

**Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)**

**REDUKTION DES MIKROVASKULÄREN UND  
PARENCHYMATÖSEN  
REPERFUSIONSSCHADEN DER LEBER  
DURCH ERYTHROPOIETIN UND GP IIb/IIIa  
REZEPTORBLOCKADE**

als Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2010

vorgelegt von:

**Jennifer Klein**

Geboren am 03.09.1981 in Illingen/Saar

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
3.1	Ischämie- und Reperfusionsschaden .....	9
3.2	Pathomechanismen .....	9
3.2.1	Ischämie.....	10
3.2.2	Reperfusion.....	11
3.2.2.1	<i>No-reflow</i> .....	11
3.2.2.2	<i>Reflow-paradox</i> .....	12
3.3	Hepatische Mikrozirkulation .....	13
3.4	Erythropoietin .....	14
3.5	Abciximab (ReoPro®) .....	17
<b>4</b>	<b>ZIEL DER STUDIE.....</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>20</b>
5.1	Versuchstiere .....	20
5.2	Modell .....	20
5.2.1	Anästhesie und chirurgische Präparation.....	20
5.2.2	Ischämie und Reperfusion (I/R) des linken Leberlappens.....	21
5.2.3	Mikrozirkulationsmodell der Leber.....	22
5.3	Untersuchungstechniken.....	22
5.3.1	Makrohämodynamik.....	22
5.3.2	Mikrozirkulation .....	22
5.3.3	Intravitale Mikroskopie .....	23
5.3.4	Mikrozirkulatorische Parameter.....	24
5.3.4.1	<i>Sinusoidales Perfusionsversagen</i> .....	24
5.3.4.2	<i>Sinusoidale Leukostase und venuläre Leukozytenadhäsion</i> .....	24
5.3.4.3	<i>Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit</i> .....	26

5.3.4.4	<i>Hepatozelluläre Apoptose</i> .....	26
5.3.4.5	<i>Kupferzell-Phagozytose-Aktivität</i> .....	26
5.3.5	Hepatozelluläre Exkretionsfunktion .....	27
5.3.6	Vollblut - Analytik.....	27
5.3.6.1	<i>Blutgasanalyse, Zellzahlbestimmung</i> .....	27
5.3.6.2	<i>Enzym- und Interleukinbestimmung im Plasma</i> .....	28
5.3.7	Histologische Untersuchungen.....	28
5.4	Proteinexpression .....	29
5.4.1	Immunhistochemie .....	29
5.4.2	Western blot.....	31
5.5	Experimentelles Protokoll.....	33
5.6	Gruppeneinteilung.....	34
5.7	Datenerfassung und Statistik .....	35
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>36</b>
6.1	Makrohämodynamik.....	36
6.1.1	Blutbild .....	36
6.1.2	Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz .....	36
6.1.3	Blutgasanalyse .....	36
6.2	Mikrozirkulation .....	37
6.2.1	Sinusoidales Perfusionsversagen .....	37
6.2.2	Sinusoidale Leukostase .....	38
6.2.3	Venuläre Leukozytenadhäsion .....	39
6.2.4	Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit .....	40
6.2.5	Hepatozelluläre Apoptose .....	41
6.2.6	Kupferzell-Phagozytose-Aktivität.....	42
6.2.7	Galleexkretion .....	43
6.2.8	Plasma-Enzymaktivität.....	44
6.2.8.1	<i>Alanin-Aminotransferase (ALT)</i> .....	44
6.2.8.2	<i>Aspartat-Aminotransferase (AST)</i> .....	45
6.2.8.3	<i>Laktatdehydrogenase (LDH)</i> .....	46
6.2.8.4	<i>Glutamatdehydrogenase (GLDH)</i> .....	47
6.3	Morphologie und Entzündung .....	48
6.3.1	Histomorphologie .....	48
6.3.1.1	<i>Zytoplasmatische Vakuolisierung</i> .....	48
6.3.1.2	<i>Zytoplasmatische Grobscholligkeit</i> .....	50
6.3.1.3	<i>Sinusoidale Kongestion</i> .....	51
6.3.2	Entzündung .....	52
6.3.2.1	<i>Leukozyteninfiltration</i> .....	52
6.3.2.2	<i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	53

---

6.3.2.3	<i>Interleukin-6 (IL-6)</i> .....	54
6.3.2.4	<i>Interleukin-10 (IL-10)</i> .....	55
6.4	Proteinexpression .....	56
6.4.1	Immunhistochemie .....	56
6.4.2	Western blot.....	57
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>60</b>
7.1	Diskussion von Material und Methoden .....	60
7.1.1	Diskussion des Modells.....	60
7.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken .....	63
7.2	Diskussion der Ergebnisse.....	67
7.2.1	Auswirkungen von I/R auf die hepatische Mikrozirkulation .....	67
7.2.1.1	<i>Intravitale Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	67
7.2.1.2	<i>Gewebeintegrität und Funktion</i> .....	69
7.2.2	Auswirkungen von Erythropoietin auf den I/R-induzierten Reperfusionsschaden .....	71
7.2.3	Mechanismus der Gewebeprotektion von Erythropoietin .....	77
7.2.4	Auswirkungen von ReoPro auf den I/R-induzierten Reperfusionsschaden .....	80
7.2.5	Schlussfolgerung.....	83
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>TABELLEN</b> .....	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>DANK, PUBLIKATIONEN</b> .....	<b>101</b>

# 1 Zusammenfassung

Der mikrovaskuläre Reperfusionsschaden der Leber sowie die post-ischämische Organfunktion stellen die Hauptursache für Morbidität und Mortalität nach Leberischämie dar. Ziel dieser *in-vivo* Studie war es, den Effekt von rekombinantem humanem Erythropoietin beziehungsweise ReoPro, einem GPIIb/IIIa-inhibierenden Antikörper, auf den mikrovaskulären und parenchymatösen Ischämie- und Reperfusionsschaden der Leber zu untersuchen.

Weibliche, mit Pentobarbital (50g/kg KG) narkotisierte Sprague Dawley Ratten (250-280g) wurden laparotomiert und eine selektive 90-minütige Ischämie des linken Leberlappens mit nachfolgender 90-minütiger Reperfusion durchgeführt. Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie wurde die hepatische Mikrozirkulation am Ende der Reperfusion analysiert. Die Versuchstiere wurden mit 500IU/kg KG oder 5000IU/kg KG Erythropoietin zu Beginn der Ischämie behandelt. Bei einer weiteren Versuchsgruppe erfolgte die Applikation von 5000IU/kg KG Erythropoietin zu Beginn der Reperfusion. Um den Einfluss der Plättchenaggregation in der hepatischen Mikrozirkulation nach I/R zu untersuchen, wurde eine weitere Versuchsgruppe mit 1mg/kg KG ReoPro zu Beginn der Reperfusion behandelt. I/R-Kontrolltiere erhielten ein vergleichbares Volumen an NaCl. Sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrolle.

I/R bewirkte ein signifikantes sinusoidales Perfusionsversagen, eine massive intrahepatische Leukozytenrekrutierung und hepatozelluläre Apoptose. Des Weiteren war durch Ischämie/Reperfusion die hepatozelluläre Integrität stark beeinträchtigt. Die Plasmakonzentration pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  war erhöht. Als Ausdruck der eingeschränkten exkretorischen Funktion der Leber war der Gallefluss deutlich reduziert.

Die Applikation von 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie führte zu einer signifikanten Reduktion des I/R-induzierten sinusoidalen Perfusionsversagens, jedoch zu einer leichten Zunahme der sinusoidalen Leukostase und der venulären Leukozytenadhäsion. Des Weiteren war ein deutlicher Anstieg der hepatozellulären Apoptose zu beobachten. Die I/R-induzierte Beeinträchtigung der exkretorischen Leberfunktion, die inflammatorische Gewebereaktion sowie die zelluläre Desintegrität konnten durch 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie nur gering beeinflusst werden.

Bei Gabe von 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie war eine signifikante Reduktion des sinusoidalen Perfusionsversagens und der sinusoidalen Leukostase zu beobachten. Des Weiteren zeigte sich eine Abnahme der venulären Leukozytenadhäsion sowie der hepatozellulären Apoptose. Der Gallefluss als Maß für die exkretorische Leberfunktion konnte

nicht beeinflusst werden. Als Zeichen einer verbesserten zellulären Integrität war die Plasmakonzentration mitochondrialer Enzyme wie beispielsweise GLDH, die zytoplasmatische Vakuolisierung und Grobscholligkeit sowie die sinusoidale Kongestion reduziert. Die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine im Plasma konnte durch die Gabe von 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie nur leicht verringert werden.

Die Behandlung mit 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion führte zu einer signifikanten Reduktion des I/R-induzierten sinusoidalen Perfusionsversagens, der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung sowie der hepatozellulären Apoptose. Die exkretorische Leberfunktion war nach Behandlung mit 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion normalisiert und die zelluläre Integrität wiederhergestellt. Die Plasmakonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine waren ebenfalls deutlich reduziert.

Die Applikation von 1mg/kg KG ReoPro zu Beginn der Reperfusion bewirkte eine deutliche Reduktion des sinusoidalen Perfusionsversagens sowie der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung. Die I/R-induzierte Einschränkung der exkretorischen Leberfunktion als auch die I/R-induzierte hepatozelluläre Apoptose konnten durch die Behandlung jedoch nicht beeinflusst werden. Ebenso zeigte sich keine Reduktion der Plasma-Enzymaktivitäten von GLDH und der Transaminasen sowie der inflammatorischen Gewebereaktion.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmals, dass Erythropoietin den mikrovaskulären und parenchymatösen Reperfusionsschaden der Leber nach warmer Ischämie/Reperfusion reduziert. Daher könnte Erythropoietin als neuer Therapieansatz zur Prävention des post-ischämischen Organschadens angesehen werden.

## 2 Summary

Microvascular hepatic reperfusion injury and post-ischemic organ dysfunction are the main causes for morbidity and mortality after hepatic ischemia. The objective of the present *in vivo* study was to investigate beneficial effects of recombinant human EPO and ReoPro, a GPIIb/IIIa receptor antibody, on microvascular and parenchymal hepatic ischemia-reperfusion injury.

Pentobarbital sodium anesthetized (50mg/kg bw) female Sprague Dawley rats (250-280g) were laparotomized. Subsequently, warm ischemia of the left liver lobe was induced for 90min, followed by 90min of reperfusion. The hepatic microcirculation was analyzed by means of intravital fluorescence microscopy at the end of reperfusion. Animals were treated either with 500IU or 5000IU/kg bw EPO at the time of induction of ischemia or with 5000IU/kg bw EPO or ReoPro at the time of onset of reperfusion. Saline-treated animals served as ischemic controls, sham-operated animals served as non-ischemic controls.

I/R caused a significant sinusoidal perfusion failure as well as massive sinusoidal leukostasis, venular leukocyte adhesion and hepatocellular apoptosis. The plasma activities of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , was increased. In addition, hepatocellular excretory function was impaired, as indicated by a reduced bile excretion.

Application of 500IU/kg bw EPO at the time of induction of ischemia caused a significant reduction of sinusoidal perfusion failure, while sinusoidal leukostasis and venular leukocyte adhesion were slightly increased. Furthermore, hepatocellular apoptosis was found increased. I/R-induced excretory dysfunction of the liver, leukocytic inflammation and the hepatocellular damage were not influenced by the application of 500IU/kg bw EPO at the time of induction of ischemia.

The application of 5000IU/kg bw EPO at the time of induction of ischemia caused a significant reduction of sinusoidal perfusion failure and sinusoidal leukostasis. Furthermore, 5000IU/kg bw EPO induced a decrease of venular leukocyte adhesion and hepatocellular apoptosis. However, bile excretion was not influenced by EPO. In contrast, cellular integrity was improved, as indicated by decreased plasma concentrations of mitochondrial enzymes, reduced cytoplasmic vacuolization, clod formation and lowered sinusoidal congestion. Finally, the plasma concentrations of proinflammatory cytokines were decreased when 5000IU/kg bw EPO was applied at the time of induction of ischemia.

The application of 5000IU/kg bw EPO at the time of onset of reperfusion caused a significant reduction of the I/R-induced sinusoidal perfusion failure, intrahepatic leukocyte re-

cruitment and hepatocellular apoptosis. The excretory function of the liver and the cellular integrity were normalized after injection of 5000IU/kg bw EPO. In addition the plasma concentrations of proinflammatory cytokines were decreased.

Application of ReoPro reduced sinusoidal perfusion failure as well as intrahepatic leukocyte recruitment. However, ReoPro did not affect I/R-induced hepatic excretory dysfunction and hepatocellular apoptosis. Liver enzyme activities and hepatocellular disintegration were also not affected by ReoPro treatment.

Our results demonstrate for the first time that EPO reduces hepatic microvascular injury after warm I/R and prevents hepatocellular disintegration. Therefore, EPO may represent a novel approach for the prevention and therapy of I/R-induced liver injury and organ dysfunction.

## 3 Einleitung

### 3.1 Ischämie- und Reperfusionsschaden

Der starke Blutverlust während großer Leberoperationen stellt ein erhebliches Risiko der Leberchirurgie dar (FOSTER et al., 1977; KATZ et al., 2009). Daher beschrieb J. Hogarth Pringle 1908 eine Methode zur Limitierung des Blutverlustes bei großen operativen Eingriffen an der Leber, die temporäre Okklusion des *Ligamentum hepatoduodenale*, auch bekannt als Pringle Manöver (PRINGLE JH, 1908). Seither kennzeichnen Phasen von Ischämie und Reperfusion eine Vielzahl von chirurgischen Interventionsverfahren (DELVA et al., 1989; HEIZMANN et al., 2008; HUGUET et al., 1992).

Die Bedeutung einer durch Ischämie und Reperfusion induzierten Organschädigung wurde erstmals 1975 als Symptomenkomplex erkannt (BAUE, 1975). Ebenso beschrieb Toledo-Pereyra im gleichen Jahr im Rahmen von experimentellen Untersuchungen zur Lebertransplantation diese durch eine Phase von Ischämie und Reperfusion induzierte Form der Organschädigung (TOLEDO-PEREYRA et al., 1975).

Eine Reduktion der Leberdurchblutung und die damit verbundene Abnahme der nutritiven Versorgung des Gewebes wird zudem im hämorrhagischen Schock (LINDBERG, 1977; LHUILLIER et al., 2006), während einer Sepsis sowie im septischen Schock (CHAUDRY et al., 1979; SPAPEN, 2008; TOWNSEND et al., 1986) beobachtet.

Während das klinische Outcome bei Nieren- und Lungenversagen durch verbesserte intensivmedizinische Maßnahmen deutlich verbessert werden konnte, stellt die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Leberdysfunktion beziehungsweise das drohende Leberversagen immer noch den limitierenden Faktor des klinischen Verlaufes und somit eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität auf Intensivstationen dar (COHN et al., 1997). Somit ist die Entwicklung neuer Ansätze zur Prävention und Therapie des hepatischen Reperfusionsschadens von hohem aktuellem Interesse.

### 3.2 Pathomechanismen

Eine Einteilung der Ischämie kann in eine warme und in eine kalte Ischämie erfolgen. Kalte Ischämie findet sich im Rahmen der Organkonservierung bei Lebertransplantationen und ist hauptsächlich mit der Schädigung sinusoidaler Endothelzellen assoziiert (IKEDA et al., 1992). Warme Ischämie hingegen kann sowohl im Rahmen von operativen Eingriffen an

der Leber verursacht werden (Pringle-Manöver), als auch als Folge eines hypovolämischen Schocks, bei toxischer Leberschädigung, bei Venenverschluss-Krankheiten sowie beim Budd-Chiari-Syndrom auftreten. Im Gegensatz zur kalten Ischämie schädigt die warme Ischämie vornehmlich Hepatozyten (IKEDA et al., 1992).

In den letzten Jahren wurde die Analyse der dem Reperfusionsschaden zu Grunde liegenden Pathomechanismen und die Entwicklung präventiver und therapeutischer Strategien zum Gegenstand intensiver chirurgischer Forschung.

### **3.2.1 Ischämie**

Ischämie, d.h. die Unterbrechung der nutritiven Versorgung des Gewebes, führt über die resultierende Gewebehypoxie zu einer Unterbrechung der mitochondrialen Atmungskette. Da die oxidative Phosphorylierung somit nicht mehr zur ATP-Synthese beitragen kann, erfolgt eine Umstellung des Stoffwechsels von der aeroben Glykolyse auf die wesentlich ineffizientere anaerobe Glykolyse (CHAUDRY, 1983). Die daraus folgende Depletierung energiereicher Phosphate führt, nachdem auch die vorhandenen ATP Speicher aufgebraucht wurden, zum Erliegen energieabhängiger Transportsysteme wie beispielsweise der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (SILVER, 1977) und zum Anstieg der zytoplasmatischen Natrium-, Calcium-, und Wasserstoffionenkonzentration (BILZER und GERBES, 2000; de GROOT und RAUEN, 2007). Bedingt durch den daraus resultierenden Einstrom von Wasser kommt es letztendlich zur Zellschwellung sowie Einengung der benachbarten Kapillaren innerhalb des ischämischen Gewebes (LEAF, 1973).

Getriggert über die erhöhte intrazelluläre Calciumionenkonzentration erfolgt zudem eine Aktivierung verschiedener calciumsensitiver Enzyme, wie beispielsweise Endonukleasen, Phospholipasen (CHIEN et al., 1978; LIPTON, 1999) und Proteasen (BRONK et al., 1993).

Über den Abbau von rRNA und tRNA führen Endonukleasen zur Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese. Zudem trägt die Aktivierung der Calpaine (calciumabhängige Phospholipasen) über den Abbau von Membranproteinen, wie Spektrin und Filamin, zur Membranstabilität (SAIDO et al., 1994; LIPTON, 1999) und zur Ablösung sinusoidaler Endothelzellen von der perisinusoidalen Matrix bei (CLAVIEN, 1998; KOHLI et al., 1999a). Das gemeinsame Korrelat dieser Prozesse stellt letztendlich die durch Ischämie induzierte Zell- und Organschädigung dar.

### 3.2.2 Reperfusion

Reperfusion, d.h. das Wiedereinsetzen der nutritiven Versorgung des Gewebes nach Ischämie, wurde von Jaeschke in zwei Phasen unterteilt. Die initiale Phase (<2h nach Einsetzen der Reperfusion) ist durch die Entstehung von oxidativem Stress charakterisiert. Die späte Phase (6-48h nach Einsetzen der Reperfusion) ist gekennzeichnet durch die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (JAESCHKE et al., 1990).

Nach Beendigung der Ischämie und Wiederherstellung der Durchblutung des Gewebes wurde zudem eine Progression des ischämischen Schadens der Leber beobachtet. Als zentrale Mechanismen, die zur Progredienz des Ischämieschadens führen, wurden zum einen das Versagen der sinusoidalen Perfusion („no-reflow“-Phänomen) (AMES et al., 1968; MENGER et al., 1999) und zum anderen die ausgeprägte Entzündungsreaktion („reflow-paradox“) (MENGER et al., 1992b; MENGER et al., 1999) beschrieben.

#### 3.2.2.1 *No-reflow*

Als „no-reflow“-Phänomen wird das zu Beginn der Reperfusion auftretende sinusoidale Perfusionsversagen bezeichnet, dessen Ausmaß eine Korrelation mit der Dauer der Ischämie aufweist. Hierdurch erfolgt über die Verlängerung hypoxischer Bedingungen eine zusätzliche Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität sowie eine Störung der Parenchymfunktion (MENGER et al., 1999; VOLLMAR et al., 1994a).

Grundlagen des sinusoidalen Perfusionsversagens nach Beginn der Reperfusion im Rahmen des „no-reflow“-Phänomen sind der Verschluss der Kapillaren durch Mikrothromben (QUINONES-BALDRICH et al., 1991), Leukozyten (SCHMID-SCHÖNBEIN, 1987) beziehungsweise durch geschwollene Endothelzellen (HAMMERSEN et al., 1989; MENGER et al., 1999) sowie die Imbalance zwischen vasokonstringierendem Endothelin-1 und vasodilatierendem Stickstoffmonoxid (CLEMENS et al., 1997; MARZI et al., 1994; MENGER et al., 1999). Weiterhin sind die intravaskuläre Hämokonzentration (MENGER et al., 1988) sowie die durch Zellschwellung bedingte Erhöhung des Widerstandes (MAZZONI et al., 1989) Ursachen, die zum nutritiven Perfusionsversagen beitragen.

