTP) bindendes Enzym, eine von drei *Ras homolog family member* (Rho) GTPasen, und spielt eine Rolle bei der Apoptose (Übersicht in [190]). Im *in vivo*-Experiment zur partiellen Hepatektomie zeigte sich eine negative Korrelation der gesteigerten miR-21-Expression mit der Expression von RhoB. Die gesteigerte miR-21-Expression ging mit einer vermehrten Proliferation der Hepatozyten einher. In der gleichen Studie konnte *in vitro* eine direkte Inhibierung von RhoB durch die miR-21 nachgewiesen werden [125]. Eine ähnliche Wirkung auf RhoB wäre auch für die miR-223 denkbar, sodass die miR-223 durch eine Hemmung von RhoB ebenfalls eine gesteigerte Proliferation der Hepatozyten und dadurch eine Stimulation der hepatischen Regeneration nach IR ermöglichen könnte.

Auch die RhoB-Expression bei LPS-induzierter Inflammation wurde untersucht. *In vivo* zeigte sich eine gesteigerte RhoB-Expression in Leber-, Lungen- und Nierengewebe nach Verabreichung von LPS. *In vitro* wurde bei murinen Makrophagen eine Induktion von RhoB-mRNA und RhoB-Protein durch Gabe von LPS nachgewiesen. Die gesteigerte Expression der RhoB korrelierte mit der Aktivität von *nuclear factor-kappaB* (NF-κB) in Makrophagen [191]. NF-κB führt zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α und IL-1 [192]. Bei der hepatischen IR ist die NF-κB-Expression signifikant gesteigert [79]. Ein protektiver Effekt der miR-223 wäre also auch durch Hemmung der NF-κB-Aktivität und nachfolgende Beeinflussung der Immunreaktion möglich, zu der es im Rahmen des IRS der Leber (Übersicht in [6] [18]) kommt.

Eine weitere der durch die TargetScan-Analyse ermittelten potentiellen Zielstrukturen der miR-223 ist das Gen der Ubiquitin-Ligase *seven in absentia homolog 1* (SIAH1). SIAH ist ein Gen, das durch oxidativen Stress induziert wird [193]. Bei der kardialen IR *in vivo* kann durch direktes Inhibieren der zwei Isoformen SIAH1 und SIAH2 durch RNA-Interferenz die Größe des Infarktareals reduziert und die echokardiographisch nachgewiesene kardiale Funktion verbessert werden [194]. SIAH1 spielt eine Rolle bei der Proliferation und Apoptose von Zellen [195] und interagiert mit *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) [196]. STAT3 wiederum ist ebenfalls eine potentielle Zielstruktur der miR-223. STAT3 und einige weitere in bisherigen Studien ermittelte potentielle Ziele der miR-223 könnten an der protektiven Wirkung von Taurin beteiligt sein, indem sie die Funktion von Makrophagen beeinflussen. In einer Studie von Chen et al. zeigte sich, dass die miR-223 die Expression von STAT3 hemmt. Bei zunehmender Expression von STAT3 wurden vermehrt die proinflammatorischen Zytokine IL-1β und Interleukin-6 von Makrophagen sezerniert [197]. Zhuang et al. konnten zeigen, dass außerdem der *Prep 1 homeodomain transcription factor* (Pknx1) ein mögliches Ziel der miR-223 ist. Sie wiesen nach, dass Pknx1 die Polarisation von Makrophagen stimuliert und durch die miR-223 gehemmt wird [198]. Auch für eine Wirkung der miR-223 auf die Funktion von Neutrophilen konnte neben NLRP3 mit dem *Insulin-like-growth-factor-receptor-1* (IGF-1R) ein weiteres potentielles Ziel gefunden werden. Der IGF-1R bindet bevorzugt den *Insulin-like-growth-factor-1* (IGF-1) [199]. Mehrere Studien geben Hinweise darauf, dass der IGF-1 eine stimulierende Wirkung auf neutrophile Granulozyten hat. Fu et al. konnten zeigen, dass IFG-1 Neutrophile zur Produktion von ROS anregt [200]. Inoue et al. konnten nachweisen, dass durch den IGF-1 die Phagozytose der Neutrophilen stimuliert wird [201]. In einem Experiment von Bjerknes und Aarskog zeigte sich, dass durch IGF-1 sowohl die Phagozytose als auch die Degranulation der

Neutrophilen gesteigert wird [202]. Johnnidis et al. konnten den IGF-1R als potentielles Ziel der miR-223 identifizieren und nachweisen, dass bei miR-223-*knockout*-Mäusen vermehrt der IGF-1R exprimiert wird [173]. Lu et al. konnten mit von miR-223-*knockout*-Mäusen gewonnenen eosinophilen Granulozyten bestätigen, dass der IGF-1R bei fehlender miR-223-Expression verstärkt vorhanden ist [203].

Als eine weitere potentielle Zielstruktur, über die die miR-223 Einfluss auf die Immunreaktion bei der IR nehmen könnte, identifizierten Haneklaus et al. NLRP3 [204]. NLRP3 bildet zusammen mit der *apoptosis associated speck-like protein containing CARD domain* (ASC) und Procaspase-1 den Inflammasom-Komplex, welcher Procaspase-1 zu Caspase-1 aktivieren kann. Caspase-1 ermöglicht die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β [205]. Das NLRP3-Inflammasom kommt in Zellen des Immunsystems wie Makrophagen und Neutrophilen vor [206]. Es kann durch DAMP aktiviert werden [207], welche auch für die Pathogenese des IRS der Leber von Bedeutung sind [6]. Inoue et al. untersuchten die Expression von NLRP3 in einer Studie zum IRS der Leber. Sie konnten zeigen, dass die Expression der NLRP3-mRNA durch die IR zunimmt. Schadensparameter des IRS waren bei NLRP3-*knockout*-Mäusen signifikant niedriger als bei Wildtypmäusen. Bei Caspase-1-*knockout*-Mäusen konnten Inoue et al. keine Abschwächung des IRS feststellen. Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf eine Beteiligung des NLRP3 am IRS der Leber und auf eine zusätzliche, vom Inflammasom-Komplex unabhängige Rolle [208]. Zur Wirkung der miR-223 auf NLRP3 geben einige Studien Hinweise darauf, dass die miR-223 die Genexpression von NLRP3 und die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms hemmt. In einer Studie von Haneklaus et al. zeigte sich, dass während des Differenzierungsprozesses von Makrophagen eine inverse Korrelation von NLRP3 und miR-223 besteht. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die miR-223 die Aktivität und die IL-1 β -Sekretion des NLRP3-Inflammasoms hemmt [204]. Bauernfeind et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass die miR-223 die NLRP3-Inflammasom-Aktivität in Neutrophilen und Makrophagen hemmt [178]. Die Hemmung von NLRP3 durch eine erhöhte miR-223-Expression könnte somit den protektiven Effekt erklären.