### 3.2.2.2 Reflow-paradox

Die durch die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine und die Aktivierung von Kupferzellen induzierte Entzündungsreaktion trägt neben dem sinusoidalen Perfusionsversagen zusätzlich zur Progredienz des Ischämieschadens während der Reperfusionphase bei. Die Aktivierung von Kupferzellen erfolgt zum einen durch Hypoxie mit nachfolgender Reoxygenierung (RYMSA et al., 1991) und zum anderen über die Aktivierung von Komplementfaktoren (JAESCHKE et al., 1993). Jaeschke und Mitarbeiter konnten zeigen, dass aktivierte Kupferzellen von wesentlicher Bedeutung für die Entstehung des frühen Reperfusionsschadens sind (JAESCHKE et al., 1991), da sie zum einen für die Induktion von oxidativem Stress und die Synthese von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) (ZHANG et al., 2007), aber auch für Rekrutierung und Priming neutrophiler Granulozyten notwendig sind (McCord, 1985; Menger et al., 1999). Die von Kupferzellen synthetisierten ROS führen zum einen über die Induktion der Lipid-Peroxidation zur direkten (MATHEWS et al., 1994) und über die Beeinflussung verschiedener Signaltransduktionsprozesse zur indirekten Zell- und Gewebsschädigung (ATALLA et al., 1985). In verschiedenen experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ROS zur Förderung der Sekretion des Plättchenaktivierenden Faktors (PAF) (COOPER et al., 2002; ZHOU et al., 1992) sowie von pro-inflammatorischen Zytokinen (LE MOINE et al., 1997) durch Endothelzellen und Monozyten beitragen. Des Weiteren erfolgt eine ROS-induzierte Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 in Endothelzellen und Hepatozyten (COOPER et al., 2002; ESSANI et al., 1996).

TNF- $\alpha$  stellt einen zentralen Mediator der inflammatorischen Reaktion nach I/R dar. Neben der Synthese weiterer pro-inflammatorischer Mediatoren führt TNF- $\alpha$  zur Aktivierung von Endothelzellen und induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf deren Oberfläche (VERRIER, 1996). Zudem erfolgt eine Stimulation der Synthese von CXC-Chemokinen, die zur Chemotaxis neutrophiler Granulozyten beitragen (LUSTER, 1998). Diese, in der Spätphase der Reperfusion stattfindende Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bestimmt letztendlich das Ausmaß des Reperfusionsschadens.

Durch intravitalmikroskopische Untersuchungen konnten drei verschiedene Phasen der leukozytären Interaktion an venulären Endothelzellen identifiziert werden (Menger et al., 1992b). Innerhalb der ersten 10 Minuten der Reperfusion kommt es in Folge der gesteigerten Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche von Endothelzellen zu einem langsamen „Rolling“ neutrophiler Granulozyten entlang des Endothels (KUBES et al., 1995). Getriggert über diese Interaktion folgt durch Integrine, die auf der Zelloberfläche der Granulozyten exprimiert werden, und Immunglobuline auf der Zelloberfläche der Endothelzellen die feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel (YADAV et al., 1998). Über einen chemokinvermittel-

ten Gradienten kommt es letztendlich zur Transmigration der Leukozyten durch das Endothel ins Gewebe (JAESCHKE, 2006). Durch die Synthese und Freisetzung von Oxidantien und Proteasen durch die extravasierten und infiltrierten Leukozyten erfolgt somit eine weitere Schädigung des Gewebes.

Zusammenfassend führt das Reflow-Paradox, getriggert über die Aktivierung von Kupferzellen und die Akkumulation neutrophiler Granulozyten, zur Membrandesintegration, zum Verlust der endothelialen Integrität, zur Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität und letztendlich zum Tod der Zellen sowie zur Schädigung des Gewebes (MENGER et al., 1992b; MENGER et al., 1999).

### 3.3 Hepatische Mikrozirkulation

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan. In der Fetalperiode ist sie an der Blutbildung und als exokrine Drüse an der Synthese von Plasmaproteinen sowie an der Galleproduktion beteiligt. Das Lebergewebe setzt sich zu etwa 80% aus Parenchymzellen, zu 16% aus Zellen des retikuloendothelialen Systems, den Kupferzellen und Endothelzellen, sowie zu 4% aus sonstigen Zellen, wie den Vitamin A-speichernden Ito-Zellen, zusammen.

Die Mikroarchitektur der Leber weist einige Besonderheiten auf. Als funktionelle Baueinheit der Leber gilt der Lobulus (RAPPAPORT et al., 1954). Der an der Grenze zweier Lobuli befindliche Bindegewebsspalt wird als periportales Feld (Glisson-Dreieck) bezeichnet. Dort befinden sich als sogenannte Glisson-Trias die *A. und V. interlobularis* sowie der *Ductus interlobularis*. Die Lebersinusoiden sind radiär angeordnet und streben den *Venae centrales* zu. Sie sind durchschnittlich weniger als 300µm lang und mit 6-15µm Durchmesser im Vergleich zum Kapillarsystem anderer Organe besonders weit. Sie werden von einer fenestrierten Endothel ohne Basalmembran ausgekleidet, was dem intensiven Stoffaustausch zwischen sinusoidalem Blut und Leberparenchym dient (McCUSKEY et al., 1983). Im Endothelverband liegen in das Lumen der Sinusoide hineinragende Kupferzellen. Zwischen Endothel- und Parenchymzellen befindet sich der sogenannte perisinusoidale Dissé-Raum, der Blutplasma enthält. In diesen Raum ragen Mikrovilli der Hepatozyten hinein, was die Grenzfläche zwischen Hepatozyten und Blutplasma vervielfacht. Weiterhin befinden sich im Dissé-Raum Fibroblasten und Vitamin A-speichernde Itozellen. Entsprechend einem Gradienten, der die unterschiedliche Stoffwechsel-, Speicher- und Syntheseleistungen sowie Enzymausstattungen und Entgiftungsfunktion entlang der Lebersinusoiden kennzeichnet, lässt sich der Lobulus in eine periportale, midzonale und perizentrale Zone einteilen (RAPPAPORT, 1973).

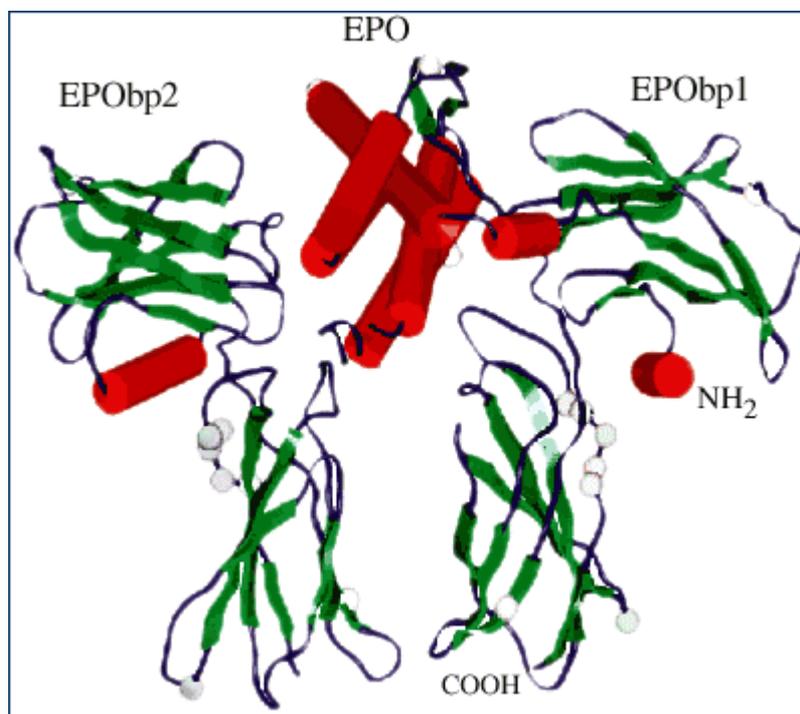
Im periportalen Segment zeigen die Sinusoide einen geringeren Durchmesser und eine stärkere Tortuosität als in den folgenden Segmenten. Außerdem zeigt sich von periportal nach perizentral hin ein Zusammenfließen von Sinusoiden, wodurch die Gesamtzahl sinusoidaler Segmente entlang der zonalen Unterteilung des Lobulus abnimmt, der Blutfluss und die Strömungsgeschwindigkeit in den einzelnen Sinusoiden hingegen zunimmt (KOMATSU et al., 1990). Die Blutzufuhr der Leber erfolgt zum einen über die *Arteria hepatica*, die arterielles Blut enthält und für 20% des hepatischen Blutflusses verantwortlich ist, und zum anderen über die *Vena portae*, die für 80% des hepatischen Blutflusses und für die Drainage des Splanchnikusgebietes verantwortlich ist. Obwohl die Leber durch diese duale Blutversorgung wie auch über die Speicherung von Glykogen als Ausgangssubstanz des anaeroben Stoffwechsels vor einer mangelnden Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff geschützt ist, entsteht im Rahmen von Ischämie ein hypoxischer Zellschaden (Nekrose), der sich entlang des Sauerstoffkonzentrationsgradienten von periportal nach perizentral manifestiert und aggraviert (LEMASTERS et al., 1981).

### 3.4 Erythropoietin

Jourdanet beschrieb 1863 im Rahmen von Untersuchungen des Hämatokrits indirekt den Zusammenhang zwischen einem erniedrigten Sauerstoffpartialdruck und der Erhöhung der Erythrozytenzahl. Der direkte Zusammenhang wurde 1903 von Miescher hergestellt. 1906 wurde erstmals die Hypothese aufgestellt, dass die Regulation der Blutbildung innerhalb des Knochenmarks über einen humoralen Faktor erfolgt (CARNOT und DEFLANDRE, 1906), dem Bonsdorff und Jalavist 1948 den Namen Erythropoietin gaben (BONSDORFF und JALAVIST, 1948). Das Hormon selbst wurde 1953 von Erslev entdeckt (ERSLEV, 1953). Jacobson konnte später durch seine Untersuchungen nachweisen, dass sich der Synthesort des Hormons in der Niere befindet (JACOBSON et al., 1957).

Spätere Untersuchungen zeigten zudem, dass in der Fetalperiode die Produktion des Hormons durch die Hepatozyten erfolgt, und postnatal die Synthese durch Endothelzellen der peritubulären Kapillaren im Bereich der Nierenrinde übernommen wird (BACHMANN et al., 1993; MAXWELL et al., 1997). Kleine Mengen der mRNA des Hormons konnten zudem auch postnatal innerhalb des Leberparenchyms nachgewiesen werden. Eine weitere Syntheseaktivität ist auch in Milz, Lunge, Hoden und Gehirn zu finden (TAN et al., 1992). Die Abnahme des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes stellt den Hauptstimulus für die Erythropoietin-Synthese dar (JELKMANN, 1992).

Erythropoietin gehört zur Klasse 1 der Zytokine und besteht aus 4  $\alpha$ -helikalen Ketten (ELLIOTT et al. 1997; WEN et al., 1994). Sein Molekulargewicht beträgt 30.4kDa (DAVIS et al., 1987). Die Einheit, in der Erythropoietin angegeben wird, sind internationale Units (IU) als Maß für die biologische Aktivität *in vivo* (ANNABLE et al., 1972).



**Abbildung 1:** Struktur des Erythropoietin-(EPObp)<sub>2</sub> Komplexes; Alpha-Helices sind als rote Zylinder dargestellt und die  $\beta$ -Ketten als grüne Bänder; Quelle: <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?job=download&pdbid=1BLW&page=&pid=16598933129255Crystal>

Innerhalb des Knochenmarks bindet das Hormon an seinen Rezeptor auf der Oberfläche von Erythroblasten. Dieser Erythropoietin-Rezeptor, ein Aminosäure-Glykoprotein, gehört zur Familie der Zytokin-Rezeptoren (Zytokin-Klasse 1), deren strukturelle Gemeinsamkeiten in zwei oder mehr Immunglobulin-ähnlichen Domänen, vier gleich angeordneten Cystein-Resten und der extrazellulären Sequenz WSXWS bestehen. Zudem besteht der Rezeptor aus einer extrazellulären Domäne, einem hydrophoben transmembranären Anteil sowie einer variablen zytoplasmatischen Domäne (YOUSSOUFIAN et al., 1993). Die mRNA des Rezeptors wurde in Endothelzellen (ANAGNOSTOU et al., 1994), in Perikard und Epikard (WU et al., 1999), in renalen Mesangium- und Epithelzellen (WESTENFELDER et al., 1999), in den Inselzellen des Pankreas (FENJVES et al., 2003), in der Plazenta (SAWYER et al., 1989) und innerhalb bestimmter Gehirnareale identifiziert (LIU et al., 1997). Die Bindung von Erythropoietin an seinen Rezeptor führt zu dessen Homodimerisierung, wodurch

die Aktivierung der an eine intrazelluläre Domäne des Erythropoietin-Rezeptors gebundenen Janus Kinase 2 (JAK 2) über eine Transphosphorylierung stattfindet. Die anschließende Phosphorylierung zahlreicher Thyrosinreste des Rezeptors durch JAK 2 schafft letztendlich die Voraussetzung für die Interaktion des Rezeptors mit verschiedenen, an der Signaltransduktion beteiligten intrazellulären Proteinen (WITTHUHN et al., 1993).

Die Pionierarbeit auf dem Gebiet der rekombinanten Herstellung des Hormons wurde von Miyake geleistet. Aus Urin von Patienten mit aplastischer Anämie erfolgte erstmalig die Isolierung und Reinigung von Erythropoietin (MIYAKE et al., 1977). Des Weiteren gelang mit Hilfe des gewonnenen Materials die teilweise Aufschlüsselung der Aminosäuresequenz des Hormons. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Gen des menschlichen Erythropoietins identifiziert (JACOBS et al., 1985; LEE-HUANG, 1984; LIN et al., 1985) und somit die Basis für die industrielle Herstellung von rekombinantem Erythropoietin geschaffen.

Durch seine Wirkung auf die Erythropoese fand Erythropoietin zudem Verwendung im Leistungssport. Seit Ende der 80-er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurde das Hormon zur Steigerung der Leistungsfähigkeit von Spitzensportlern missbraucht. Allerdings kam es, hervorgerufen durch die von Erythropoietin induzierte Erythropoese und dem damit verbundenen Anstieg des Hämatokritwertes, zu zahlreichen Todesfällen. Somit wurde der Missbrauch von Erythropoietin als Ursache für den Tod von 18 professionellen Radfahrern angegeben. Ursächlich ist eine Überschreitung des Hämatokritwertes von 50% und die daraus resultierende Erhöhung der Blutviskosität sowie des kardialen Afterloads. Bedingt durch die Stase des Blutflusses innerhalb der Kapillaren erfolgt schließlich eine Erhöhung des Risikos für thrombotische und embolische Ereignisse, wie beispielsweise Myokardinfarkt, periphere Venenthrombose und Lungenembolie. Im Jahre 1990 wurde Erythropoietin in die Dopingliste der internationalen Anti-Doping-Organisation WADA aufgenommen. Seit 2000 ist mit Hilfe eines mehrstufigen Testverfahrens der Nachweis von rekombinantem Erythropoietin in Urinproben möglich (LASNE und de CEARRIZ, 2000).

Experimentelle Studien konnten zudem zeigen, dass EPO neben seinen bekannten hämatopoetischen Wirkungen auch über anti-inflammatorische (AGNELLO et al., 2002) und anti-apoptotische Wirkungen (NISHIYA et al., 2006) verfügt. Eine EPO-vermittelte Reduktion des Reperfusionsschadens konnte bislang an Herz (CAI et al., 2003), Gehirn (BRINES et al., 2000) und Niere (JUNK et al., 2002) nachgewiesen werden. Erklärungsansätze für diese Protektion wurden zum einen in der Verminderung der Apoptosehäufigkeit (CAI et al., 2003), aber auch in der Induktion des Hitzeschockproteins HSP 70 (YANG et al., 2003) gesucht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Erythropoietin zu einer Verminderung der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine führt, und die Anhäufung inflam-

matorischer Zellen in der Region des Gewebeschadens vermindert wird (VILLA et al., 2003). Zudem wurde Erythropoietin eine Beeinflussung intrazellulärer Signaltransduktionswege unter Beteiligung von NF- $\kappa$ B und dem Aktivator-Protein AP-1 zugeschrieben (BERGELSON et al., 1998; BITTDORF et al., 2001).

### 3.5 Abciximab (ReoPro<sup>®</sup>)

Ein zentraler Mechanismus der primären Hämostase sowie in der Entstehung thrombotischer Prozesse stellt die Aggregation von Thrombozyten dar. Thrombozyten sind zellkernlos, von diskoider Form, besitzen einen Durchmesser von 2.5-5 $\mu$ m und haben eine Lebensdauer von 8-10 Tagen. Ihre Aktivierung erfolgt durch den Kontakt mit ADP, Thrombin oder Kollagen und stellt den Ausgangspunkt der Thrombusbildung dar.

Der auf der Zelloberfläche aktivierter Thrombozyten exprimierte GPIIb/IIIa Rezeptor ist für die Thrombozytenaggregation von zentraler Bedeutung. Patienten mit einer Thrombasthenie Glanzmann, einer seltenen autosomal-rezessiv erblichen hämorrhagischen Diathese, weisen trotz normaler Thrombozytenzahlen eine verlängerte Blutungszeit auf, bedingt durch das Fehlen beziehungsweise die Dysfunktion des GPIIb/IIIa Rezeptors (PHILLIPS et al., 1977; PHILLIPS et al., 1991).

Dieser GPIIb/IIIa Rezeptor besteht aus dem Glykoprotein IIb, welches sich wiederum aus den durch zwei Disulfidbrücken verbundenen Untereinheiten GPIIb $\alpha$  und GPIIb $\beta$  zusammensetzt, sowie dem Glykoprotein IIIa. Im Gegensatz zum GPIIb-Komplex besteht der GPIIIa-Komplex nur aus einer Polypeptidkette, in der Kettenbereiche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (FITZGERALD et al., 1985; JENNINGS und PHILLIPS, 1982; McEVER et al., 1982). GPIIb/IIIa gehört aufgrund seiner Tertiärstruktur in die Kategorie der Integrine (HYNES, 1987).

Die inaktive Form des Rezeptors befindet sich auf der Zelloberfläche inaktiver Thrombozyten. Bei einer Aktivierung erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors in eine ligandenempfindliche Form mit einer Bindungsstelle für Fibrinogen (GUGLER und LÜSCHER, 1965; WEISS et al., 1971), Fibronectin und den von Willebrand Faktor (RUGGERI et al., 1983; GRALNICK et al., 1984; PYTELA et al., 1986), die über eine Arginin-Glycin-Aspartat (RGD)-Sequenz an den Rezeptor binden. Zusätzlich werden weitere Bindungsstellen für Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) enthaltende extrazelluläre Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert. Auf der Zelloberfläche eines Thrombozyten befinden sich 50000 bis 80000 GPIIb/IIIa Rezeptoren (PHILLIPS et al., 1988).

Aufgrund der zentralen Bedeutung von GPIIb/IIIa für die Thrombozytenaggregation und die kritische Implikation bei thrombotischen und embolischen Ereignissen kam es zur Entwicklung eines inhibierenden Antikörpers gegen den GPIIb/IIIa Rezeptor. Der erste GPIIb/IIIa Antagonist, der in klinischen Untersuchungen angewendet wurde, war der monoklonale Antikörper 7E3, der durch die Immunisierung einer Maus mit menschlichen Thrombozyten hergestellt wurde. Collier belegte, dass dieser Antikörper die Thrombozytenaggregation in Folge der Inhibierung der Fibrinogenbindung an den GPIIb/IIIa Rezeptor verhindern konnte (COLLIER et al., 1983).

Abciximab, dessen Bestandteil Fab-Chimere sind, kam 1994 auf den amerikanischen Markt (ReoPro, Centocor, Malvern, PA, U.S.A. und Eli Lilly, Indianapolis, IN, U.S.A.). Es verfügt über eine biologische Halbwertszeit von 12 Stunden und bindet mit hoher Affinität an die  $\beta$ 3-Untereinheit des GPIIb/IIIa Rezeptors der Thrombozyten (CRENSHAW et al., 1995; MASCELLI et al., 1998). Die Zusammensetzung der Fab-Chimere erfolgt aus der variablen Region der Fab-Komponente des Mäuse-7E3-Antikörpers sowie der konstanten Region des menschlichen Immunglobulin G Fab.

Die Blockade von GPIIb/IIIa stellt die effektivste Inhibition der Thrombozytenaggregation dar (DANGAS et al., 1998). Abciximab erhielt seine Zulassung zur Anwendung im Rahmen einer perkutanen Koronarintervention bei Hochrisikopatienten zur Vermeidung ischämischer Komplikationen sowie zur Anwendung bei Patienten mit instabiler Angina pectoris, die auf konventionelle Therapiemethoden nicht ansprechen und bei denen daher eine perkutane Koronarintervention innerhalb der nächsten 24 Stunden geplant ist. Blutungskomplikationen, Thrombopenie sowie allergische Reaktionen gegen Antikörperfragmente gehören zu den häufigsten Nebenwirkungen im Rahmen der Behandlung mit Abciximab.

Die von Baekström 1971 beschriebene Obstruktion der Kapillaren des Skelettmuskels durch Mikrothromben machte erstmals eine I/R-induzierte Thrombozytenaggregation für den Ausfall der Mikrozirkulation verantwortlich (BAECKSTROEM et al., 1971). In der Zwischenzeit wurde die Thrombozytenaggregation als Hauptursache für das „no-reflow“ kontrovers diskutiert. Durch die Applikation des inhibierenden GPIIb/IIIa-Antikörpers ReoPro sollte in dieser Studie die Thrombozytenaggregation verhindert und deren Einfluss auf den Reperfusionsschaden der Leber untersucht werden.

## 4 Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, in einer experimentellen *in vivo* Studie an der Ratte zu untersuchen, inwieweit die Applikation von EPO zu unterschiedlichen Versuchszeitpunkten und in verschiedenen Konzentrationen den mikrovaskulären und parenchymatösen Reperfusionsschaden der Leber beeinflussen kann. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Gabe des GPIIb/IIIa Antagonisten ReoPro (Abciximab, Centocor B.v., Leiden, The Netherlands; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN 46285) zur Reduktion des I/R-induzierten Gewebeschadens beitragen kann. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann das sinusoidale Perfusionsversagen reduziert und somit die Mikrozirkulation der Leber verbessert werden?
2. Ist es möglich die I/R-bedingte Beeinträchtigung der exkretorischen Leberfunktion und die Alteration der Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen zu normalisieren?
3. Inwieweit kann die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität verhindert werden?
4. Kann die Ischämie/Reperfusion-induzierte inflammatorische Reaktion reduziert oder gar verhindert werden?
5. Welche Mechanismen liegen einer gegebenenfalls erzielten Gewebeprotektion zu Grunde?

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Versuchstiere

Sämtliche Versuche wurden an weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht (KG) von 220–280g durchgeführt. Die Tiere entstammten einer Zucht (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und wurden bis zum Beginn der Untersuchungen in einem klimatisierten Raum (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit: ca. 60%) der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar bei einem 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus und unter der Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) gehalten. Die Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch die lokale Tierschutzbehörde, das Landratsamt der Stadt Homburg/Saar genehmigt. Die zuständige Tierschutzbeauftragte war Frau Dr. med. vet. M. Frings.

### 5.2 Modell

#### 5.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation

Zu Beginn der Versuche wurden die Tiere mit Pentobarbital (50mg/kg KG i.p., Narcoren, Merial, Deutschland) anästhesiert. Mit einem Elektrorasierer (Electra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) wurden im Anschluss die Tiere am Hals und am Bauch rasiert.

Für die chirurgische Präparation wurden die Versuchstiere auf einer Metallplatte (Fa. Effenberger, Pfaffing, Deutschland) in Rückenlage fixiert. Eine integrierte Wärmequelle ermöglichte es, die Körpertemperatur der Tiere über die Versuchsdauer zwischen 36–37°C konstant zu halten.

Zur Erleichterung der Spontanatmung der Tiere wurde zu Beginn der Präparation eine Tracheotomie durchgeführt, ein Polyäthylenkatheter (Portex Polythene Tubing, Innendurchmesser 1.67mm, Außendurchmesser 2.42mm, Portex Ltd., Hythe, GB) in die Trachea eingelegt und durch Seidenfäden fixiert. Im Anschluss wurde nach stumpfer Präparation paratracheal die *Arteria carotis communis sinistra* dargestellt und mit Seidenfäden angeschlossen. Durch eine Inzision der Arterienwand wurde ein Polyäthylenkatheter (PE-50, Innendurch-

messer 0.58mm, Außendurchmesser 0.96mm) im Gefäßlumen platziert und durch die vorgelegten Seidenfäden fixiert. Dieser Katheter wurde über einen Dreiwegehahn an einen Druckabnehmer (Statham Typ P 23 ID, Gould Inc., Oxnard, California, USA) angeschlossen und diente zur Bestimmung von Herzfrequenz und mittlerem arteriellen Blutdruck sowie zur Durchführung von Blutbild-Bestimmungen und arteriellen Blutgasanalysen und der Applikation von Fluoreszein-markierten Latex-Partikeln.

Im Anschluss daran wurde ein weiterer Hautschnitt im Bereich der rechten *Fossa supraclavicularis* durchgeführt, die *Vena jugularis externa* dargestellt und mit Seidenfäden angeschlossen. Nach Inzision der Gefäßwand wurde ein Polyäthylenkatheter (PE-50) in dem Gefäßlumen platziert und fixiert. Über diesen Katheter erfolgte sowohl die Applikation von Farbstoffen als auch von Erythropoietin und ReoPro. Um die *Perspiratio insensibilis* der Tiere auszugleichen, wurden mittels eines Perfusors (Perfusor® ED 1-300, B Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 3ml/h 0.9%-iger NaCl-Lösung (B. Braun) kontinuierlich über den venösen Zugang infundiert.

Nach medianer Laparotomie und Thermokoagulation blutender Gefäße mit Hilfe eines bipolaren Elektrokoagulators (F.L. FISCHER Bipolator 50) wurden die „U“-förmigen Lappen der Bauchwand cranialwärts mit an Magnetclips befestigten Haken fixiert. Danach wurden die Haltebänder der Leber zum Diaphragma und Retroperitoneum hin durchtrennt.

Im Anschluss daran wurde der *Ductus choledochus* dargestellt, mit Seidenfäden angeschlossen und mit einem Polyäthylenkatheter (PE-50) kanüliert. Über diesen Katheter wurde kontinuierlich der gesamtheptische Gallefluss gemessen.

Um eine Austrocknung und Auskühlung der Baueingeweide zu vermeiden, wurde das gesamte Intestinum mit einer feuchten Mullkompressen abgedeckt und regelmäßig mit 37°C warmer 0.9%-iger Kochsalzlösung superfundiert. Zum Schutz der Leber vor Austrocknung und dem Einfluss des atmosphärischen Sauerstoffs wurde die Leberoberfläche mit einer Sauerstoff-impermeablen Folie abgedeckt und ebenfalls mit 37°C warmer Kochsalzlösung regelmäßig gespült.

### **5.2.2 Ischämie und Reperfusion (I/R) des linken Leberlappens**

Mit Hilfe eines Yasargil-Gefäßclips (Yasargil-Clip, Verschlusskraft 0.39-0.49N; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) wurde der Pedikel des linken Leberlappens abgeklemmt und eine selektive Ischämie des linken Leberlappens induziert. Die richtige Positionierung des Clips konnte durch ein sofortiges Abblassen des gesamten linken Leberlappens verifiziert werden. Die Reperfusion der Leber wurde nach 90-minütiger Ischämie durch Entfernen des Gefäßclips eingeleitet.

### **5.2.3 Mikrozirkulationsmodell der Leber**

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation wurde die Metallplatte um 45° in der Längsachse nach links ge neigt. Der linke Leberlappen (LL) wurde zur Ausschaltung von Atemexkursionen auf einen Mikromanipulator ausgelagert und horizontal unter dem intravitalen Mikroskop (IVM) positioniert, mit Kochsalzlösung benetzt und mit einem Deckglas (24x32mm) abgedeckt. Hierdurch war unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die Visualisierung einer Fläche von etwa 2x3cm möglich, welche morphologisch circa 2000 Leberazini entspricht.

## **5.3 Untersuchungstechniken**

### **5.3.1 Makrohämodynamik**

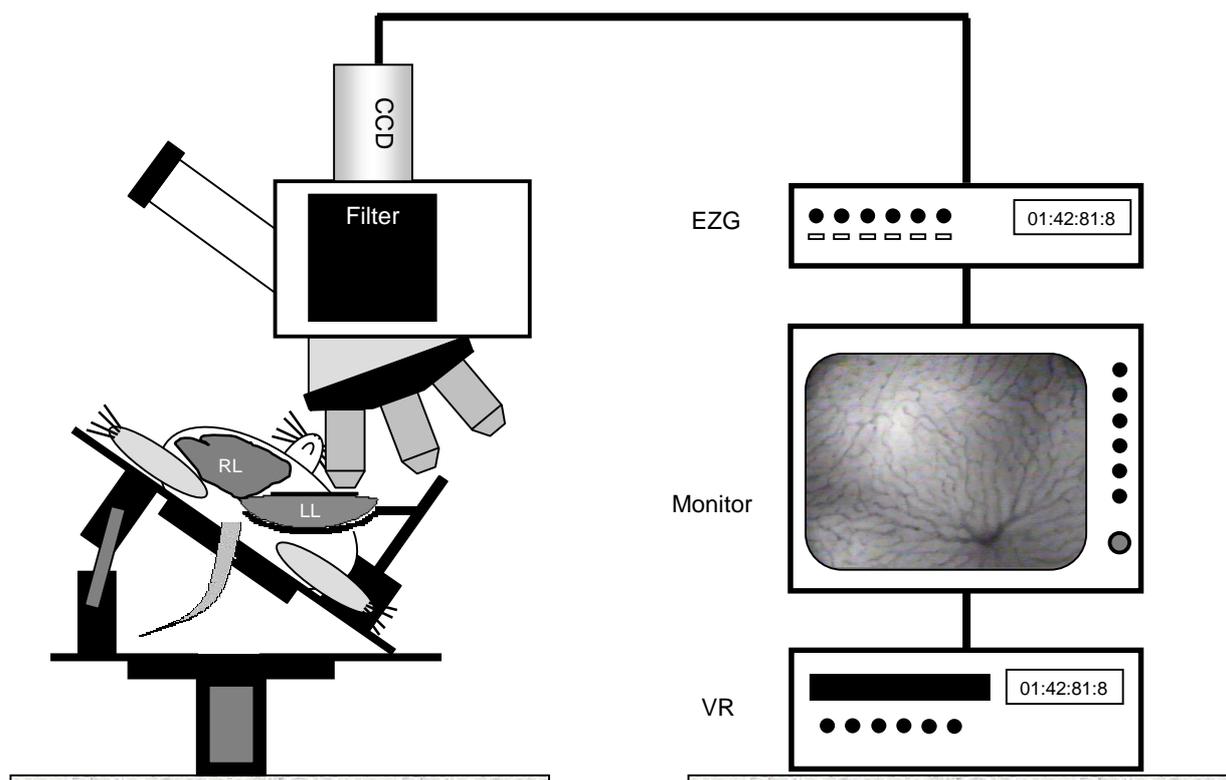
Der arterielle Blutdruck wurde vom Katheter in der *Arteria carotis communis* über einen Dreivegehahn auf einen Druckwandler (Statham DTX/Plus, Ohmeda, Erlangen, Deutschland) übertragen, von Vorverstärkern aufgenommen, analog (Hellige, Freiburg, Deutschland) angezeigt und kontinuierlich aufgezeichnet. Die Herzfrequenz der Versuchstiere wurde durch die kontinuierliche Registrierung der arteriellen Blutdruckamplituden über einen bestimmten Zeitraum ermittelt.

### **5.3.2 Mikrozirkulation**

Zur Untersuchung der Mikrozirkulation wurde als Methode die intravitale Fluoreszenzmikroskopie gewählt (MENGER et al., 1991). Diese direkte Methode erlaubt die Darstellung individueller Segmente der Leber sowie die quantitative Analyse verschiedener mikrohämodynamischer Parameter, die Untersuchung der Heterogenität mikrovaskulärer Flussphänomene sowie die Analyse dynamischer Prozesse.

### 5.3.3 Intravitale Mikroskopie

Die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation erfolgte unter Verwendung eines modifizierten Zeiss-Axiotech-Mikroskops mit einer 100W Quecksilberlampe (HB0) (Axio Tech Vario, Zeiss, Jena, Deutschland) in Epi-Illuminations-Technik. Die in den Strahlengang eingebrachten Filterblöcke erlaubten die Selektion von Licht bestimmter Wellenlänge und eine Filterung des emittierten Lichts. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden von einer CCD Videokamera (FK 6900B, COHN, Prospective Meagurements Inc., San Diego, CA, USA) aufgezeichnet und nach Zwischenschaltung eines Videozeitgenerators (EZG) (VtG 33; FOR.A Company Ltd.Tokyo, Japan) auf ein 1/2 Zoll Videobandgerät (VR) (Sony-U-matic, VO-5800PS; Sony GmbH, München, Deutschland) übertragen und auf einem 14" Monitor angezeigt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Aufbaus des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes. Die Versuchsanordnung umfasst ein Mikroskop mit CCD-Kamera, unter das der linke Leberlappen (LL) ausgelagert ist. Die Kamera ist über einen Echtzeitgenerator an einen Monitor mit Videorecorder angeschlossen. RL = rechter Leberlappen, CCD = CCD-Videokamera, EZG = Echtzeitgenerator, VR = S-VHS-Videorecorder.

Für die Analyse der hepatischen Mikrozirkulation wurde ein 20x Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss Achroplan x20/0.75W) verwendet. Mit diesem System wurde eine Gesamtvergrößerung von x465 erzielt.

### **5.3.4 Mikrozirkulatorische Parameter**

Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie war es möglich, das sinusoidale Perfusionsversagen sowie die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen innerhalb der Sinusoide als auch innerhalb der Venulen vor beziehungsweise nach einer 90-minütigen Ischämiephase zu analysieren. Die quantitative Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter erfolgte nach Abschluss des Versuchs „off-line“ an einer computergestützten Auswerteeinheit (Cap Image, Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

#### **5.3.4.1 Sinusoidales Perfusionsversagen**

Zur Bestimmung des sinusoidalen Perfusionsversagens wurde Natrium-Fluoreszein (2µmol/kg KG; Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Kontrastverstärkung intravenös injiziert. In Blaulicht-Epi-Illumination (Exzitations-/Emissions-Wellenlänge: 450-490nm/>520nm) wurden randomisiert 12 Lobuli ausgewählt und deren Perfusion über einen Zeitraum von 20 Sekunden aufgezeichnet. Eine auf den Bildschirm aufgelegte Schablone unterteilte den jeweiligen Lobulus in eine periportale, midzonale und perizentrale Zone (RAPPAPORT, 1973). Innerhalb der midzonalen Zone wurde die Anzahl der nicht-perfundierten Sinusoide sowie die Gesamtzahl der in dieser Zone vorhandenen Sinusoide bestimmt. Als perfundiert galten Sinusoide, die sichtbar von Erythrozyten durchflossen wurden. Das sinusoidale Perfusionsversagen wurde als Quotient der Anzahl nicht-perfundierter Sinusoide bezogen auf alle sichtbaren Sinusoide errechnet und in Prozent angegeben (Abb. 3A).

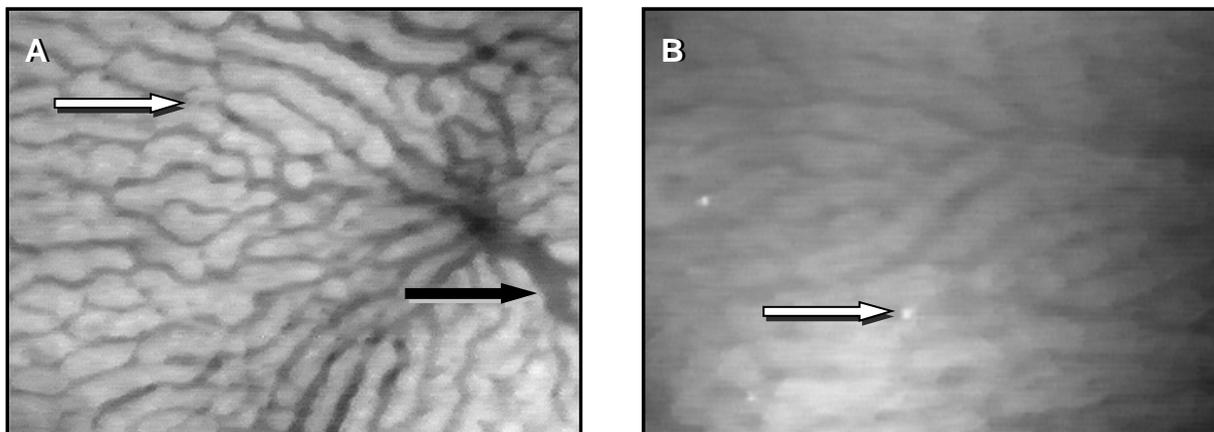
#### **5.3.4.2 Sinusoidale Leukostase und venuläre Leukozytenadhäsion**

Zur Quantifizierung der Leukozytenstase innerhalb der Lebersinusoide sowie der Adhäsion innerhalb der postsinusoidalen Venulen wurde zur *in vivo*-Färbung von Leukozyten Rhodamin 6G (1µmol/kg KG; Merck, Darmstadt, Deutschland) intravenös injiziert. In Grün-

licht-Epi-Illumination (590-560nm/>580nm) wurden zur Bestimmung der Leukozytenstase über einen Zeitraum von je 30 Sekunden randomisiert 12 Lobuli aufgezeichnet. Um die Leukozytenstase innerhalb der Lobuli zu quantifizieren, wurden die durch Schablonen begrenzten Lobuli in eine periportale, midzonale und perizentrale Zone unterteilt. Als stagnierend galten Leukozyten, die sich in einem Zeitraum von 30 Sekunden nicht bewegten. Die Anzahl der stagnierenden Leukozyten wurde innerhalb der entsprechenden Zonen gezählt, zusätzlich wurde die Gesamtzahl der Leukozyten innerhalb des betrachteten Lobulus erhoben (Abb. 3B). Des Weiteren wurden Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in 7 postsinusoidalen Venulen quantifiziert. Über einen Gefäßabschnitt von 100µm Länge (L) wurde die Anzahl der adhärenenten Leukozyten bestimmt. Die venuläre Leukozyten-Adhärenz wurde als Anzahl adhärenenten Leukozyten pro mm<sup>2</sup> Endotheloberfläche angegeben. Die Endotheloberfläche (A) wurde nach Messung des Gefäßdurchmessers (D) (CapImage, Zeintl, Heidelberg, Deutschland) mit Hilfe der Formel

$$A = \pi \times D \times L$$

unter Annahme einer zylindrischen Geometrie des betrachteten Gefäßsegmentes berechnet.



**Abbildung 3:** Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der hepatischen Mikrozirkulation im Blau-Filter nach 90-minütiger Reperfusion im Natrium-Fluoreszein Kontrast. Darstellung des sinusoidalen Perfusionsversagens (weißer Pfeil) sowie einer postsinusoidalen Venule (schwarzer Pfeil; **A**). Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der hepatischen Mikrozirkulation im Grün-Filter nach 90-minütiger Reperfusion nach i.v.-Injektion von Rhodamin 6G. Es stellen sich gefärbte Leukozyten (weißer Pfeil; **B**) in hepatischen Sinusoiden dar. Vergrößerung x465.