Für die Rolle der miR-223 im Immunsystem finden sich also mehrere Hinweise darauf, dass die miR-223 die Immunantwort hemmen könnte. Die miR-223 könnte über Beeinflussung des NF- κ B-Signalweges die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine vermindern. Die Funktion der Neutrophilen könnte durch die Zielstrukturen NLRP3 und IGF-1R, die Funktion der Makrophagen durch NLRP3, Pknox1 und STAT3 moduliert werden. Der IRS der Leber wird zu großen Teilen durch Kupfferzellen, die leberständigen Makrophagen, und

Neutrophile vermittelt [7] [14] [209]. Die in dieser Arbeit nachgewiesene protektive Wirkung der Taurin-Vorbehandlung im Rahmen der hepatischen IR könnte somit durch die oben genannten Zielstrukturen der miR-223 und ihre Wirkung auf Neutrophile und Makrophagen erklärt werden. Da in dieser Arbeit keine Reduktion der MPO-Aktivität als Surrogatparameter der Neutrophilenakkumulation nachgewiesen wurde, könnte die protektive Wirkung der Taurin-Vorbehandlung zum Beispiel durch eine Modulation der Neutrophilen-Funktion durch Zielstrukturen der miR-223 ohne Veränderung der Neutrophilenakkumulation vermittelt werden.

Für die weiteren in dieser Arbeit untersuchten Formen der Präkonditionierung mit IPC oder Vorbehandlung mit einem TNF- α -Antagonisten oder einem IL-1ra mit anschließender IR konnte kein signifikanter Unterschied der miR-223-Expression zur Expression nach alleiniger IR nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für die ausbleibende Veränderung der miR-223-Expression nach IPC und IR könnte sein, dass die miR-223 für die protektive Wirkung der IPC keine Rolle spielt. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Veränderung der miR-223-Expression nach Vorbehandlung mit einem TNF- α -Antagonisten oder einem IL-1ra und IR im Vergleich zu alleiniger IR könnte die in dieser Arbeit gezielt gewählte kurze Reperfusionsdauer sein. Bei der IR der Leber ohne Präkonditionierung wurden Nachweise einer signifikanten Veränderung der miR-223-Expression in bisherigen Studien meist erst nach längerer Reperfusionsdauer nachgewiesen, so zum Beispiel von Yu et al. nach 75 Minuten Ischämie und 120 Minuten Reperfusion [134]. Gegen die kurze Dauer der IR als Erklärung für den fehlenden Effekt des TNF- α -Antagonisten, des IL-1ra und der IPC spricht, dass die gesteigerte miR-223-Expression nach Vorbehandlung mit Taurin bereits nach der gewählten IR-Dauer in der vorliegenden Arbeit nachweisbar war. Denkbar wäre allerdings auch, dass Taurin über kurzfristigere Mechanismen eine Expressionssteigerung vermittelt als die anderen untersuchten Vorbehandlungen oder dass bereits die Vorbehandlung mit Taurin auch ohne IR zu einer Veränderung der miR-223-Expression führt. Zur Bestimmung des genauen zeitlichen Ablaufes der Expressionssteigerung der miR-223 nach Vorbehandlung mit Taurin sind weitere Studien notwendig.

Auch beim Vergleich der Expression der miR-21, miR-122, miR-142-3p, miR-148a sowie let-7b und let-7c der IR-Gruppe mit der Expression der IPC/IR-, Taurin/IR-, Etanercept/IR- und Anakinra/IR-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Präkonditionierung mit IPC, Vorbehandlung mit einem TNF- α -Antagonisten, einem IL-1ra oder Taurin keinen Effekt auf die Expression dieser miRNAs und miRNA-Präkursoren bei IR der Leber hat. Eine abschließende Beurteilung ist

jedoch nicht möglich, da nur ein sehr früher Zeitpunkt der Reperfusion untersucht wurde. Eine andere mögliche Erklärung der Ergebnisse wäre, dass es möglicherweise erst im weiteren Verlauf der Reperfusion zu einer Veränderung des miRNA-Profiles nach Präkonditionierung vor der hepatischen IR kommt. Hierfür könnte sprechen, dass auch die Veränderungen der miRNA-Expression bei IR der Leber im Rahmen von partieller Hepatektomie oder Lebertransplantation ohne Präkonditionierung in vielen Studien erst nach längerer Reperfusionsdauer nachgewiesen wurden [127] [129] [175]. Ob die Präkonditionierung mit IPC oder die pharmakologische Vorbehandlung mit Taurin, einem IL-1ra oder TNF- α -Antagonisten im weiteren Verlauf der Reperfusion bei der IR der Leber zu einer Veränderung des miRNA-Profiles führt, muss zukünftig untersucht werden.

Für die IPC wurde in bisherigen Studien ein Effekt auf die Expression der miR-21, let7-b und let-7c bei IR des Herzens und der Niere beobachtet [138] [140]. Im Gegensatz hierzu konnte in dieser Arbeit keine veränderte Expression dieser miRNAs nach IPC und IR der Leber nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Veränderungen der Expression dieser miRNA und miRNA-Präkursoren nach IPC und nachfolgender IR organspezifisch sind und Ergebnisse kardialer oder renaler Präkonditionierungen nicht unmittelbar auf die Vorgänge der Leber bei IPC zu übertragen sind.

Zusammenfassend konnten mit der vorliegenden Arbeit erste Hinweise erarbeitet werden, die den protektiven Effekt von oralem Taurin und die Bedeutung der miR-223 bei einem IRS der Leber erklären könnten. Zukünftig müssen weitere Zeitpunkte der Reperfusionsphase untersucht werden, um möglicherweise weitere miRNAs zu identifizieren, die zu einem späteren Zeitpunkt für die protektive Bedeutung von Taurin eine Rolle spielen. In weiterführenden Untersuchungen muss der funktionelle Zusammenhang der beobachteten Veränderung der miR-223-Expression mit den durch den TargetScan identifizierten Proteinen näher untersucht werden und der genaue Ablauf der Interaktion mit der miR-223 und die Vermittlung protektiver Effekte näher beleuchtet werden.

5 Literaturverzeichnis

- [1] Pschyrembel, Willibald and Dornblüh, Otto, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*, 261. Auflage. Berlin: De Gruyter, 2007.
- [2] N. C. Teoh, "Hepatic ischemia reperfusion injury: Contemporary perspectives on pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection—the good, bad and deadly," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 26, pp. 180–187, 2011.
- [3] B. Vollmar, J. Glasz, R. Leiderer, S. Post, and M. D. Menger, "Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion.," *Am J Pathol*, vol. 145, no. 6, pp. 1421–1431, Dec. 1994.
- [4] H. Jaeschke, "Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 284, no. 1, pp. G15–G26, Jan. 2003.
- [5] R. H. Bhogal, S. M. Curbishley, C. J. Weston, D. H. Adams, and S. C. Afford, "Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation," *Liver Transplantation*, vol. 16, no. 11, pp. 1303–1313, 2010.
- [6] R. F. van Golen, T. M. van Gulik, and M. Heger, "The sterile immune response during hepatic ischemia/reperfusion," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 23, no. 3, pp. 69–84, Jun. 2012.
- [7] H. Jaeschke, A. Farhood, A. P. Bautista, Z. Spolarics, and J. J. Spitzer, "Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 264, no. 4, pp. G801–G809, Apr. 1993.
- [8] L. M. Colletti, D. G. Remick, G. D. Burtch, S. L. Kunkel, R. M. Strieter, and D. A. Campbell, "Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat.," *J Clin Invest*, vol. 85, no. 6, pp. 1936–1943, Jun. 1990.
- [9] G. A. Wanner *et al.*, "Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation," *Shock*, vol. 5, no. 1, pp. 34–40, Jan. 1996.
- [10] S. Suzuki and L. H. Toledo-Pereyra, "Interleukin 1 and Tumor Necrosis Factor Production as the Initial Stimulants of Liver Ischemia and Reperfusion Injury," *Journal of Surgical Research*, vol. 57, no. 2, pp. 253–258, Aug. 1994.
- [11] M. L. Bajt, A. Farhood, and H. Jaeschke, "Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 281, no. 5, pp. G1188–G1195, Nov. 2001.
- [12] L. M. Colletti *et al.*, "The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat," *Hepatology*, vol. 23, no. 3, pp. 506–514, Mar. 1996.
- [13] N. Shirasugi *et al.*, "Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury," *Transplantation*, vol. 64, no. 10, pp. 1398–1403, Nov. 1997.
- [14] H. Jaeschke, A. P. Bautista, Z. Spolarics, and J. J. Spitzer, "Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats.," *J Leukoc Biol*, vol. 52, no. 4, pp. 377–382, Oct. 1992.
- [15] H. Komatsu *et al.*, "Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals," *Am. J. Physiol.*, vol. 262, no. 4 Pt 1, pp. G669–676, Apr. 1992.
- [16] P. Mavrier, A. M. Preaux, B. Guigui, M. C. Lescs, E. S. Zafrani, and D. Dhumeaux, "In vitro toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: evidence for a proteinase-mediated mechanism," *Hepatology*, vol. 8, no. 2, pp. 254–258, Apr. 1988.
- [17] J. S. Gujral, T. J. Bucci, A. Farhood, and H. Jaeschke, "Mechanism of cell death during

- warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: Apoptosis or necrosis?," *Hepatology*, vol. 33, no. 2, pp. 397–405, 2001.
- [18] C. Fondevila, R. W. Busuttil, and J. W. Kupiec-Weglinski, "Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 74, no. 2, pp. 86–93, Apr. 2003.
 - [19] B. Vollmar, S. Richter, and M. D. Menger, "Leukocyte stasis in hepatic sinusoids," *Am. J. Physiol.*, vol. 270, no. 5 Pt 1, pp. G798–803, May 1996.
 - [20] Z. Ming, C. Han, and W. W. Lauth, "Nitric oxide mediates hepatic arterial vascular escape from norepinephrine-induced constriction," *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 277, no. 6, pp. G1200–G1206, Dec. 1999.
 - [21] R. Varadarajan *et al.*, "Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation," *Transplantation*, vol. 78, no. 2, pp. 250–256, Jul. 2004.
 - [22] I. Bauer and B. H. Pannen, "Bench-to-bedside review: Carbon monoxide – from mitochondrial poisoning to therapeutic use," *Crit Care*, vol. 13, no. 4, p. 220, 2009.
 - [23] H. Rensing *et al.*, "Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver," *Hepatology*, vol. 36, no. 6, pp. 1453–1465, Dec. 2002.
 - [24] I. Marzi *et al.*, "Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion," *Transpl. Int.*, vol. 7 Suppl 1, pp. S503–506, 1994.
 - [25] F. Amersi *et al.*, "Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway," *Hepatology*, vol. 35, no. 4, pp. 815–823, Apr. 2002.
 - [26] J. Sun *et al.*, "Carbon monoxide ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury via sirtuin 1-mediated deacetylation of high-mobility group box 1 in rats," *Liver Transpl*, vol. 23, no. 4, pp. 510–526, Apr. 2017.
 - [27] C.-H. Cottart *et al.*, "Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat," *Hepatology*, vol. 29, no. 3, pp. 809–813, Mar. 1999.
 - [28] T. Shimamura *et al.*, "Protective Role of Nitric Oxide in Ischemia and Reperfusion Injury of the Liver," *J Am Coll Surg*, vol. 188, no. 1, pp. 43–52, Jan. 1999.
 - [29] S. Nakamura *et al.*, "HEPATIC RELEASE OF ENDOTHELIN-1 AFTER WARM ISCHEMIA: Reperfusion Injury and Its Hemodynamic Effect," *Transplantation*, vol. 59, no. 5, pp. 679–684, Mar. 1995.
 - [30] T. A. Koepfel, T. Kraus, J. C. Thies, M. M. Gebhard, G. Otto, and S. Post, "Effects of mixed ETA and ETB-receptor antagonist (Ro-47-0203) on hepatic microcirculation after warm ischemia," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 42, no. 6, pp. 1316–1321, Jun. 1997.
 - [31] M. Goto *et al.*, "Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances," *Hepatology*, vol. 19, no. 3, pp. 675–681, Mar. 1994.
 - [32] H. F. Galley, N. Richardson, P. D. Howdle, B. E. Walker, and N. R. Webster, "Total Antioxidant Capacity and Lipid Peroxidation during Liver Transplantation," *Clinical Science*, vol. 89, no. 3, pp. 329–332, Sep. 1995.
 - [33] H. Jaeschke and B. L. Woolbright, "Current strategies to minimize hepatic ischemia–reperfusion injury by targeting reactive oxygen species," *Transplantation Reviews*, vol. 26, no. 2, pp. 103–114, Apr. 2012.
 - [34] W.-Y. Lee, J.-S. Lee, and S.-M. Lee, "Protective effects of combined ischemic preconditioning and ascorbic acid on mitochondrial injury in hepatic ischemia/reperfusion," *J. Surg. Res.*, vol. 142, no. 1, pp. 45–52, Sep. 2007.
 - [35] C. Plin, J.-P. Tillement, A. Berdeaux, and D. Morin, "Resveratrol protects against cold ischemia-warm reoxygenation-induced damages to mitochondria and cells in rat liver," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 528, no. 1–3, pp. 162–168, Dec. 2005.

- [36] G. Du, A. Mouithys-Mickalad, and F. E. Sluse, "Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 25, no. 9, pp. 1066–1074, Dec. 1998.
- [37] T. Hasegawa, E. Malle, A. Farhood, and H. Jaeschke, "Generation of hypochlorite-modified proteins by neutrophils during ischemia-reperfusion injury in rat liver: attenuation by ischemic preconditioning," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 289, no. 4, pp. G760–G767, Oct. 2005.
- [38] S. W. Ryter, J. Alam, and A. M. K. Choi, "Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications," *Physiological Reviews*, vol. 86, no. 2, pp. 583–650, Apr. 2006.
- [39] R. Tenhunen, H. S. Marver, and R. Schmid, "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 61, no. 2, pp. 748–755, Oct. 1968.
- [40] M. D. Maines, "THE HEME OXYGENASE SYSTEM: A Regulator of Second Messenger Gases," *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 37, no. 1, pp. 517–554, 1997.
- [41] I. Bauer *et al.*, "Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stress-exposed rat liver," *Hepatology*, vol. 27, no. 3, pp. 829–838, Mar. 1998.
- [42] T. Nishimura *et al.*, "Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver," *Hepatology*, vol. 6, no. 4, pp. 701–707, Jul. 1986.
- [43] W. de Graaf *et al.*, "Quantitative Assessment of Liver Function after Ischemia-Reperfusion Injury and Partial Hepatectomy in Rats," *Journal of Surgical Research*, vol. 172, no. 1, pp. 85–94, Jan. 2012.
- [44] G. Wagener, "Assessment of Hepatic Function, Operative Candidacy, and Medical Management after Liver Resection in the Patient with Underlying Liver Disease," *Seminars in Liver Disease*, vol. 33, no. 03, pp. 204–212, Aug. 2013.
- [45] K. J. Halazun, A. Al-Mukhtar, A. Aldouri, S. Willis, and N. Ahmad, "Warm Ischemia in Transplantation: Search for a Consensus Definition," *Transplantation Proceedings*, vol. 39, no. 5, pp. 1329–1331, Jun. 2007.
- [46] W. R. Jarnagin *et al.*, "Improvement in Perioperative Outcome After Hepatic Resection," *Ann Surg*, vol. 236, no. 4, pp. 397–407, Oct. 2002.
- [47] D. M. Nagorney, J. A. van Heerden, D. M. Ilstrup, and M. A. Adson, "Primary hepatic malignancy: surgical management and determinants of survival," *Surgery*, vol. 106, no. 4, pp. 740–748; discussion 748–749, Oct. 1989.
- [48] N. Agarwal, "Blood Transfusion Increases the Risk of Infection After Trauma," *Archives of Surgery*, vol. 128, no. 2, p. 171, Feb. 1993.
- [49] J. Yamamoto *et al.*, "Perioperative blood transfusion promotes recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy," *Surgery*, vol. 115, no. 3, pp. 303–309, Mar. 1994.
- [50] K. R. Stephenson, S. M. Steinberg, K. S. Hughes, J. T. Vetto, P. H. Sugarbaker, and A. E. Chang, "Perioperative blood transfusions are associated with decreased time to recurrence and decreased survival after resection of colorectal liver metastases," *Ann Surg*, vol. 208, no. 6, pp. 679–687, Dec. 1988.
- [51] L. Wy, L. Ech, and L. Shy, "Methods of vascular control technique during liver resection: a comprehensive review," *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, vol. 9, no. 5, pp. 473–481, Oct. 2016.
- [52] A. J. C. IJtsma *et al.*, "The clinical relevance of the anhepatic phase during liver transplantation," *Liver Transplantation*, vol. 15, no. 9, pp. 1050–1055, 2009.
- [53] R. G. Thurman, I. Marzi, G. Seitz, J. Thies, J. J. Lemasters, and F. Zimmerman, "Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat,"