### **5.3.4.3 Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit**

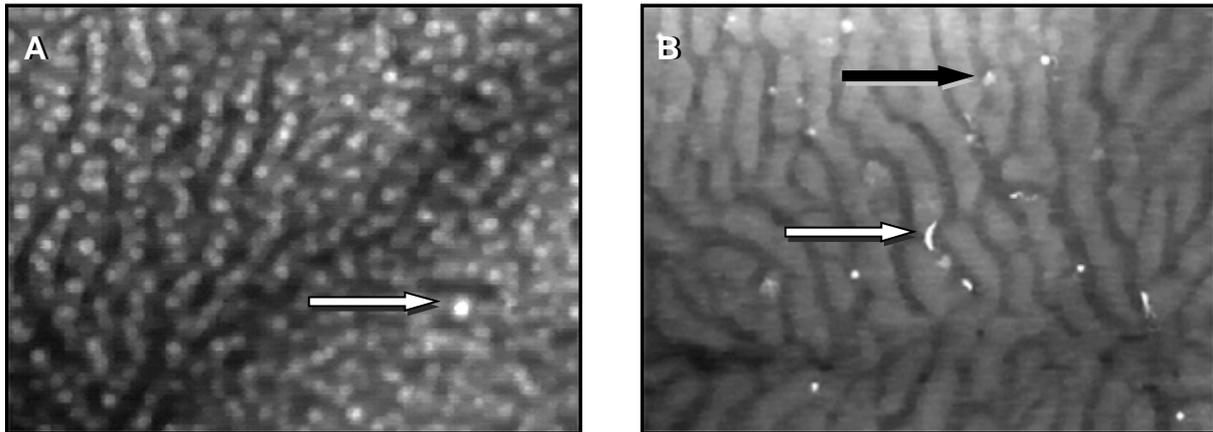
Die Messung der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit erfolgte zeitversetzt „off-line“ mit Hilfe der Software CapImage. Eine virtuelle Linie von 100µm Länge wurde in die Mitte der auf Videokassette aufgenommenen postsinusoidalen Venulen hineingelegt. Computer-assistiert erfolgte die Bestimmung der Geschwindigkeit an der Linie vorbeifließender Erythrozyten mit Hilfe der line-shift Technik. Die venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit wird in mm/s angegeben.

### **5.3.4.4 Hepatozelluläre Apoptose**

Zur Quantifizierung der Apoptoserate wurde dem Tier Bisbenzimid H33342 (2µmol/kg, Sigma, Deutschland) injiziert. Im UV-Filter (330-380nm/>415nm) wurden randomisiert 7 Lobuli ausgewählt und die Anzahl der sichtbaren Apoptosen innerhalb der periportal, midzonalen und perizentralen Zone anhand typischer Apoptose-assoziiierter morphologischer Veränderungen wie Kondensation, Fragmentation und halbmondförmiger Formation des Chromatins bestimmt. Zusätzlich wurde die Gesamtzahl der Apoptosen innerhalb des betrachteten Lobulus errechnet (Abb. 4A).

### **5.3.4.5 Kupferzell-Phagozytose-Aktivität**

Zur Quantifizierung der Kupferzell-Phagozytose-Aktivität wurden fluoreszenzmarkierte Latexpartikel ( $3 \times 10^8$  Partikel/kg KG; Durchmesser 1.1µm; YG plain, Polysciences Inc., Warrington PA, USA) intraarteriell injiziert. Im Blaulicht-Filter wurden über einen Zeitraum von 5 Minuten alle 30 Sekunden randomisiert Lobuli aufgezeichnet. Innerhalb der auf den Bildschirm gelegten Schablonen wurde die Anzahl der frei-fließenden Latexpartikel sowie die Anzahl der nicht frei-fließenden Latexpartikel bestimmt. Die Elimination der Latexpartikel aus hepatischen Sinusoiden diente zur Quantifizierung der Kupferzell-Phagozytose-Aktivität und wurde als Anteil der frei-fließenden Partikel bezogen auf die Anzahl aller sichtbaren Partikel berechnet und in Prozent angegeben (Abb. 4B).



**Abbildung 4:** Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der hepatischen Mikrozirkulation im UV-Filter nach 90-minütiger Reperfusion. Darstellung der hepatozellulären Apoptose (weißer Pfeil) nach Anfärbung mit Bisbenzimid (**A**). Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der hepatischen Mikrozirkulation im Blau-Filter nach 90-minütiger Reperfusion nach intraarterieller Injektion von fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln. Darstellung von frei-beweglichen Latexpartikeln (weißer Pfeil) sowie von bereits phagozytierten, nicht-beweglichen Latexpartikeln (schwarzer Pfeil; **B**). Vergrößerung x465.

### 5.3.5 Hepatozelluläre Exkretionsfunktion

Zur Bestimmung der hepatozellulären Exkretionsfunktion diente der gesamthepatische Gallefluss. Dieser gilt als reliabler Marker einer ischämischen Leberfunktionsstörung (BOWERS et al., 1987). Die Galle wurde über den im *Ductus choledochus* befindlichen Katheter in abgewogenen Insulinspritzen aufgefangen und gewogen. Die Messintervalle orientierten sich am experimentellen Protokoll. Das spezifische Gewicht der Galle wurde mit 1g/ml angenommen (SUMIMOTO et al., 1988). Nach Bestimmung des Leberfeuchtgewichtes wurde der Gallefluss pro Zeiteinheit und pro g Lebergewicht ( $\mu\text{l}/\text{min} \times \text{g}$ ) kalkuliert.

### 5.3.6 Vollblut - Analytik

#### 5.3.6.1 Blutgasanalyse, Zellzahlbestimmung

Zur Analyse der Blutgase sowie zur Zellzahlbestimmung wurde den Versuchstieren an am experimentellen Protokoll orientierten Zeitpunkten arteriell Blut entnommen und in einer heparinisierten Kapillare sowie einem EDTA-beschichteten Röhrchen asserviert. Die Analyse der arteriellen Blutgase ( $p_a\text{CO}_2$ ,  $p_a\text{O}_2$ ), pH-Wert und Basenüberschuss erfolgte mittels eines pH Blood Gas Analysers (Halstead, Essex CO9 2 DX, England). Zusätzlich wurde eine Be-

stimmung der systemischen Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen sowie des Hämatokrits durchgeführt (Coulter® ACT diff., Coulter Electronics LTD, Northwell Drive, Luton, Beds England).

### **5.3.6.2 Enzym- und Interleukinbestimmung im Plasma**

Das zu Versuchsende arteriell entnommene Blut wurde bei 21°C mit 3000 Umdrehungen/min für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der zellfreie Überstand abgetrennt und das gewonnene Plasma bis zum Zeitpunkt der Analyse in einem Gefrierkühlschrank bei -80°C aufbewahrt.

Mittels Spektrophotometrie wurden die leberspezifischen Enzyme ALT/AST sowie LDH und GLDH gemessen.

Zusätzlich wurde mit Hilfe von ELISA-Assays (R & D Systems, Wiesbaden, Deutschland) die Plasma-Konzentrationen der Zytokine TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 und Interleukin-10 bestimmt.

### **5.3.7 Histologische Untersuchungen**

Für histologische Untersuchungen wurden am Versuchsende aus dem linken Leberlappen Gewebeproben entnommen und in einer 4% Formalinlösung für 2-3 Tage fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden 5 $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE), und für den Nachweis infiltrierender neutrophiler Granulozyten mit ASD-Chlorazetatesterase (CAE) gefärbt.

Die histologischen Präparate wurden an einem Lichtmikroskop (Olympus BX 60F, Olympus optical CO. LTD., Japan) unter Verwendung eines 40x Objektivs (Olympus UplanFI,  $\infty/0.17$ , Japan) ausgewertet. Es wurden pro Präparat jeweils 25 Gesichtsfelder (HPF; x400-fache Vergrößerung) analysiert.

Zur Quantifizierung des I/R-induzierten Leberschadens dienten zytoplasmatische Vakuolisierung und Grobscholligkeit sowie sinusoidale Kongestion (Abb. 5A). Die hepatozelluläre Desintegrität wurde semiquantitativ mit dem Score-System nach Suzuki quantifiziert (SUZUKI et al., 1993) (Tabelle 1).

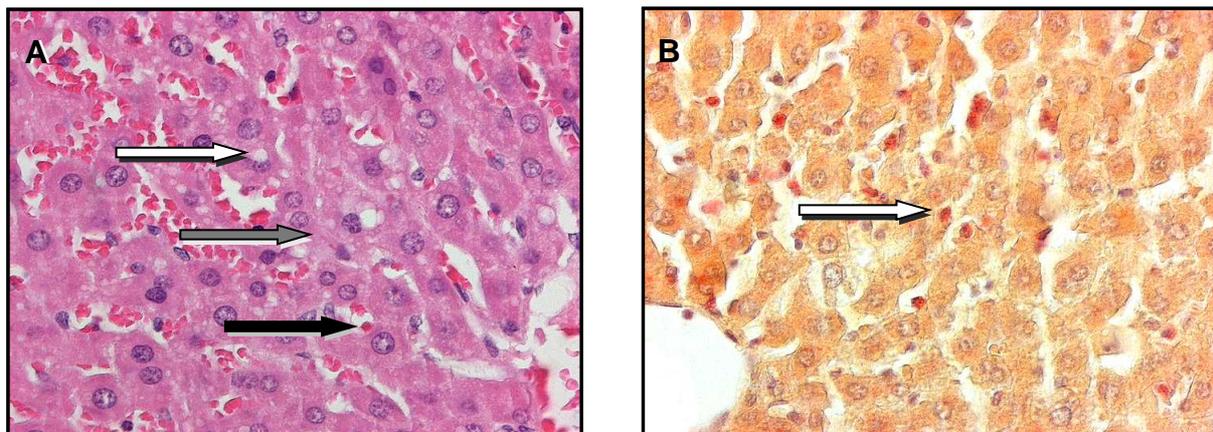
## HE-Färbung

<u>Vakuolisierung</u>		<u>Kongestion</u>		<u>Grobscholligkeit</u>	
0	0%	0	keine	0	keine
1	0 - 10%	1	wenig	1	wenig
2	10 - 30%	2	mittel	2	mittel
3	30 - 50%	3	viel	3	viel
4	> 50%				

**Tabelle 1:** Score-System zur Beurteilung des I/R-induzierten Leberschadens nach Suzuki.

## Chlorazetatesterase-Färbung

Die Quantifizierung der infiltrierenden neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld erfolgte anhand positiver Färbung und entsprechender Morphologie und wurde in n pro Gesichtsfeld (n/HPF) wiedergegeben (Abb. 5B).



**Abbildung 5:** HE Histologie einer Kontroll-Leber nach 90-minütiger Reperfusion. Man beachte die durch I/R-induzierte zyttoplasmatische Vakuolisierung (weißer Pfeil), Grobscholligkeit (grauer Pfeil) und sinusoidale Kongestion (schwarzer Pfeil; **A**). CAE-Färbung einer Kontroll-Leber nach 90-minütiger Reperfusion. Man beachte die ins Gewebe infiltrierten neutrophilen Granulozyten (weißer Pfeil; **B**). Vergrößerung x400.

## 5.4 Proteinexpression

### 5.4.1 Immunhistochemie

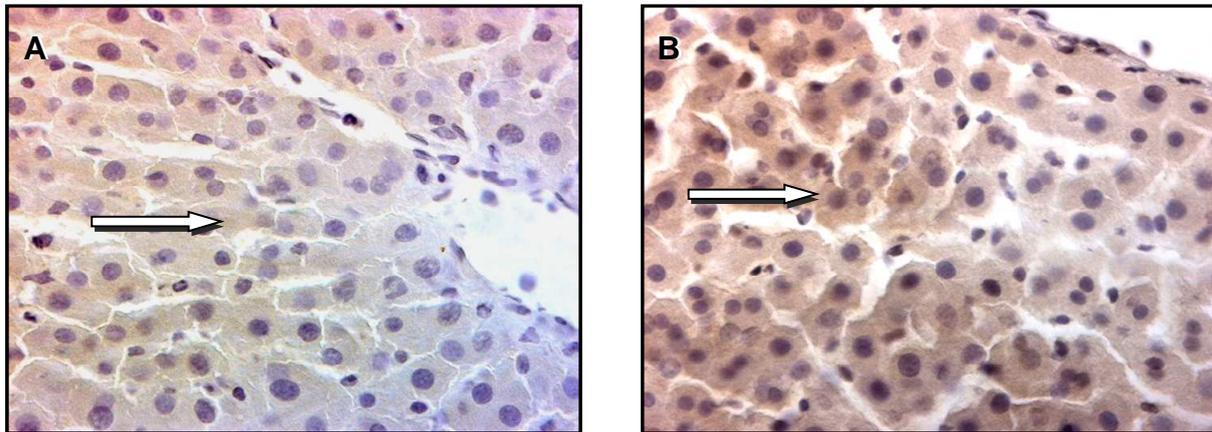
Zur immunhistochemischen Darstellung von NF- $\kappa$ B, iNOS, EPO-Rezeptor sowie pSTAT-5 wurden aus den nach Versuchsende asservierten und mit Gewebemedium einge-

frorenen Gewebeproben 5µm dicke Gefrierschnitte hergestellt und direkt nach dem Schneiden bei 4°C in Aceton fixiert. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte zuerst mit dem entsprechenden Primärantikörper und dann mit dem zugehörigen Peroxidase-markierten Sekundärantikörper inkubiert (Tabelle 2). Alle Schnitte wurden anschließend mit aktiviertem Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid inkubiert. Nach Gegenfärbung mit Hämalun nach Meyer wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% Ethanol) entwässert, mit Xylol entparaffiniert und eingedeckt. Zudem wurde zur immunhistochemischen Darstellung von pSTAT-5 ein Phosphatase-Hemmer vor der Inkubation mit dem Primärantikörper hinzugegeben.

Mit einem Olympus BX60 Lichtmikroskop wurden jeweils randomisiert 3 Schnitte von sham-Tieren und NaCl-behandelten Kontrolltieren sowie mit 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion behandelten Tieren analysiert. Dabei wurden bei einer 400-fachen Vergrößerung 25 Gesichtsfelder pro Präparat untersucht. Die Expression des EPO-Rezeptors sowie von iNOS wurde mit Hilfe eines Scores semiquantitativ analysiert (0: 0%, 1: 0-10%, 2: 10-30%, 3: 30-50%, 4: >50%) (Abb. 6A). Die Quantifizierung der NF-κB und pSTAT-5 Expression erfolgte anhand positiver Färbung und wurde in % positiver Zellen angegeben (Abb. 6B).

Primär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
NF-κB	rabbit	1:25	Santa Cruz	goat-anti-rabbit	1:100	Dianova
iNOS	mouse	1:25	Santa Cruz	goat-anti-mouse	1:100	Dianova
EPO-Rezeptor	rabbit	1:50	Santa Cruz	goat-anti-rabbit	1:5000	Dianova
pSTAT-5	goat	1:50	Santa Cruz	rabbit-anti-goat	1:100	Dianova

**Tabelle 2:** Auflistung der für die immunhistochemische Färbung eingesetzten Antikörper.



**Abbildung 6:** iNOS Immunhistochemie einer Kontroll-Leber nach 90-minütiger Reperfusion. Man beachte die starke Expression von iNOS in Hepatozyten (Pfeil; **A**). NF- $\kappa$ B Immunhistochemie einer Kontroll-Leber nach 90-minütiger Reperfusion. Man beachte die starke Expression von NF- $\kappa$ B in Hepatozyten (Pfeil; **B**). Vergrößerung x400.

#### 5.4.2 Western blot

Von den kryokonservierten Leberproben wurden 100 bis 200mg Gewebe mit einem Low Salt-Lysepuffer, bestehend aus 10mM TRIS, pH 7.5, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA, 0.5% Triton X 100, 0.02% NaN<sub>3</sub>, unter Zusatz eines Proteinaseinhibitor-Cocktails (1:50; Sigma) und PSMF (1:100; Roth) mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik) homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann 30 Minuten bei 4°C mit 16.000g zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, Deutschland) und der Überstand als Gesamtzell-Extrakt abpipettiert. Die so gewonnenen Aliquots wurden auf Eis gelagert und sofort zur Proteinbestimmung verwendet. Die Konzentration der Proteinextrakte wurde spektrophotometrisch mit der Methode nach Lowry bestimmt und durch Verdünnen mit destilliertem Wasser auf den gleichen Proteingehalt eingestellt. Die eingestellten Extrakte wurden nach Zusatz von 2x „Sample buffer“ nach Lämmli (Sigma) 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend in einer Konzentration von 60µg/Bande in die Gel-taschen transferiert.

Die Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 10%) elektrophoretisch bei einer konstanten Spannung von 100V im Sammelgel (15min) und von 140V im Trenngel (1h) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Als Molekulargewichts-Standard diente der Rainbow high range Marker (Amersham). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in einem Transferpuffer-Bad für das anschließende Membran-Blotting equilibriert. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend während einer Dauer von 2 Stunden in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad) bei einer

angelegten Spannung von 50V auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0.2µm, BioRad) transferiert.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen mit einer 5%-igen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry Milk, BioRad) in TBS-T für 30 Minuten inkubiert. Nach Waschen mit TBS-T wurden die Primär-Antikörper für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tabelle 3). Beim Western blot für pSTAT-5 wurde vor der Inkubation mit dem Primärantikörper ein Phosphatase-Hemmer hinzugegeben.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden POD-markierten Sekundärantikörper (Tabelle 3) für 90 Minuten. Im Anschluss wurden die Membranen fünfmal mit TBS-T gewaschen und nachfolgend der Chemilumineszenz Methode (ECL, Amersham) unterzogen. Dazu wurden die Membranen nach einminütiger Inkubation mit dem ECL-Reagenz in Autoklavierfolie verpackt und zur Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham pharmacia biotech) in einer Röntgenkassette positioniert. Die Signale der belichteten Filme wurden anschließend in Entwicklungs- und Fixierbädern (Zahrfilm, Adefo GmbH, Nürnberg, Deutschland) visualisiert und konserviert.

Zur Kontrolle der Protein-Beladung und des -Transfers wurde ein monoklonaler  $\beta$ -Actin-Antikörper als interner Standard eingesetzt. In sämtlichen Western blot-Analysen wurde die densitometrisch ermittelte Dichte rechnerisch auf gleiche  $\beta$ -Actin-Konzentrationen korrigiert. Die Analyse der Röntgenfilme erfolgte mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc) und einem Quantifizierungsprogramm (Quantity One-Geldoc, BioRad).

Primär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
$\beta$ -Actin	mouse	1:20000	Sigma	sheep-anti-mouse	1:10000	Amersham
NF- $\kappa$ B	rabbit	1:250	Santa Cruz	donkey-anti-rabbit	1:5000	Amersham
iNOS	mouse	1:25	Santa Cruz	goat-anti-mouse	1:100	Dianova
EPO-Rezeptor	rat	1:500	Santa Cruz	donkey-anti-rat	1:5000	Amersham
pSTAT-5	goat	1:500	Santa Cruz	rabbit-anti-goat	1:2000	Dianova
cleaved Caspase-3	rabbit	1:500	Cell Signaling	donkey-anti-rabbit	1:5000	Amersham

**Tabelle 3:** Auflistung der für Western blot-Analysen eingesetzten Antikörper.

## 5.5 Experimentelles Protokoll

Zur Untersuchung des postischämischen Reperfusionsschadens erfolgten bei allen Tieren Anästhesie und Präparation sowie die Untersuchungstechniken wie unter 5.1, 5.2 und 5.3 beschrieben. Nach der Präparation und einer 15-minütigen Stabilisierungsphase zur Gewährleistung physiologischer Kreislaufbedingungen wurde bei allen Tieren eine Baselinemessung makrohämodynamischer Parameter sowie eine intravitale Mikroskopie mit Analyse des sinusoidalen Perfusionsversagens, der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion durchgeführt.

In diesem 30-minütigen Zeitraum wurde der basale Gallefluss gemessen sowie nach einer arteriellen Blutentnahme eine Blutgasanalyse durchgeführt und ein Blutbild erstellt. Weiterhin wurde Plasma gewonnen und für spätere Analysen bei -80°C tiefgefroren. Der Baselinemessung folgte eine 90-minütige selektive Ischämie des linken Leberlappens. Während der Ischämie wurden kontinuierlich der Gallefluss sowie Blutdruck und Herzfrequenz gemessen.

Bei allen Tieren schloss sich an die Ischämie eine 90-minütige Reperusionsphase an. Nach 90 Minuten Reperfusion wurde eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation durchgeführt und folgende Parameter bestimmt:

- 1.) Sinusoidales Perfusionsversagen
- 2.) Sinusoidale Leukostase und venuläre Leukozytenadhäsion
- 3.) Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit
- 4.) Hepatozelluläre Apoptose
- 5.) Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität

Zudem wurde der gesamthepatische Gallefluss während der ersten 30 Minuten der Reperfusion und in den darauf folgenden 60 Minuten der Reperfusion bestimmt. Nach 45 Minuten der Reperfusion erfolgte eine Messung von Herzfrequenz und Blutdruck.

Am Ende des Versuches wurden Blutdruck und Herzfrequenz gemessen. Zur Analyse des Blutbildes und der Blutgase sowie zur Gewinnung von Plasma wurde zu Ende des jeweiligen Versuches den Tieren arteriell Blut entnommen. Die Leber wurde zur histologischen Untersuchung und zur Bestimmung des Leberfeuchtgewichtes mit einem sterilen Präparationsbesteck *in toto* entfernt und die Tiere hierdurch getötet.

## 5.6 Gruppeneinteilung

Ziel der vorliegenden Studie war es zu klären, inwieweit EPO beziehungsweise ReoPro den mikrovaskulären und parenchymatösen Reperfusionsschaden der Leber beeinflussen können. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Tiere im Vorfeld eines jeden Versuches verschiedenen Gruppen zugeordnet. Anästhesie, Präparation sowie die zuvor unter 5.1, 5.2 und 5.3 beschriebenen Untersuchungstechniken wurden bei allen Tieren durchgeführt.

### *sham*

8 sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrolle. Des Weiteren wurden die unter 5.4 beschriebenen Untersuchungstechniken durchgeführt.

### *IR*

Diese Gruppe umfasste 6 Tiere. Der linke Leberlappen wurde einer 90-minütigen Ischämie sowie einer 90-minütigen Reperfusion unterzogen. Des Weiteren wurden die unter 5.4 beschriebenen Untersuchungstechniken durchgeführt.

### *EPO 500IU zur Ischämie*

Zu Beginn der Ischämie erfolgte bei 7 Tieren eine einmalige intravenöse Applikation von 500IU/kg KG Erythropoietin.

### *EPO 5000IU zur Ischämie*

Bei 6 Tieren wurden zu Beginn der Ischämie eine einmalige Injektion von 5000IU/kg KG Erythropoietin durchgeführt.

### *EPO 5000IU zur Reperfusion*

Bei 5 Tieren wurden zu Beginn der Reperfusion 5000IU/kg KG Erythropoietin injiziert. Die unter 5.4 beschriebenen Untersuchungstechniken wurden zusätzlich durchgeführt.

### *ReoPro*

Diese Gruppe umfasste 8 Tiere. ReoPro wurde in einer Dosierung von 1mg/kg KG zu Beginn der Reperfusion intravenös injiziert.

## 5.7 Datenerfassung und Statistik

Die während der Auswertung der Videobänder gewonnenen Daten wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Corporation) zur elektronischen Datenverarbeitung eingegeben. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme SigmaStat und SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, California, USA) verwendet.

Die jeweils pro Versuchszeitpunkt ausgewerteten Gesichtsfelder jedes Versuchstieres wurden zur Berechnung eines Mittelwertes herangezogen. Aus den Mittelwerten der einzelnen Versuche wurden der Mittelwert, der Standardfehler des Mittelwertes sowie die Standardabweichung der Versuchsgruppen zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten kalkuliert.

Unter Annahme einer Normalverteilung der Werte (SigmaStat, Jandel Corporation, USA) erfolgte der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen mittels t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Konnte hingegen eine Normalverteilung der Werte ausgeschlossen werden, wurde der Mann Whitney U-Test durchgeführt. Als signifikant wurden Unterschiede bei  $p < 0.05$  angesehen.

## **6 Ergebnisse**

### **6.1 Makrohämodynamik**

#### **6.1.1 Blutbild**

Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl sowie Hämoglobin- und Hämatokritwert befanden sich bei allen Gruppen unter baseline-Bedingungen innerhalb des physiologischen Normbereichs. Lediglich der Hämatokritwert in der Gruppe EPO 5000IU zu Beginn der Reperfusion war zu diesem Zeitpunkt leicht erniedrigt.

Zum Zeitpunkt der Messung am Versuchsende lagen Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahl sowie Hämoglobin- und Hämatokritwert aller Gruppen ebenfalls innerhalb des physiologischen Normbereichs. ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion bewirkte allerdings eine leichte Erniedrigung des Hämatokritwertes nach Ischämie/Reperfusion (Tabelle 4, siehe Seite 99).

#### **6.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz**

Sowohl unter baseline-Bedingungen als auch zum Zeitpunkt der Ischämie und am Versuchsende befand sich der mittlere arterielle Blutdruck sowie die Herzfrequenz in allen Gruppen innerhalb des physiologischen Normbereichs. Zudem war bei NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren am Versuchsende eine signifikante Reduktion des MAP im Vergleich zu sham Tieren nachweisbar. Des Weiteren führte 500IU EPO zu Beginn der Ischämie am Versuchsende zu einem signifikanten Anstieg des MAP im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Tabelle 5, siehe Seite 100).

#### **6.1.3 Blutgasanalyse**

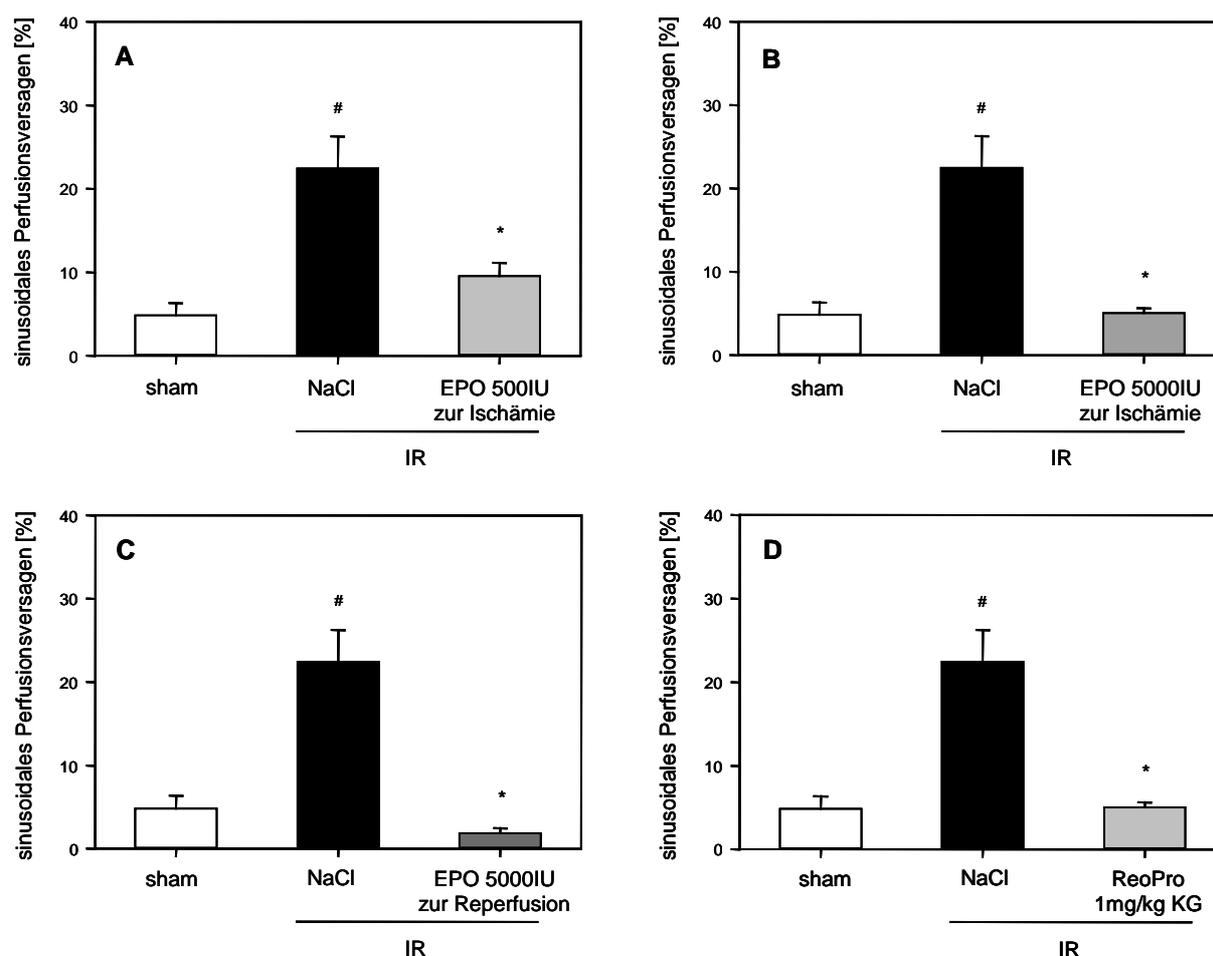
Unter baseline-Bedingungen lag der pH-Wert, der O<sub>2</sub>- sowie der CO<sub>2</sub>-Partialdruck in allen Gruppen innerhalb des physiologischen Normbereichs. Lediglich innerhalb der Gruppe 500IU beziehungsweise 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie war der pCO<sub>2</sub> leicht erhöht.

Am Versuchsende zeigte sich bei sham Tieren eine leichte Azidose. Der  $p\text{CO}_2$  lag zu diesem Zeitpunkt leicht im hypokapnischen Bereich. Bei NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren sowie bei Tieren, die mit 500IU beziehungsweise 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie behandelt wurden, war am Versuchsende ebenfalls eine leichte Azidose zu verzeichnen. Der  $p\text{CO}_2$  lag zu diesem Zeitpunkt jedoch im physiologischen Normbereich. Tiere der Gruppe 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion zeigten zum Zeitpunkt der zweiten Messung einen im Normbereich liegenden pH-Wert. Der  $p\text{CO}_2$  war leicht im hypokapnischen Bereich. ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion bewirkte am Versuchsende einen im physiologischen Normbereich liegenden pH-Wert, der allerdings im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren signifikant erhöht war. Der Partialdruck für  $\text{CO}_2$  war zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren signifikant reduziert und befand sich im hypokapnischen Bereich. Am Versuchsende lag der  $p\text{O}_2$  bei allen Gruppen innerhalb des physiologischen Normbereiches. Zusätzlich zeigte sich bei Tieren, die mit 500IU EPO zu Beginn der Ischämie behandelt wurden, ein signifikanter Anstieg des  $p\text{O}_2$  im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Tabelle 6, siehe Seite 100).

## 6.2 Mikrozirkulation

### 6.2.1 Sinusoidales Perfusionsversagen

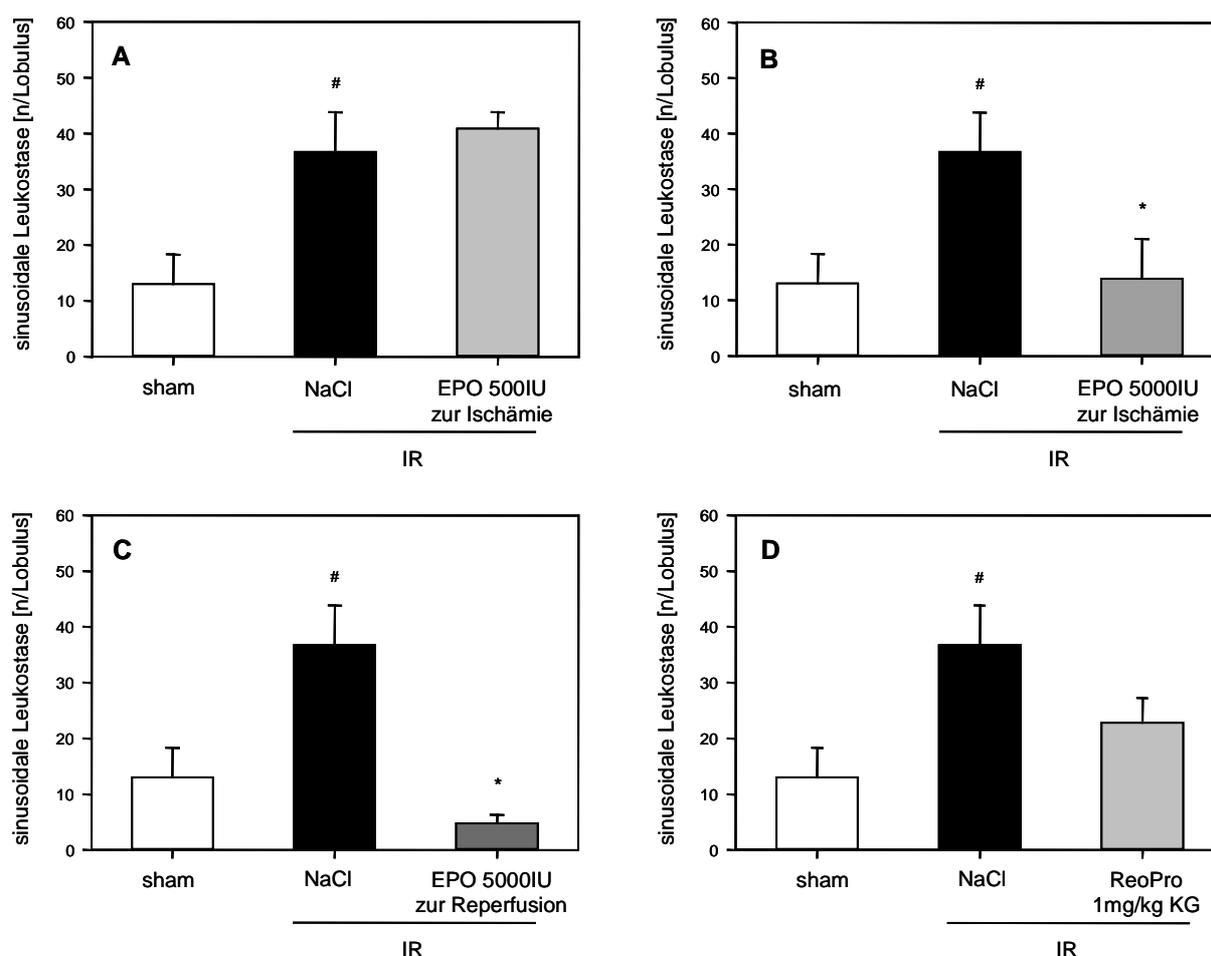
Die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Natrium-Fluoreszein ermöglichte die intravitalmikroskopische Analyse des sinusoidalen Perfusionsversagens. I/R führte zu einem signifikanten sinusoidalen Perfusionsversagen von circa 22%. Die Vorbehandlung mit 500IU EPO zu Beginn der Ischämie bewirkte eine signifikante Reduktion des I/R-induzierten mikrovaskulären Perfusionsversagens (Abb. 7A;  $p < 0.05$ ). Durch 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie konnte das sinusoidale Perfusionsversagen auf nahezu Ausgangsniveau gesenkt werden (Abb. 7B;  $p < 0.05$ ). Bei Gabe von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion des I/R-induzierten sinusoidalen Perfusionsversagens erreicht (Abb. 7C;  $p < 0.05$ ). Die Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion führte ebenfalls zu einer Abnahme des sinusoidalen Perfusionsversagens auf Ausgangsniveau (Abb. 7D;  $p < 0.05$ ).



**Abbildung 7:** Sinusoidales Perfusionsversagen nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule; n=7), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule; n=6) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule; n=5) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule; n=8); NaCl-behandelte Tiere dienten als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen; n=8), sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=6). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup>p<0.05 vs. sham, <sup>\*</sup>p<0.05 vs. I/R+NaCl.

## 6.2.2 Sinusoidale Leukostase

Nach der Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G war die intravital-mikroskopische Analyse der sinusoidalen Leukostase möglich. I/R führte zu einer signifikanten Zunahme der Leukostase. Die Vorbehandlung mit 500IU EPO zu Beginn der Ischämie hatte einen leichten Anstieg der I/R-induzierten sinusoidalen Leukostase zur Folge (Abb. 8A; p<0.05). Die Applikation von 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie bewirkte dagegen eine signifikante Reduktion der sinusoidalen Leukostase auf nahezu Ausgangsniveau (Abb. 8B; p<0.05). Bei Gabe von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion war ebenfalls eine signifikante Reduktion der sinusoidalen Leukostase mit Unterschreitung des sham-Niveaus zu beobachten (Abb. 8C; p<0.05). Die Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion führte nur zu einer leichten Reduktion der I/R-induzierten Leukostase (Abb. 8D).

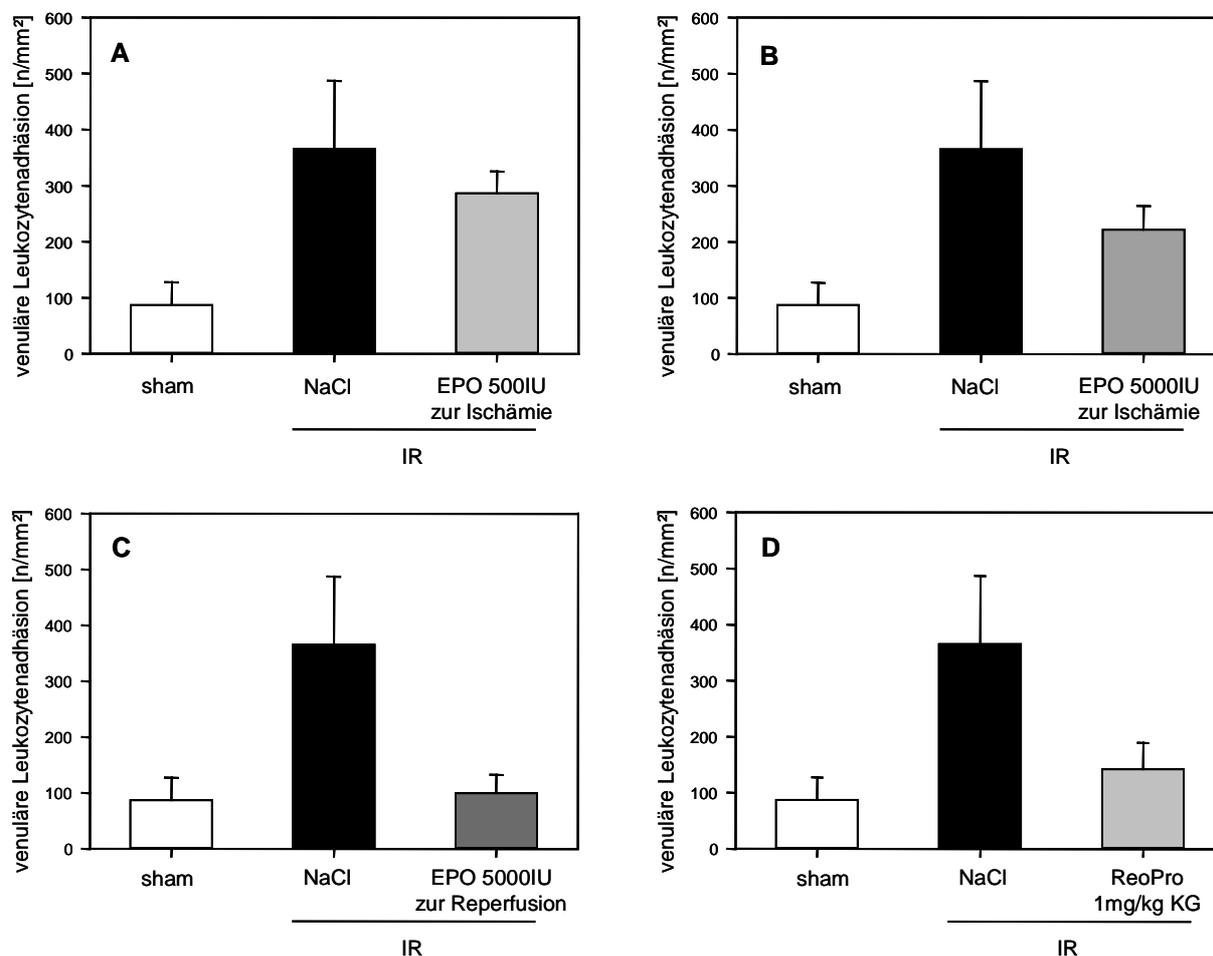


**Abbildung 8:** Sinusoidale Leukostase nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**A**; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**B**; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (**C**; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (**D**; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienten als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p<0.05$  vs. sham, \* $p<0.05$  vs. I/R+NaCl.

### 6.2.3 Venuläre Leukozytenadhäsion

Die Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G ermöglichte weiterhin die intravitalmikroskopische Quantifizierung der venulären Leukozytenadhäsion. I/R führte zu einer deutlichen Steigerung der Leukozytenadhäsion innerhalb postsinusoidaler Venulen ( $p=0.081$ ). Die Vorbehandlung mit 500IU EPO zu Beginn der Ischämie bewirkte eine leichte Reduktion der I/R-induzierten venulären Leukozytenadhäsion (Abb. 9A). Eine Abnahme der Leukozytenadhäsion um nahezu 40% zeigte sich bei 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie (Abb. 9B). Die Injektion von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion führte zu einer starken Reduktion der Leukozytenadhäsion innerhalb postsinusoidaler Venulen auf sham-Niveau ( $p=0.122$ ) (Abb.9C). Die Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion bewirkte

ebenfalls eine deutliche Reduktion der venulären Leukozytenadhäsion im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 9D).