- Transplantation*, vol. 46, no. 4, pp. 502–506, Oct. 1988.
- [54] G. Garcea, A. Gescher, W. Steward, A. Dennison, and D. Berry, “Oxidative stress in humans following the Pringle manoeuvre,” *HBPD INT*, vol. 5, no. 2, pp. 210–214, May 2006.
 - [55] C. Huguet, A. Gavelli, and S. Bona, “Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour,” *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 178, no. 5, pp. 454–458, May 1994.
 - [56] S. Han *et al.*, “Comparison of the tolerance of hepatic ischemia/reperfusion injury in living donors: macrosteatosis versus microsteatosis,” *Liver Transpl.*, vol. 20, no. 7, pp. 775–783, Jul. 2014.
 - [57] T. K. Howard, G. B. Klintmalm, J. B. Cofer, B. S. Husberg, R. M. Goldstein, and T. A. Gonwa, “The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient,” *Transplantation*, vol. 49, no. 1, pp. 103–107, Jan. 1990.
 - [58] D. J. Hausenloy and D. M. Yellon, “Preconditioning and postconditioning: Underlying mechanisms and clinical application,” *Atherosclerosis*, vol. 204, no. 2, pp. 334–341, Jun. 2009.
 - [59] C. E. Murry, R. B. Jennings, and K. A. Reimer, “Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium,” *Circulation*, vol. 74, no. 5, pp. 1124–1136, Nov. 1986.
 - [60] T. Yoshizumi, K. Yanaga, Y. Soejima, T. Maeda, H. Uchiyama, and K. Sugimachi, “Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning,” *British Journal of Surgery*, vol. 85, no. 12, pp. 1636–1640, 1998.
 - [61] A. Serafin, J. Rosello-Catafau, N. Prats, C. Xaus, E. Gelpi, and C. Peralta, “Ischemic Preconditioning Increases the Tolerance of Fatty Liver to Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat,” *Am J Pathol*, vol. 161, no. 2, pp. 587–601, Aug. 2002.
 - [62] L. S. Salomão *et al.*, “Evaluation of liver regeneration by modulation with ischemic preconditioning after ischemia and reperfusion and partial hepatectomy,” *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, vol. 39, no. 3, pp. 211–215, Jun. 2012.
 - [63] X. Song, N. Zhang, H. XU, L. Cao, and H. Zhang, “Combined Preconditioning and Postconditioning Provides Synergistic Protection against Liver Ischemic Reperfusion Injury,” *Int J Biol Sci*, vol. 8, no. 5, pp. 707–718, May 2012.
 - [64] A. Patel *et al.*, “Early stress protein gene expression in a human model of ischemic preconditioning,” *Transplantation*, vol. 78, no. 10, pp. 1479–1487, Nov. 2004.
 - [65] E. Geuken *et al.*, “Expression of Heme Oxygenase-1 in Human Livers Before Transplantation Correlates with Graft Injury and Function After Transplantation,” *American Journal of Transplantation*, vol. 5, no. 8, pp. 1875–1885, 2005.
 - [66] R. Schmidt *et al.*, “Heme Oxygenase-1 Induction by the Clinically Used Anesthetic Isoflurane Protects Rat Livers From Ischemia/Reperfusion Injury,” *Ann Surg*, vol. 245, no. 6, pp. 931–942, Jun. 2007.
 - [67] S. Tsuchihashi, Y. Zhai, Q. Bo, R. Busuttil, and J. Kupiec-Weglinski, “Heme Oxygenase-1 Mediated Cytoprotection Against Liver Ischemia and Reperfusion Injury: Inhibition of Type-1 Interferon Signaling,” *Transplantation June 27, 2007*, vol. 83, no. 12, pp. 1628–1634, 2007.
 - [68] B. Ke *et al.*, “HO-1 - STAT3 Axis in Mouse Liver Ischemia/Reperfusion Injury: Regulation of TLR4 Innate Responses Through PI3K/PTEN Signaling,” *J Hepatol*, vol. 56, no. 2, pp. 359–366, Feb. 2012.
 - [69] T. Tamura, T. Kondo, K. Ogawa, K. Fukunaga, and N. Ohkohchi, “Protective effect of heme oxygenase-1 on hepatic ischemia-reperfusion injury through inhibition of platelet adhesion to the sinusoids,” *J Gastroenterol Hepatol*, vol. 28, no. 4, pp. 700–706, Apr. 2013.
 - [70] F. Amersi *et al.*, “Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury,” *J Clin Invest*, vol. 104, no. 11, pp. 1631–1639,