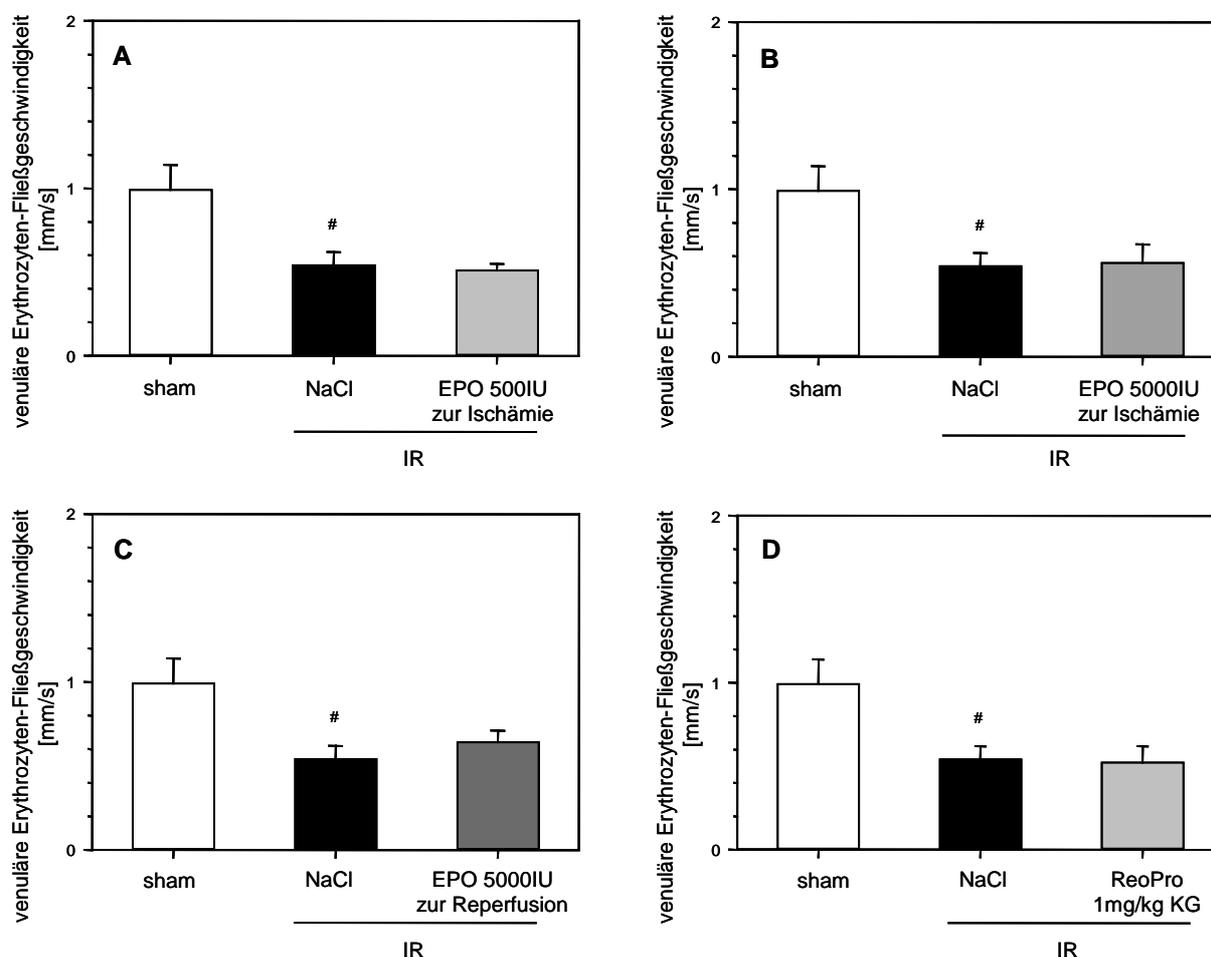


**Abbildung 9:** Venuläre Leukozytenadhäsion nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule; n=7), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule; n=6) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule; n=5) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule; n=8); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen; n=8), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=6). Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 6.2.4 Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit

I/R führte zu einer signifikanten Abnahme der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit ( $p < 0.05$ ). Die Vorbehandlung mit 500IU EPO und 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie hatte keine Veränderung der Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit innerhalb der Venulen zur Folge (Abb. 10A/B). Die Gabe von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion bewirkte eine geringfügige Zunahme der Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit von 18% (Abb. 10C). Die Behandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion führte zu keiner Veränderung

der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 10D).

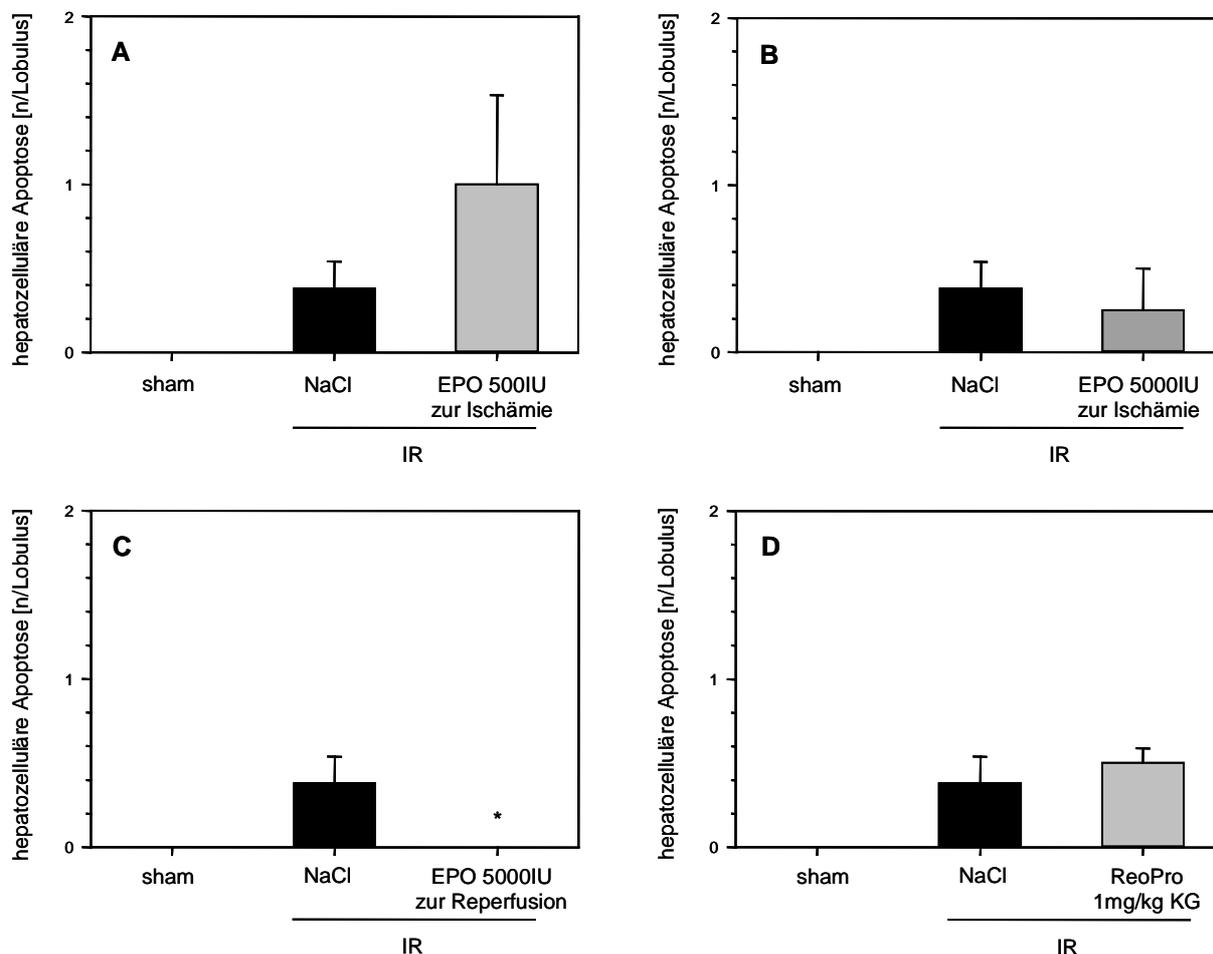


**Abbildung 10:** Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**A**; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**B**; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (**C**; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (**D**; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p<0.05$  vs. sham.

## 6.2.5 Hepatozelluläre Apoptose

Nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid H 33342 wurde die hepatozelluläre Apoptose mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie analysiert. I/R führte zu einer deutlichen Zunahme der hepatozellulären Apoptose, die nach Behandlung mit 500IU EPO zu Beginn der Ischämie verdoppelt war (Abb. 11A). Die Injektion von 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie hatte eine Reduktion von circa 34% zur Folge (Abb. 11B). Die I/R-induzierte hepatozelluläre Apoptose konnte durch Gabe von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion vollständig verhindert werden (Abb. 11C;  $p<0.05$ ). Die Gabe von ReoPro 30 Minuten vor Re-

perfusion hatte keine Auswirkung auf die hepatozelluläre Apoptose im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 11D).

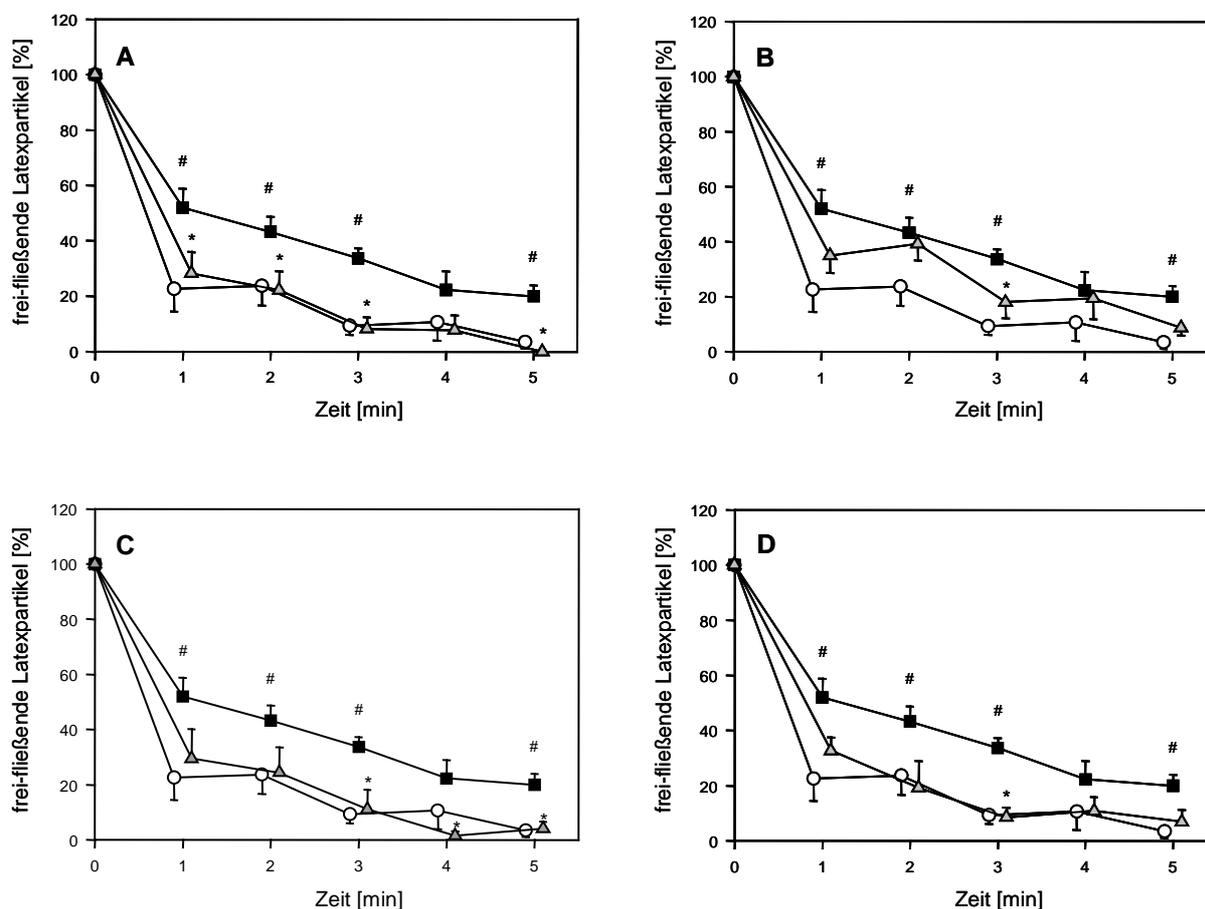


**Abbildung 11:** Hepatozelluläre Apoptose nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**A**; hellgraue Säule; n=7), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**B**; mittelgraue Säule; n=6) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (**C**; graue Säule; n=5) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (**D**; hellgraue Säule; n=8); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen; n=8), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=6). Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. I/R+NaCl.

## 6.2.6 Kupferzell-Phagozytose-Aktivität

Mit Hilfe von intraarteriell injizierten fluoreszeinformierten Latexpartikeln wurde die Kupferzell-Phagozytose-Aktivität analysiert. Sham-Tiere zeigten eine physiologische Kupferzell-Phagozytose-Aktivität mit einer Elimination nahezu aller injizierten Partikel innerhalb von 5 Minuten. I/R führte zu einer Beeinträchtigung der Kupferzellen, was sich in einem erhöhten Anteil zirkulierender Latexpartikel widerspiegelte. Die Behandlung mit 500IU EPO zu Beginn der Ischämie bewirkte eine Normalisierung der Phagozytose-Aktivität im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 12A;  $p < 0.05$ ). 5000IU EPO zu Beginn der

Ischämie hatte ebenfalls eine Steigerung der Phagozytose-Aktivität zur Folge (Abb. 12B;  $p < 0.05$ ). Die Injektion von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion vermochte die post-ischämische Funktionsstörung der Kupfferzellen komplett aufzuheben (Abb. 12C;  $p < 0.05$ ). Durch Gabe von ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion konnte ebenfalls eine Normalisierung der Phagozytose-Aktivität der Kupfferzellen erreicht werden (Abb. 12D;  $p < 0.05$ ).

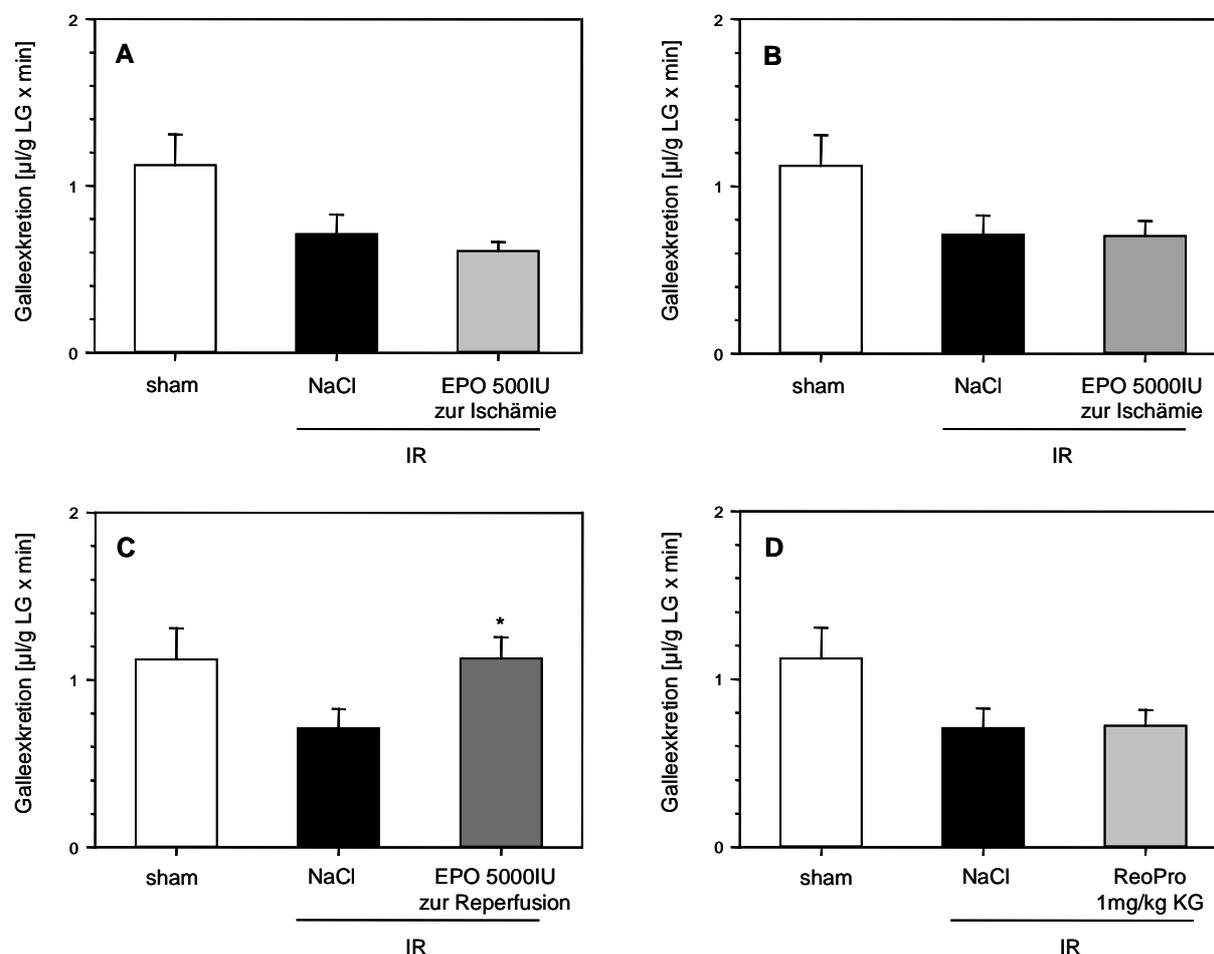


**Abbildung 12:** Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraues Dreieck;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraues Dreieck;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graues Dreieck;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraues Dreieck;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Quadrate;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Kreise;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0.05$  vs. sham, \* $p < 0.05$  vs. I/R+NaCl.

## 6.2.7 Galleexkretion

I/R führte zu einer deutlichen Reduktion der Galleexkretion ( $p=0.074$ ). Diese Reduktion konnte durch die Behandlung mit 500IU sowie mit 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie nicht gesteigert werden (Abb. 13 A/B). 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion verhinderte jedoch die I/R-bedingte Beeinträchtigung der exkretorischen Leberfunktion (Abb. 13C;  $p < 0.05$ ).

ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion hatte keine Veränderung der Galleexkretion im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren zur Folge (Abb. 13D).



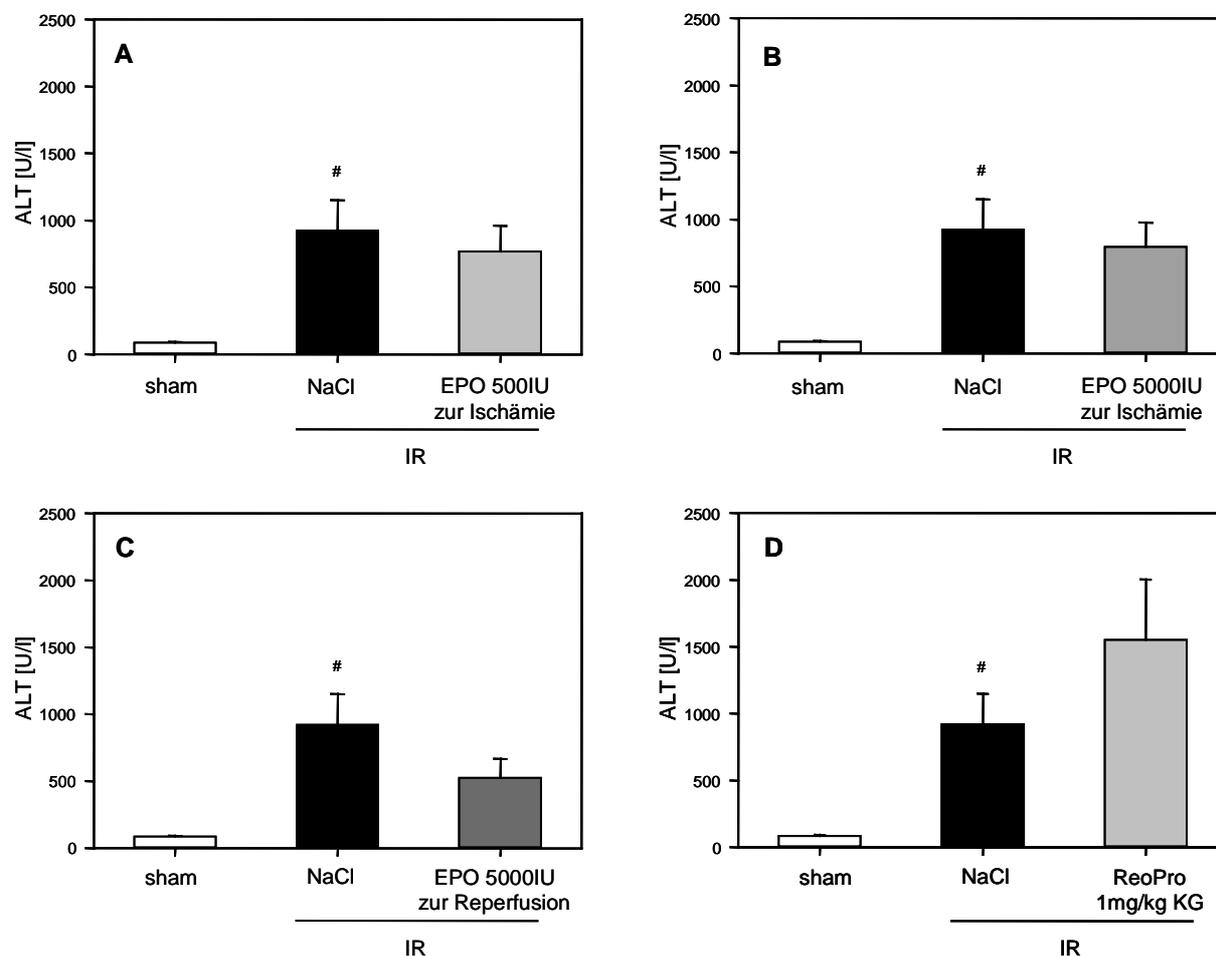
**Abbildung 13:** Galleexkretion nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**A**; hellgraue Säule; n=7), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**B**; mittelgraue Säule; n=6) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (**C**; graue Säule; n=5) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (**D**; hellgraue Säule; n=8); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen; n=8), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=6). Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. I/R+NaCl.

## 6.2.8 Plasma-Enzymaktivität

### 6.2.8.1 Alanin-Aminotransferase (ALT)

I/R führte zu einer signifikanten Zunahme der ALT-Aktivität im Plasma ( $p < 0.05$ ). Die Vorbehandlung mit 500IU EPO und 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie führte nur zu einer geringfügigen Abnahme der Enzymaktivität (Abb. 14A/B). Hingegen konnte durch Vorbehandlung mit 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion eine Reduktion der Plasma-ALT-Konzentration um 43% erreicht werden ( $p = 0.212$ ) (Abb. 14C). Wiederum führte die Gabe von

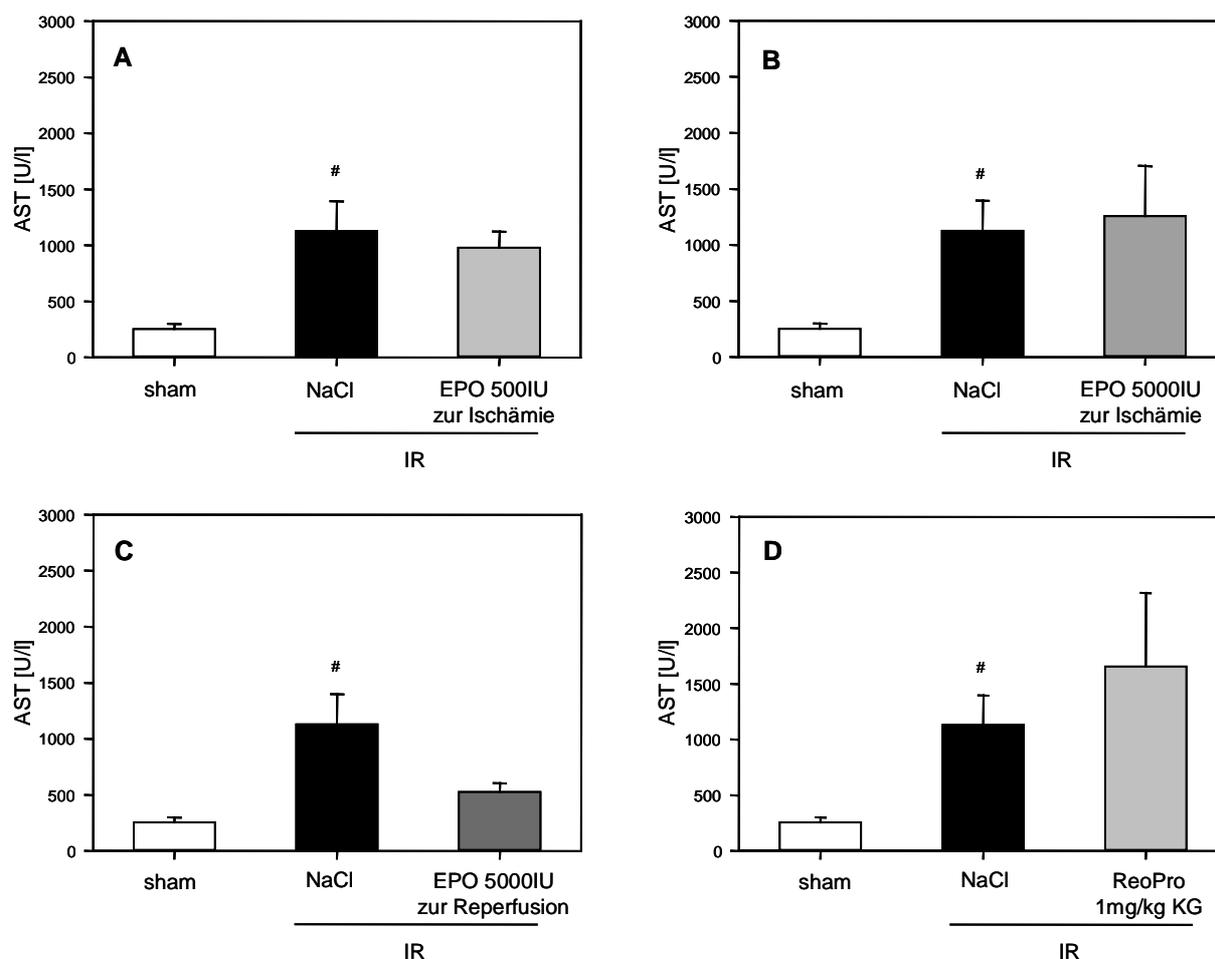
ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion zu einem starken Anstieg der ALT-Enzymaktivität im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 14D).



**Abbildung 14:** ALT-Aktivität nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule; n=7), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule; n=6) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule; n=5) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule; n=8); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen; n=8), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=6). Mittelwert  $\pm$  SEM. <sup>#</sup>p<0.05 vs. sham.

### 6.2.8.2 Aspartat-Aminotransferase (AST)

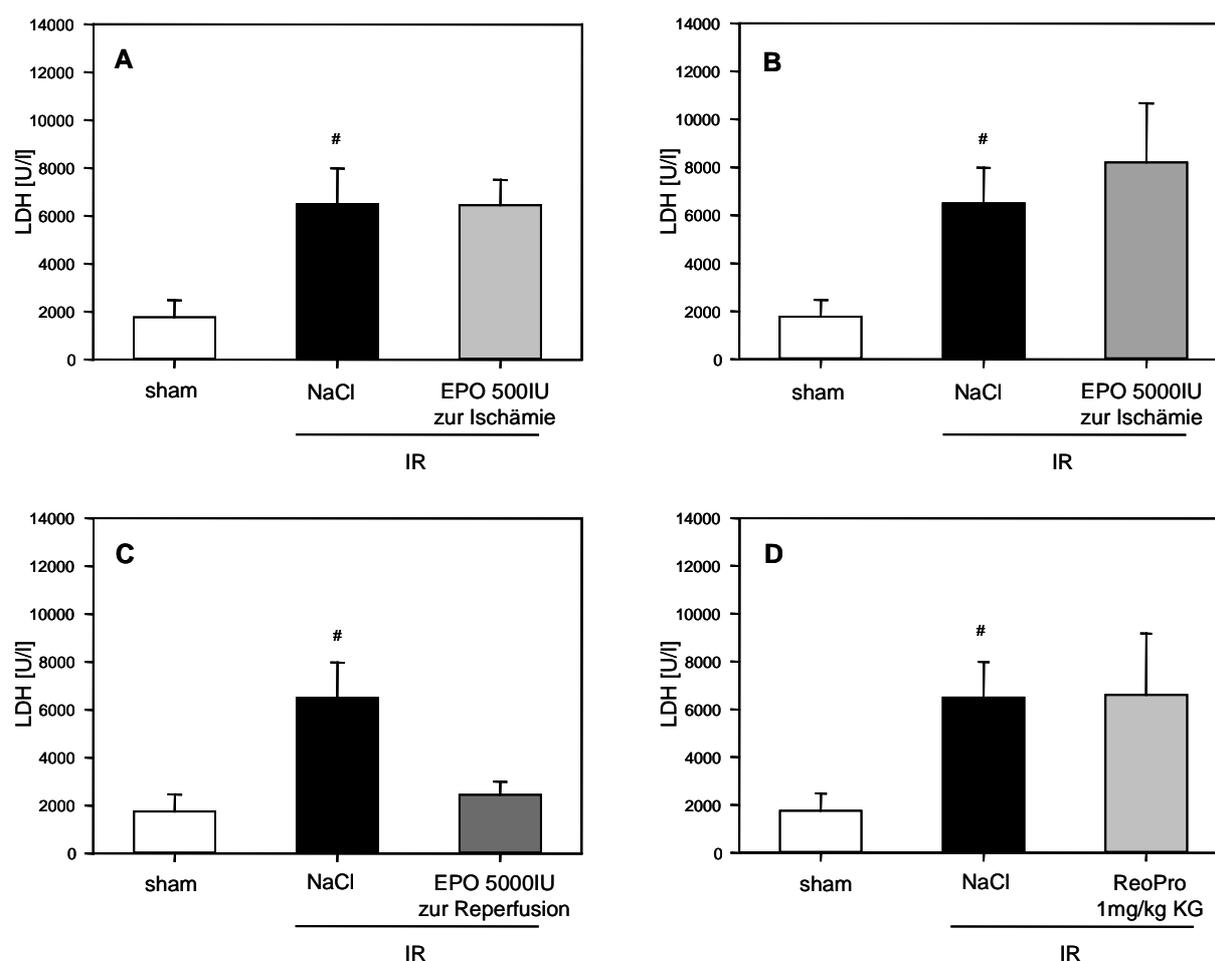
I/R war mit einer signifikanten Zunahme der Aspartat-Aminotransferase-Aktivität assoziiert ( $p<0.05$ ). Die Gabe von 500IU EPO und 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie hatten keine Auswirkung auf die post-ischämische Enzymaktivität (Abb. 15A/B). 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion hingegen führte zu einer deutlichen Reduktion der Enzymaktivität um 53% (Abb. 15C). Die Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion bewirkte hingegen einen Anstieg der I/R-induzierten AST-Plasmaaktivität um nahezu 30% (Abb. 15D).



**Abbildung 15:** AST-Aktivität nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**A**; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (**B**; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (**C**; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (**D**; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup> $p<0.05$  vs. sham.

### 6.2.8.3 Laktatdehydrogenase (LDH)

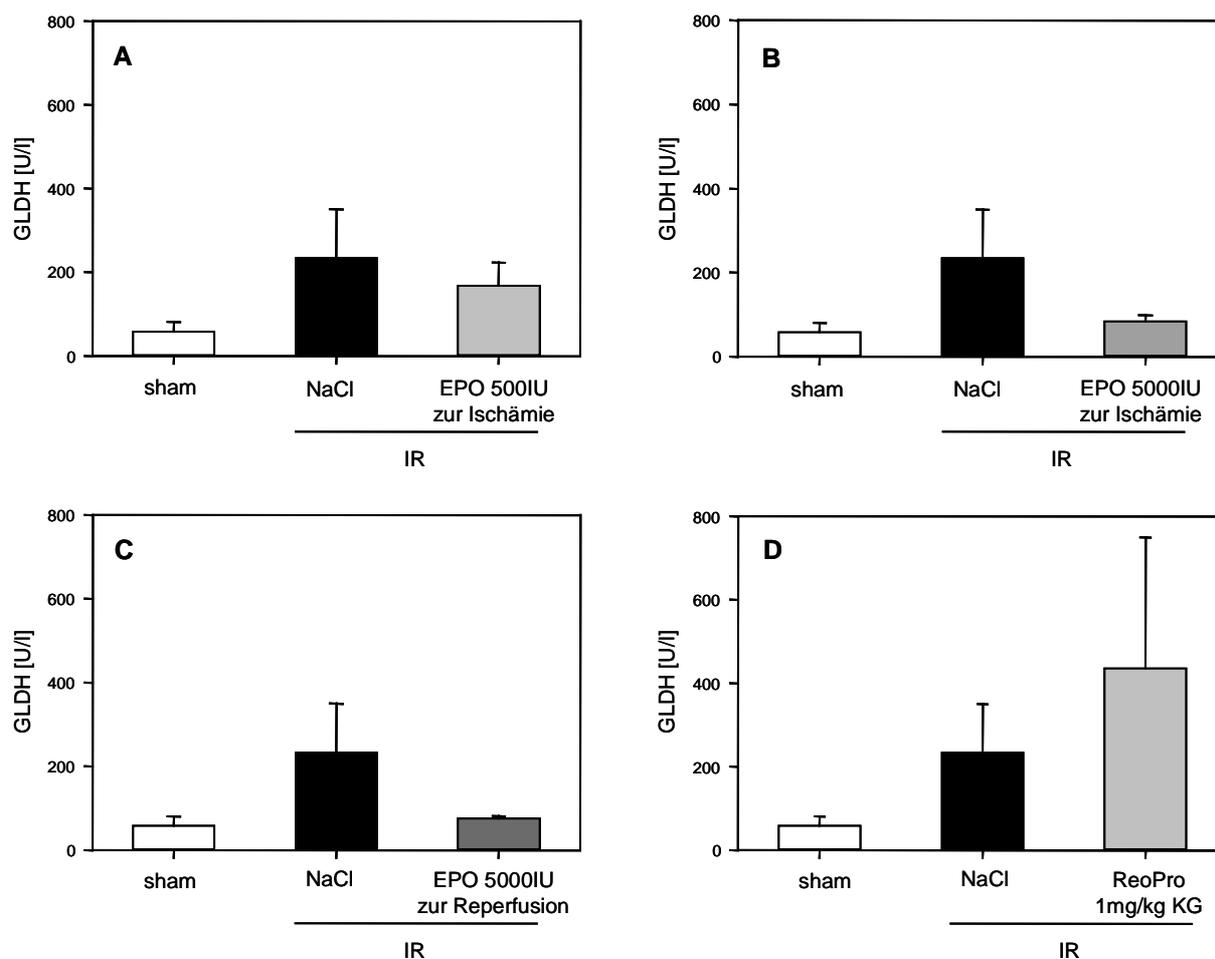
Ischämie/Reperfusion hatte einen signifikanten Anstieg der Laktatdehydrogenase-Aktivität im Plasma zur Folge ( $p<0.05$ ). Die Injektion von 500IU EPO zu Beginn der Ischämie hatte keinen Effekt auf die I/R-induzierte LDH-Enzymaktivität (Abb. 16A). 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie führte sogar zu einem leichten Anstieg der LDH-Aktivität im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 16B). Die Injektion von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion bewirkte hingegen eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität auf sham-Niveau ( $p=0.055$ ) (Abb. 16C). ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion hatte keine Auswirkung auf die postischämische LDH-Aktivität im Plasma im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 16D).



**Abbildung 16:** LDH-Aktivität nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule; n=7), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule; n=6) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule; n=5) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule; n=8); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen; n=8), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=6). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup>p<0.05 vs. sham.

#### 6.2.8.4 Glutamatdehydrogenase (GLDH)

I/R führte zu einer deutlichen Zunahme der Glutamatdehydrogenase-Aktivität im Plasma. Die Behandlung mit 500IU EPO zu Beginn der Ischämie bewirkte eine Reduktion um nahezu 28% (Abb. 17A). Die Injektion von 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie hatte eine weitere Abnahme der I/R-induzierten GLDH-Aktivität zur Folge (Abb. 17B). Nach Gabe von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion war die GLDH-Plasmakonzentration auf nahezu Ausgangsniveau reduziert (Abb. 17C). Die Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion führte hingegen zu einer Verdopplung der GLDH-Aktivität im Plasma im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 17D).



**Abbildung 17:** GLDH-Aktivität nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule; n=7), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule; n=6) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule; n=5) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule; n=8); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen; n=8), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=6). Mittelwert ± SEM.

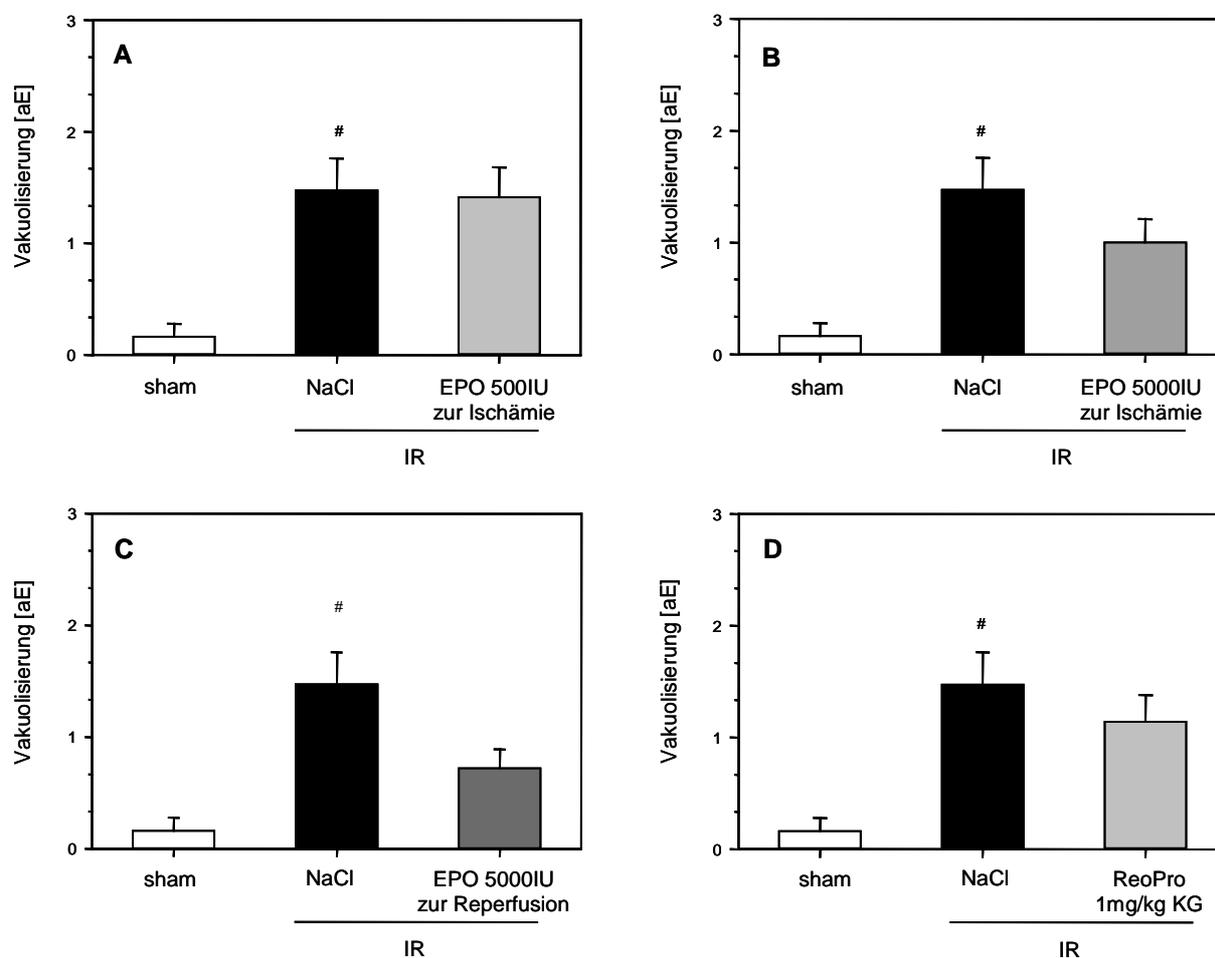
## 6.3 Morphologie und Entzündung

### 6.3.1 Histomorphologie

#### 6.3.1.1 Zytoplasmatische Vakuolisierung

Die lichtmikroskopische Analyse der zytoplasmatischen Vakuolisierung ergab eine signifikante Zunahme nach Ischämie/Reperfusion ( $p < 0.05$ ). Nach Gabe von 500IU EPO zu Beginn der Ischämie war keine Veränderung der I/R-induzierten Vakuolisierung zu verzeichnen (Abb. 18A). Die Applikation von 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie führte zu einer Reduk-