- Dec. 1999.
- [71] H. Kato *et al.*, “Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation,” *Am. J. Transplant.*, vol. 1, no. 2, pp. 121–128, Jul. 2001.
 - [72] S.-J. Kim, J. G. Park, and S.-M. Lee, “Protective effect of heme oxygenase-1 induction against hepatic injury in alcoholic steatotic liver exposed to cold ischemia/reperfusion,” *Life Sciences*, vol. 90, no. 5–6, pp. 169–176, Jan. 2012.
 - [73] M. G. Donner *et al.*, “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*, vol. 394, no. 1, pp. 97–112, 2012.
 - [74] M. Shito *et al.*, “Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat,” *Transplantation*, vol. 63, no. 1, pp. 143–148, Jan. 1997.
 - [75] H. Harada *et al.*, “Transfer Of The Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Into Rat Liver Abrogates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. [Miscellaneous Article],” *Transplantation November 27, 2002*, vol. 74, no. 10, pp. 1434–1441, 2002.
 - [76] Y.-L. Yang, J.-P. Li, X.-P. Xu, K.-F. Dou, S.-Q. Yue, and K.-Z. Li, “Protective effects of tumor necrosis factor alpha antibody and ulinastatin on liver ischemic reperfusion in rats,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, no. 21, pp. 3161–3164, Nov. 2004.
 - [77] Z. Ben-Ari *et al.*, “Role of anti-tumor necrosis factor-[alpha] in ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver in a blood-free environment. [Miscellaneous Article],” *Transplantation June 27, 2002*, vol. 73, no. 12, pp. 1875–1880, 2002.
 - [78] H. A. Rüdiger and P.-A. Clavien, “Tumor necrosis factor α , but not fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver,” *Gastroenterology*, vol. 122, no. 1, pp. 202–210, Jan. 2002.
 - [79] M. F. Mahmoud, S. M. E. Shazly, and W. Barakat, “Inhibition of TNF- α protects against hepatic ischemia–reperfusion injury in rats via NF- κ B dependent pathway,” *Naunyn-Schmiedeberg’s Arch Pharmacol*, vol. 385, no. 5, pp. 465–471, May 2012.
 - [80] T. Miyazaki and Y. Matsuzaki, “Taurine and liver diseases: a focus on the heterogeneous protective properties of taurine,” *Amino Acids*, Aug. 2012.
 - [81] M. Wettstein and D. Häussinger, “Taurine attenuates cold ischemia-reoxygenation injury in rat liver,” *Transplantation*, vol. 69, no. 11, pp. 2290–2296, Jun. 2000.
 - [82] P. Schemmer *et al.*, “Taurine improves graft survival after experimental liver transplantation,” *Liver Transplantation*, vol. 11, no. 8, pp. 950–959, 2005.
 - [83] M. Wettstein and D. Häussinger, “Cytoprotection by the osmolytes betaine and taurine in ischemia-reoxygenation injury in the perfused rat liver,” *Hepatology*, vol. 26, no. 6, pp. 1560–1566, Dec. 1997.
 - [84] G. Schindler *et al.*, “Fundamental Efforts toward the Development of a Therapeutic Cocktail with a Manifold Ameliorative Effect on Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury,” *Microcirculation*, vol. 16, no. 7, pp. 593–602, Oct. 2009.
 - [85] F. Zhang *et al.*, “Protective effects of taurine against endotoxin-induced acute liver injury after hepatic ischemia reperfusion,” *Amino Acids*, vol. 38, no. 1, pp. 237–245, Jan. 2010.
 - [86] L. Tong, J. Li, H. Qiao, H. Jiang, F. Meng, and X. Sun, “Taurine Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbit Livers,” *Transplantation Proceedings*, vol. 38, no. 5, pp. 1575–1579, Jun. 2006.
 - [87] M. Kincius *et al.*, “Taurine protects from liver injury after warm ischemia in rats: the role of kupffer cells,” *Eur Surg Res*, vol. 39, no. 5, pp. 275–283, 2007.
 - [88] R. Bahde and H.-U. Spiegel, “Hepatic ischaemia–reperfusion injury from bench to bedside,” *Br J Surg*, vol. 97, no. 10, pp. 1461–1475, Oct. 2010.

- [89] P.-A. Clavien, S. Yadav, D. Sindram, and R. C. Bentley, "Protective Effects of Ischemic Preconditioning for Liver Resection Performed Under Inflow Occlusion in Humans," *Ann Surg*, vol. 232, no. 2, pp. 155–162, Aug. 2000.
- [90] N. Arkadopoulos *et al.*, "Ischemic Preconditioning Confers Antiapoptotic Protection During Major Hepatectomies Performed Under Combined Inflow and Outflow Exclusion of the Liver. A Randomized Clinical Trial," *World J Surg*, vol. 33, no. 9, pp. 1909–1915, Sep. 2009.
- [91] M. Cescon *et al.*, "Effect of ischemic preconditioning in whole liver transplantation from deceased donors. A pilot study," *Liver Transpl*, vol. 12, no. 4, pp. 628–635, Apr. 2006.
- [92] A. Amador *et al.*, "Ischemic Pre-conditioning in Deceased Donor Liver Transplantation: A Prospective Randomized Clinical Trial," *American Journal of Transplantation*, vol. 7, no. 9, pp. 2180–2189, Sep. 2007.
- [93] P.-A. Clavien *et al.*, "A Prospective Randomized Study in 100 Consecutive Patients Undergoing Major Liver Resection With Versus Without Ischemic Preconditioning," *Ann Surg*, vol. 238, no. 6, pp. 843–852, Dec. 2003.
- [94] S.-Q. Li, L.-J. Liang, J.-F. Huang, and Z. Li, "Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis," *World J. Gastroenterol.*, vol. 10, no. 17, pp. 2580–2584, Sep. 2004.
- [95] D. P. Bartel, "MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions," *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215–233, Jan. 2009.
- [96] X. W. Wang, N. H. H. Heegaard, and H. Ørum, "MicroRNAs in Liver Disease," *Gastroenterology*, vol. 142, no. 7, pp. 1431–1443, Jun. 2012.
- [97] J. M. Moreno-Moya, F. Vilella, and C. Simón, "MicroRNA: key gene expression regulators," *Fertility and Sterility*, vol. 101, no. 6, pp. 1516–1523, Jun. 2014.
- [98] B. P. Lewis, C. B. Burge, and D. P. Bartel, "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets," *Cell*, vol. 120, no. 1, pp. 15–20, Jan. 2005.
- [99] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse," *Current Biology*, vol. 12, no. 9, pp. 735–739, Apr. 2002.
- [100] J. Hu, Y. Xu, J. Hao, S. Wang, C. Li, and S. Meng, "MiR-122 in hepatic function and liver diseases," *Protein Cell*, vol. 3, no. 5, pp. 364–371, May 2012.
- [101] M. Castoldi *et al.*, "The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice," *J Clin Invest*, vol. 121, no. 4, pp. 1386–1396, Apr. 2011.
- [102] C. Esau *et al.*, "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting," *Cell Metabolism*, vol. 3, no. 2, pp. 87–98, Feb. 2006.
- [103] J. Krützfeldt *et al.*, "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs,'" *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 685–689, Dec. 2005.
- [104] Y. Zhang *et al.*, "Plasma MicroRNA-122 as a Biomarker for Viral-, Alcohol-, and Chemical-Related Hepatic Diseases," *Clinical Chemistry*, vol. 56, no. 12, pp. 1830–1838, Jan. 2010.
- [105] O. F. Laterza *et al.*, "Plasma MicroRNAs as Sensitive and Specific Biomarkers of Tissue Injury," *Clinical Chemistry*, vol. 55, no. 11, pp. 1977–1983, Nov. 2009.
- [106] Y. Yamaura, M. Nakajima, S. Takagi, T. Fukami, K. Tsuneyama, and T. Yokoi, "Plasma MicroRNA Profiles in Rat Models of Hepatocellular Injury, Cholestasis, and Steatosis," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, Feb. 2012.
- [107] L. Gailhouse *et al.*, "MiR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells," *Hepatology*, p. n/a–n/a, 2013.
- [108] W. R. R. Farid *et al.*, "Hepatocyte-derived microRNAs as serum biomarkers of hepatic

- injury and rejection after liver transplantation,” *Liver Transpl*, vol. 18, no. 3, pp. 290–297, Mar. 2012.
- [109] G. Tzur *et al.*, “Comprehensive Gene and microRNA Expression Profiling Reveals a Role for microRNAs in Human Liver Development,” *PLoS One*, vol. 4, no. 10, Oct. 2009.
 - [110] H. Zhu *et al.*, “The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism,” *Cell*, vol. 147, no. 1, pp. 81–94, Sep. 2011.
 - [111] R. J. A. Frost and E. N. Olson, “Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 52, pp. 21075–21080, Dec. 2011.
 - [112] E. Schneider and D. S. Clark, “Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 39, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2013.
 - [113] S. Takagi, M. Nakajima, T. Mohri, and T. Yokoi, “Post-transcriptional Regulation of Human Pregnane X Receptor by Micro-RNA Affects the Expression of Cytochrome P450 3A4,” *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 15, pp. 9674–9680, Apr. 2008.
 - [114] J. K. Rieger, K. Klein, S. Winter, and U. M. Zanger, “Expression Variability of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion–Related MicroRNAs in Human Liver: Influence of Nongenetic Factors and Association with Gene Expression,” *Drug Metab Dispos*, vol. 41, no. 10, pp. 1752–1762, Oct. 2013.
 - [115] P. Landgraf *et al.*, “A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing,” *Cell*, vol. 129, no. 7, pp. 1401–1414, Jun. 2007.
 - [116] X. Lu *et al.*, “miR-142-3p regulates the formation and differentiation of hematopoietic stem cells in vertebrates,” *Cell Res.*, vol. 23, no. 12, pp. 1356–1368, Dec. 2013.
 - [117] R. Nimmo *et al.*, “miR-142-3p Controls the Specification of Definitive Hemangioblasts during Ontogeny,” *Developmental Cell*, vol. 26, no. 3, pp. 237–249, Aug. 2013.
 - [118] R. E. Lanford *et al.*, “Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection,” *Science*, vol. 327, no. 5962, pp. 198–201, Jan. 2010.
 - [119] H. Kutay *et al.*, “Downregulation of miR-122 in the Rodent and Human Hepatocellular Carcinomas,” *J Cell Biochem*, vol. 99, no. 3, pp. 671–678, Oct. 2006.
 - [120] C. Coulouarn, V. M. Factor, J. B. Andersen, M. E. Durkin, and S. S. Thorgeirsson, “Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties,” *Oncogene*, vol. 28, no. 40, pp. 3526–3536, Oct. 2009.
 - [121] X.-M. Zhu, L.-J. Wu, J. Xu, R. Yang, and F.-S. Wu, “Let-7c MicroRNA Expression and Clinical Significance in Hepatocellular Carcinoma,” *Journal of International Medical Research*, vol. 39, no. 6, pp. 2323–2329, Dec. 2011.
 - [122] L. Wu, C. Cai, X. Wang, M. Liu, X. Li, and H. Tang, “MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells,” *FEBS Letters*, vol. 585, no. 9, pp. 1322–1330, May 2011.
 - [123] Z. Wang, “miR-21 promotes migration and invasion by the miR-21-PDCD4-AP-1 feedback loop in human hepatocellular carcinoma,” *Oncology Reports*, Feb. 2012.
 - [124] I. Habeos, “MicroRNA profiling in murine liver after partial hepatectomy,” *International Journal of Molecular Medicine*, Feb. 2012.
 - [125] R. Ng, G. Song, G. R. Roll, N. M. Frandsen, and H. Willenbring, “A microRNA-21 surge facilitates rapid cyclin D1 translation and cell cycle progression in mouse liver regeneration,” *J Clin Invest*, vol. 122, no. 3, pp. 1097–1108, Mar. 2012.
 - [126] G. Song *et al.*, “MicroRNAs Control Hepatocyte Proliferation During Liver Regeneration,” *Hepatology*, vol. 51, no. 5, pp. 1735–1743, May 2010.
 - [127] J. Shu *et al.*, “Genome-wide MicroRNA Downregulation as a Negative Feedback Mechanism in the Early Phases of Liver Regeneration,” *Hepatology*, vol. 54, no. 2, pp. 609–619, Aug. 2011.

- [128] N. Raschzok *et al.*, “Temporal expression profiles indicate a primary function for microRNA during the peak of DNA replication after rat partial hepatectomy,” *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 300, no. 6, pp. R1363–1372, Jun. 2011.
- [129] R. C. Gehrau *et al.*, “Regulation of Molecular Pathways in Ischemia-Reperfusion Injury After Liver Transplantation. [Miscellaneous Article],” *Transplantation* November 27, 2013, vol. 96, no. 10, pp. 926–934, 2013.
- [130] M. Yang *et al.*, “BIOMARKERS DISTINGUISH APOPTOTIC AND NECROTIC CELL DEATH DURING HEPATIC ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN MICE,” *Liver Transpl*, vol. 20, no. 11, pp. 1372–1382, Nov. 2014.
- [131] P. Caster *et al.*, “Circulating microRNA-122, -21 and -223 as potential markers of liver injury following warm ischaemia and reperfusion in rats,” *Molecular Medicine Reports*, May 2015.
- [132] C. Roderburg *et al.*, “Elevated miR-122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases,” *Liver Int*, vol. 35, no. 4, pp. 1172–1184, Apr. 2015.
- [133] W. Zheng *et al.*, “Global MicroRNA Expression Profiling of Mouse Livers following Ischemia-Reperfusion Injury at Different Stages,” *PLoS One*, vol. 11, no. 2, Feb. 2016.
- [134] C.-H. Yu, C.-F. Xu, and Y.-M. Li, “Association of MicroRNA-223 Expression with Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Mice,” *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 54, no. 11, pp. 2362–2366, Dec. 2008.
- [135] S. H. Ramkissoon *et al.*, “Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells,” *Leukemia Research*, vol. 30, no. 5, pp. 643–647, May 2006.
- [136] E. Tsitsiou and M. A. Lindsay, “microRNAs and the immune response,” *Curr Opin Pharmacol*, vol. 9, no. 4, pp. 514–520, Aug. 2009.
- [137] X.-P. Ren *et al.*, “MicroRNA-320 Is Involved in the Regulation of Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury by Targeting Heat-Shock Protein 20,” *Circulation*, vol. 119, no. 17, pp. 2357–2366, May 2009.
- [138] Y. Cheng *et al.*, “Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4,” *Cardiovasc Res*, vol. 87, no. 3, pp. 431–439, Aug. 2010.
- [139] J. G. Godwin, X. Ge, K. Stephan, A. Jurisch, S. G. Tullius, and J. Iacomini, “Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury,” *PNAS*, vol. 107, no. 32, pp. 14339–14344, Oct. 2010.
- [140] X. Xu *et al.*, “Delayed ischemic preconditioning contributes to renal protection by upregulation of miR-21,” *Kidney Int*, vol. 82, no. 11, pp. 1167–1175, Dec. 2012.
- [141] T. Morita, M. Ishikawa, and A. Sakamoto, “Identical MicroRNAs Regulate Liver Protection during Anaesthetic and Ischemic Preconditioning in Rats: An animal study,” *PLoS One*, vol. 10, no. 5, May 2015.
- [142] Weihong Hou, Q. Tian, N. M. Steuerwald, L. W. Schrum, and H. L. Bonkovsky, “The let-7 microRNA enhances heme oxygenase-1 by suppressing Bach1 and attenuates oxidant injury in human hepatocytes,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, vol. 1819, no. 11–12, pp. 1113–1122, Nov. 2012.
- [143] L. Qiu *et al.*, “miR-122-induced down-regulation of HO-1 negatively affects miR-122-mediated suppression of HBV,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 398, no. 4, pp. 771–777, Aug. 2010.
- [144] I. V. Kutyavin *et al.*, “3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures,” *Nucleic Acids Res*, vol. 28, no. 2, pp. 655–661, Jan. 2000.
- [145] “TargetScanHuman 7.1.” [Online]. Available: http://www.targetscan.org/vert_71/. [Accessed: 22-May-2017].
- [146] V. Agarwal, G. W. Bell, J.-W. Nam, and D. P. Bartel, “Predicting effective microRNA

- target sites in mammalian mRNAs,” *eLife*, vol. 4.
- [147] S. Patton, “Malonaldehyde, lipid oxidation, and the thiobarbituric acid test,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 51, no. 3, pp. 114–114, Mar. 1974.
 - [148] J. I. Gray, “Measurement of lipid oxidation: A review,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 55, no. 6, pp. 539–546, Jun. 1978.
 - [149] M. Uchiyama and M. Mihara, “Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test,” *Analytical Biochemistry*, vol. 86, no. 1, pp. 271–278, May 1978.
 - [150] V. Nair and G. A. Turner, “The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: Structure of the adduct with malondialdehyde,” *Lipids*, vol. 19, no. 10, pp. 804–805, Oct. 1984.
 - [151] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, “Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent,” *J. Biol. Chem.*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, Jan. 1951.
 - [152] P. P. Bradley, D. A. Priebat, R. D. Christensen, and G. Rothstein, “Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker,” *J Invest Dermatol*, vol. 78, no. 3, pp. 206–209, Mar. 1982.
 - [153] B. Schmekel, S. E. Karlsson, M. Linden, C. Sundström, H. Tegner, and P. Venge, “Myeloperoxidase in human lung lavage,” *Inflammation*, vol. 14, no. 4, pp. 447–454, Aug. 1990.
 - [154] A. C. Maehly, “The Assay of Catalases and Peroxidases,” in *Methods of Biochemical Analysis*, D. Glick, Ed. John Wiley & Sons, Inc., 1954, pp. 357–424.
 - [155] P. C. Andrews and N. I. Krinsky, “Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate,” *Analytical Biochemistry*, vol. 127, no. 2, pp. 346–350, Dec. 1982.
 - [156] P. M. Bozeman, D. B. Learn, and E. L. Thomas, “Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase,” *Journal of Immunological Methods*, vol. 126, no. 1, pp. 125–133, Jan. 1990.
 - [157] N. Shirasugi, G. Wakabayashi, M. Shimazu, M. Shito, S. Kawachi, and M. Kitajima, “Interleukin-1 receptor blockade attenuates oxygen-derived free radical production and microcirculatory disturbances in ischemia/reperfusion injury in the liver,” *Transplantation Proceedings*, vol. 29, no. 1–2, pp. 371–373, Feb. 1997.
 - [158] J. Lu *et al.*, “MicroRNA expression profiles classify human cancers,” *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 834–838, Jun. 2005.
 - [159] S. Toffanin *et al.*, “MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a,” *Gastroenterology*, vol. 140, no. 5, pp. 1618–1628.e16, May 2011.
 - [160] J. Ji *et al.*, “MicroRNA Expression, Survival, and Response to Interferon in Liver Cancer,” *N Engl J Med*, vol. 361, no. 15, pp. 1437–1447, Oct. 2009.
 - [161] A. J. van der Meer *et al.*, “Sensitive detection of hepatocellular injury in chronic hepatitis C patients with circulating hepatocyte-derived microRNA-122,” *J Viral Hepat*, vol. 20, no. 3, pp. 158–166, Mar. 2013.
 - [162] J. Hu *et al.*, “Plasma MicroRNA, a Potential Biomarker for Acute Rejection After Liver Transplantation. [Miscellaneous Article],” *Transplantation April 27, 2013*, vol. 95, no. 8, pp. 991–999, 2013.
 - [163] B. González-Flecha, J. C. Cutrin, and A. Boveris, “Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion,” *J Clin Invest*, vol. 91, no. 2, pp. 456–464, Feb. 1993.
 - [164] C. Peralta, D. Closa, C. Xaus, E. Gelpí, J. Roselló-catafau, and G. Hotter, “Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine,” *Hepatology*, vol. 28, no. 3, pp. 768–773, Sep. 1998.
 - [165] J. Yong, Y. Bo, W. Bao-qiang, T. Jian-jun, and Q. Zhen, “The Optimal Time Window of Ischemic Preconditioning (IPC) on the Reperfusion Injury in Moderate to Severe

- Hepatocirrhosis in Rats,” *Ann Clin Lab Sci*, vol. 43, no. 1, pp. 64–69, Dec. 2013.
- [166] A. Negre-Salvayre *et al.*, “Pathological aspects of lipid peroxidation,” *Free Radical Research*, vol. 44, no. 10, pp. 1125–1171, Oct. 2010.
 - [167] L.-M. Jin *et al.*, “Ischemic Preconditioning Attenuates Morphological and Biochemical Changes in Hepatic Ischemia/Reperfusion in Rats,” *Pathobiology*, vol. 77, no. 3, pp. 136–146, 2010.
 - [168] G.-J. Yuan, J.-C. Ma, Z.-J. Gong, X.-M. Sun, S.-H. Zheng, and X. Li, “Modulation of liver oxidant-antioxidant system by ischemic preconditioning during ischemia/reperfusion injury in rats,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 11, no. 12, pp. 1825–1828, Mar. 2005.
 - [169] N. Yun, S.-H. Kim, and S.-M. Lee, “Differential consequences of protein kinase C activation during early and late hepatic ischemic preconditioning,” *J Physiol Sci*, vol. 62, no. 3, pp. 199–209, May 2012.
 - [170] H. Jaeschke, A. Farhood, and C. W. Smith, “Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo,” *FASEB J*, vol. 4, no. 15, pp. 3355–3359, Dec. 1990.
 - [171] F. Fazi *et al.*, “A Minicircuitry Comprised of MicroRNA-223 and Transcription Factors NFI-A and C/EBP α Regulates Human Granulopoiesis,” *Cell*, vol. 123, no. 5, pp. 819–831, Dec. 2005.
 - [172] C.-Z. Chen, L. Li, H. F. Lodish, and D. P. Bartel, “MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation,” *Science*, vol. 303, no. 5654, pp. 83–86, Feb. 2004.
 - [173] J. B. Johnnidis *et al.*, “Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223,” *Nature*, vol. 451, no. 7182, pp. 1125–1129, Feb. 2008.
 - [174] F. Bauernfeind, A. Rieger, F. A. Schildberg, P. A. Knolle, J. L. Schmid-Burgk, and V. Hornung, “NLRP3 Inflammasome Activity Is Negatively Controlled by miR-223,” *J Immunol*, vol. 189, no. 8, pp. 4175–4181, Oct. 2012.
 - [175] X. Chen *et al.*, “miRNA Regulation of Liver Growth After 50% Partial Hepatectomy and Small Size Grafts in Rats. [Miscellaneous Article],” *Transplantation February 15, 2011*, vol. 91, no. 3, pp. 293–299, 2011.
 - [176] J. Ding, “Circulating microRNA-122 as a potential biomarker for liver injury,” *Molecular Medicine Reports*, Mar. 2012.
 - [177] J. Schug *et al.*, “Dynamic recruitment of microRNAs to their mRNA targets in the regenerating liver,” *BMC Genomics*, vol. 14, p. 264, Apr. 2013.
 - [178] S. Braun *et al.*, “Pretreatment With Helium Does Not Attenuate Liver Injury After Warm Ischemia-Reperfusion. [Miscellaneous Article],” *Shock May 2014*, vol. 41, no. 5, pp. 413–419, 2014.
 - [179] S. Ishii *et al.*, “Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription,” *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, vol. 8, no. 5, pp. 461–468, 2001.
 - [180] N. Yun, H.-A. Eum, and S.-M. Lee, “Protective Role of Heme Oxygenase-1 Against Liver Damage Caused by Hepatic Ischemia and Reperfusion in Rats,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 13, no. 10, pp. 1503–1512, May 2010.
 - [181] M. Massip-Salcedo *et al.*, “Heat Shock Proteins and Mitogen-activated Protein Kinases in Steatotic Livers Undergoing Ischemia-Reperfusion: Some Answers,” *Am J Pathol*, vol. 168, no. 5, pp. 1474–1485, May 2006.
 - [182] H.-T. Yao *et al.*, “Effect of taurine supplementation on cytochrome P450 2E1 and oxidative stress in the liver and kidneys of rats with streptozotocin-induced diabetes,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 7, pp. 1703–1709, Jul. 2009.
 - [183] G. Wang, W. Li, X. Lu, X. Zhao, and L. Xu, “Taurine attenuates oxidative stress and alleviates cardiac failure in type I diabetic rats,” *Croat Med J*, vol. 54, no. 2, pp. 171–

- 179, Apr. 2013.
- [184] J. R. Ward, P. R. Heath, J. W. Catto, M. K. B. Whyte, M. Milo, and S. A. Renshaw, "Regulation of Neutrophil Senescence by MicroRNAs," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, Jan. 2011.
 - [185] L. W. Ellisen, "Growth Control Under Stress: mTOR Regulation through the REDD1-TSC Pathway," *Cell Cycle*, vol. 4, no. 11, pp. 1500–1502, Nov. 2005.
 - [186] E.-S. Han *et al.*, "The in vivo gene expression signature of oxidative stress," *Physiol. Genomics*, vol. 34, no. 1, pp. 112–126, Jun. 2008.
 - [187] "Gadd45beta Is a Novel Mediator of Cardiomyocyte Apoptosis Induced by Ischaemia/Hypoxia," *PubMed Journals*. [Online]. Available: <https://ncbi.nlm.nih.gov/labs/articles/20154065/>. [Accessed: 09-Jun-2017].
 - [188] Q. Chen, Y. Zhou, A. M. Richards, and P. Wang, "Up-regulation of miRNA-221 inhibits hypoxia/reoxygenation-induced autophagy through the DDIT4/mTORC1 and Tp53inp1/p62 pathways," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 474, no. 1, pp. 168–174, May 2016.
 - [189] P. Skendros *et al.*, "Regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) links stress with IL-1 β -mediated familial Mediterranean fever attack through autophagy-driven neutrophil extracellular traps," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 140, no. 5, pp. 1378–1387.e13, Nov. 2017.
 - [190] A. P. Wheeler and A. J. Ridley, "Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility," *Experimental Cell Research*, vol. 301, no. 1, pp. 43–49, Nov. 2004.
 - [191] X. H. Wang, Y. Wang, F. Diao, and J. Lu, "RhoB is involved in lipopolysaccharide-induced inflammation in mouse in vivo and in vitro," *J. Physiol. Biochem.*, vol. 69, no. 2, pp. 189–197, Jun. 2013.
 - [192] T. Lawrence, "The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 1, no. 6, Dec. 2009.
 - [193] M. Scortegagna *et al.*, "Fine Tuning of the UPR by the Ubiquitin Ligases Siah1/2," *PLOS Genetics*, vol. 10, no. 5, p. e1004348, Aug. 2014.
 - [194] Q. Li, P. Wang, K. Ye, and H. Cai, "Central role of SIAH inhibition in DCC-dependent cardioprotection provoked by netrin-1/NO," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 112, no. 3, pp. 899–904, Jan. 2015.
 - [195] M. Nemani *et al.*, "Activation of the human homologue of the Drosophila sina gene in apoptosis and tumor suppression.," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, no. 17, pp. 9039–9042, Aug. 1996.
 - [196] M. Shin *et al.*, "STAT3 Potentiates SIAH-1 Mediated Proteasomal Degradation of β -Catenin in Human Embryonic Kidney Cells," *Mol Cells*, vol. 39, no. 11, pp. 821–826, Nov. 2016.
 - [197] Q. Chen *et al.*, "Inducible MicroRNA-223 Down-Regulation Promotes TLR-Triggered IL-6 and IL-1 β Production in Macrophages by Targeting STAT3," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, Aug. 2012.
 - [198] G. Zhuang *et al.*, "A Novel Regulator of Macrophage Activation miR-223 in Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation," *Circulation*, vol. 125, no. 23, pp. 2892–2903, Jun. 2012.
 - [199] V. R. Sara and K. Hall, "Insulin-like growth factors and their binding proteins," *Physiological Reviews*, vol. 70, no. 3, pp. 591–614, Jul. 1990.
 - [200] Y. K. Fu, S. Arkins, B. S. Wang, and K. W. Kelley, "A novel role of growth hormone and insulin-like growth factor-I. Priming neutrophils for superoxide anion secretion.," *J Immunol*, vol. 146, no. 5, pp. 1602–1608, Mar. 1991.
 - [201] T. Inoue *et al.*, "Growth hormone and insulin-like growth factor I augment bactericidal capacity of human polymorphonuclear neutrophils," *Shock*, vol. 10, no. 4, pp. 278–284, Oct. 1998.

- [202] R. Bjerknes and D. Aarskog, "Priming of human polymorphonuclear neutrophilic leukocytes by insulin-like growth factor I: increased phagocytic capacity, complement receptor expression, degranulation, and oxidative burst.," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 80, no. 6, pp. 1948–1955, Jun. 1995.
- [203] T. X. Lu *et al.*, "MiR-223 deficiency increases eosinophil progenitor proliferation," *J Immunol*, vol. 190, no. 4, pp. 1576–1582, Feb. 2013.
- [204] M. Haneklaus *et al.*, "Cutting Edge: miR-223 and EBV miR-BART15 Regulate the NLRP3 Inflammasome and IL-1 β Production," *J Immunol*, vol. 189, no. 8, pp. 3795–3799, Oct. 2012.
- [205] F. S. Sutterwala, S. Haasken, and S. L. Cassel, "Mechanism of NLRP3 inflammasome activation," *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, vol. 1319, no. 1, pp. 82–95, Jun. 2014.
- [206] F. Martinon, A. Mayor, and J. Tschopp, "The Inflammasomes: Guardians of the Body," *Annual Review of Immunology*, vol. 27, no. 1, pp. 229–265, 2009.
- [207] R. A. Ratsimandresy, A. Dorfleutner, and C. Stehlik, "An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology," *Front Immunol*, vol. 4, Dec. 2013.
- [208] Y. Inoue *et al.*, "NLRP3 Regulates Neutrophil Functions and Contributes to Hepatic Ischemia–Reperfusion Injury Independently of Inflammasomes," *J Immunol*, vol. 192, no. 9, pp. 4342–4351, Jan. 2014.
- [209] H. Jaeschke and A. Farhood, "Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 260, no. 3, pp. G355–G362, Mar. 1991.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Benedikt Pannen für die Aufnahme als Doktorandin in der Klinik für Anästhesiologie

Herrn PD Dr. med. Sebastian Braun für die Auswahl des Themas und die Betreuung während meiner gesamten Arbeit

Frau Prof. Dr. rer. nat. Inge Bauer für die Unterstützung im Labor und beim Verfassen der Dissertation

Yvonne Grüber und Claudia Dohle für ihre Hilfsbereitschaft im Labor

Florian Kessler und meiner Familie für ihre Unterstützung und Anteilnahme in allen Phasen meiner Arbeit