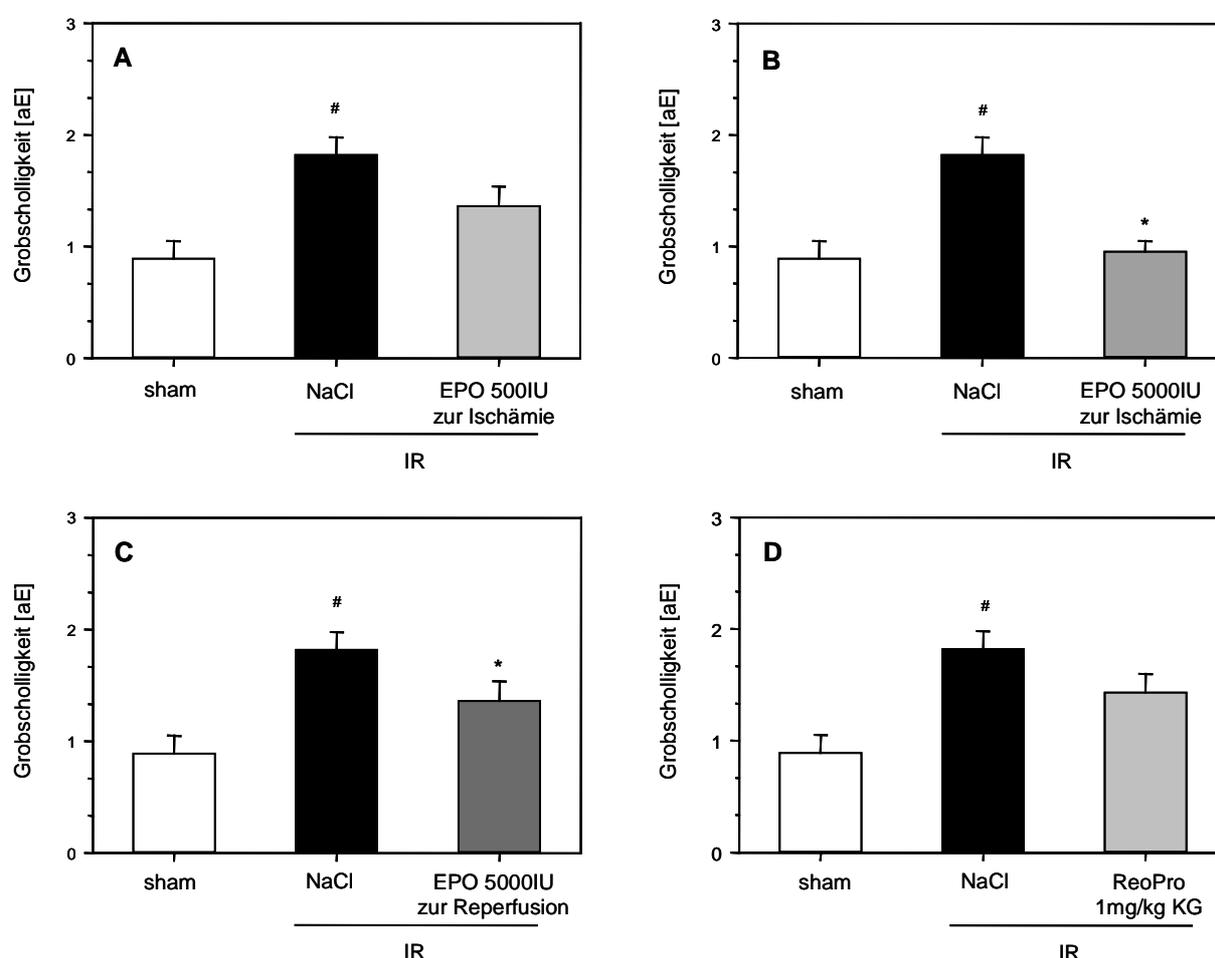
tion der zytoplasmatischen Vakuolisierung um 32% (Abb. 18B). EPO 5000IU zu Beginn der Reperfusion bewirkte sogar eine 50%-ige Reduktion der Vakuolisierung im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren ( $p=0.089$ ) (Abb. 18C). Die Behandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion führte lediglich zu einer leichten Reduktion der I/R-induzierten Vakuolisierung (Abb. 18D).



**Abbildung 18:** Zytoplasmatische Vakuolisierung nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup> $p<0.05$  vs. sham.

### 6.3.1.2 Zytoplasmatische Grobscholligkeit

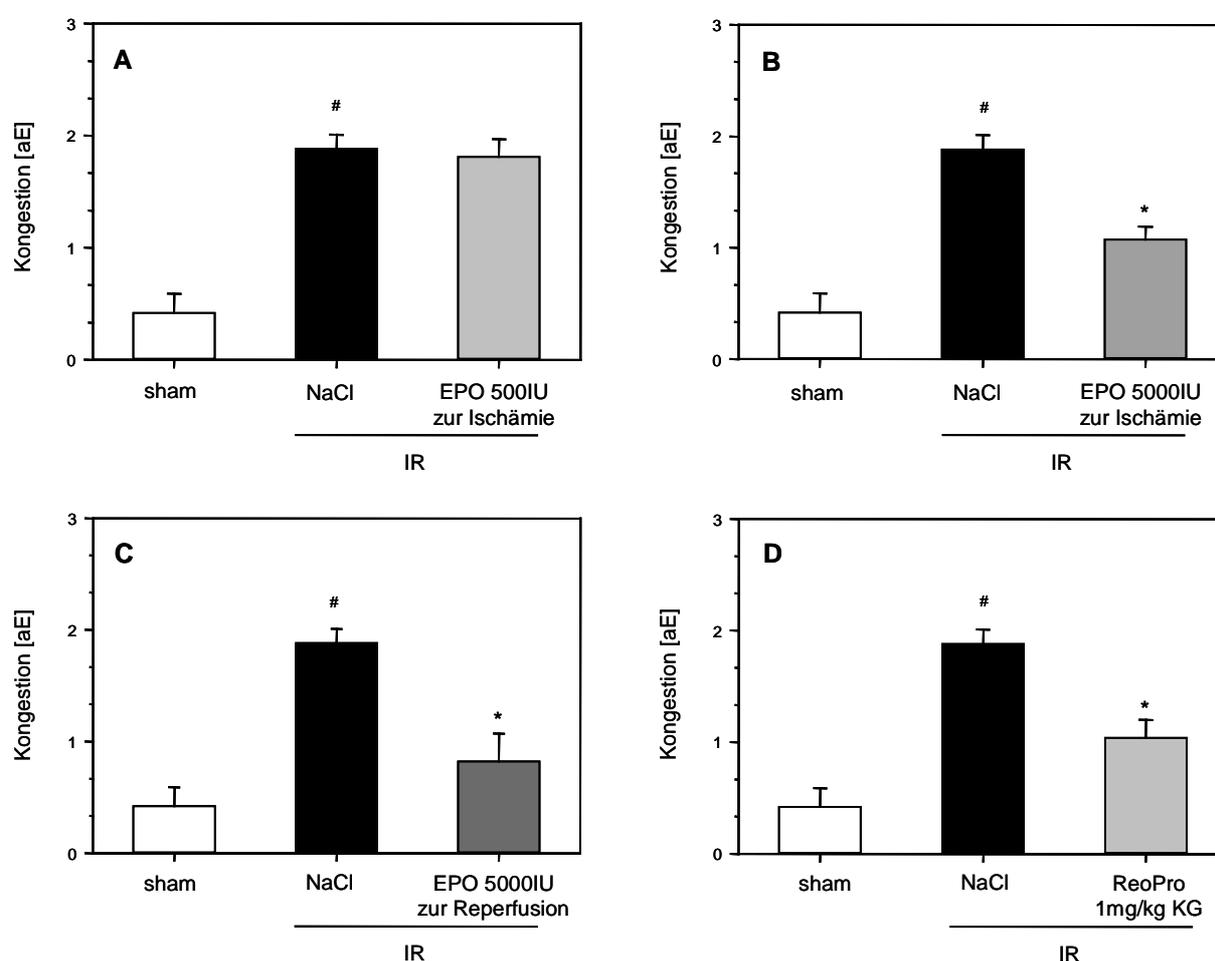
Die zytoplasmatische Grobscholligkeit wurde lichtmikroskopisch quantifiziert. I/R führte zu einer signifikanten Zunahme der Grobscholligkeit des Lebergewebes ( $p < 0.05$ ). Bei Injektion von 500IU EPO zu Beginn der Ischämie zeigte sich eine Abnahme der zytoplasmatischen Grobscholligkeit um 25% (Abb. 19A). Die I/R-induzierte zytoplasmatische Grobscholligkeit konnte durch Gabe von 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie signifikant auf sham-Niveau reduziert werden (Abb. 19B;  $p < 0.05$ ). 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion bewirkte ebenfalls eine signifikante Abnahme der Grobscholligkeit des Lebergewebes (Abb. 19C;  $p < 0.05$ ). ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion konnte die zytoplasmatische Grobscholligkeit um nahezu 20% im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren reduzieren. Diese Reduktion war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0.124$ ) (Abb. 19D).



**Abbildung 19:** Zytoplasmatische Grobscholligkeit nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. sham, <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. I/R+NaCl.

### 6.3.1.3 Sinusoidale Kongestion

Die lichtmikroskopische Analyse der sinusoidalen Kongestion ergab eine signifikante Zunahme der sinusoidalen Kongestion nach I/R ( $p < 0.05$ ). 500IU EPO zu Beginn der Ischämie hatte keine Veränderung der I/R-induzierten sinusoidalen Kongestion zur Folge (Abb. 20A). Bei Injektion von 5000 IU EPO zu Beginn der Ischämie beziehungsweise zu Beginn der Reperfusion zeigte sich eine signifikante Reduktion der sinusoidalen Kongestion (Abb. 20B/C;  $p < 0.05$ ). ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion hatte ebenfalls eine signifikante Reduktion der sinusoidalen Kongestion im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren zur Folge (Abb. 20D;  $p < 0.05$ ).

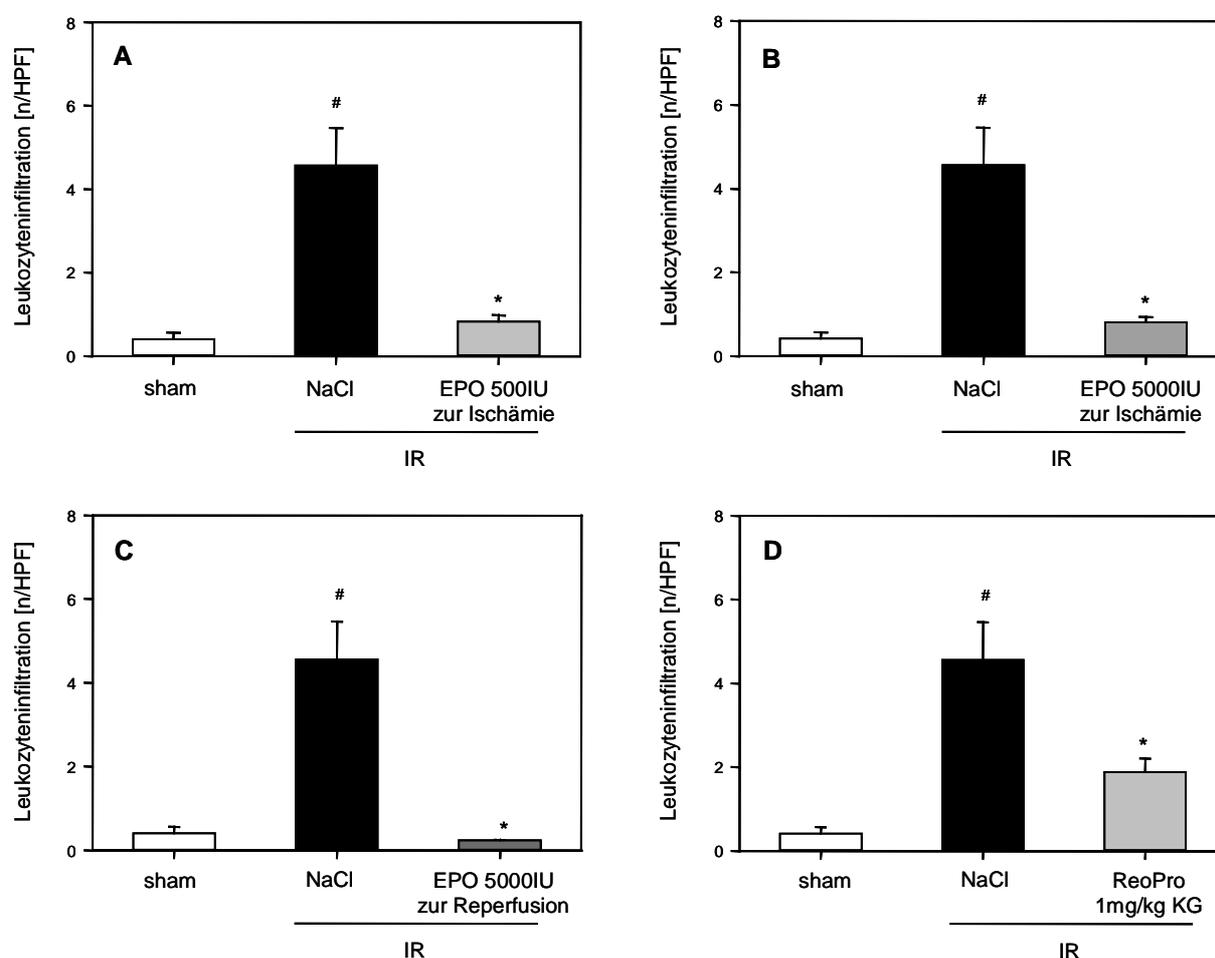


**Abbildung 20:** Sinusoidale Kongestion nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. sham, <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. I/R+NaCl.

## 6.3.2 Entzündung

### 6.3.2.1 Leukozyteninfiltration

Die lichtmikroskopische Auswertung der ins Gewebe infiltrierten neutrophilen Granulozyten erfolgte an mit ASD-Chlorazetatesterase-gefärbten histologischen Präparaten. I/R führte zu einer signifikanten Zunahme der ins Gewebe infiltrierten neutrophilen Granulozyten ( $p < 0.05$ ).



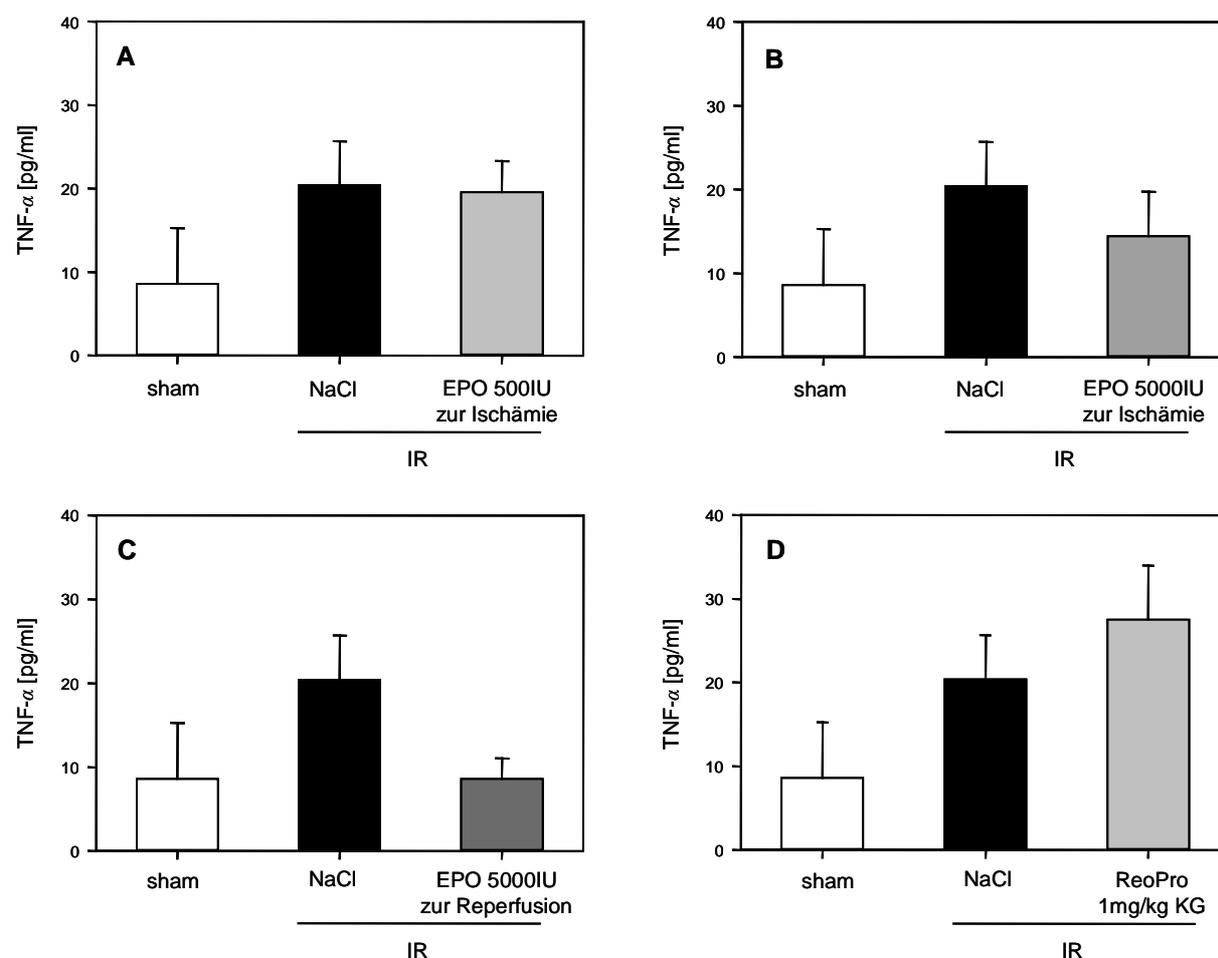
**Abbildung 21:** Leukozyteninfiltration nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0.05$  vs. sham, \* $p < 0.05$  vs. I/R+NaCl.

Die Applikation von 500IU EPO und 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie hatte eine signifikante Reduktion der I/R-bedingten Leukozyteninfiltration zur Folge (Abb. 21A/B;  $p < 0.05$ ). Durch Gabe von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion konnte die I/R-induzierte

Infiltration neutrophiler Granulozyten ins Gewebe ebenfalls signifikant auf sham-Niveau reduziert werden (Abb. 21C;  $p < 0.05$ ). ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion hatte ebenfalls eine signifikante Reduktion der I/R-induzierten Leukozyteninfiltration zur Folge (Abb. 21D;  $p < 0.05$ ).

### 6.3.2.2 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

I/R führte zu einer starken Zunahme der TNF- $\alpha$  Konzentration im Plasma. Die Behandlung mit 500IU EPO zu Beginn der Ischämie bewirkte keine Veränderung der I/R-induzierten TNF- $\alpha$  Plasmakonzentration (Abb. 22A). Durch Gabe von hochdosiertem EPO zu Beginn der Ischämie beziehungsweise zu Beginn der Reperfusion konnte die I/R-induzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung um 29% beziehungsweise 58% reduziert werden (Abb. 22B/C).

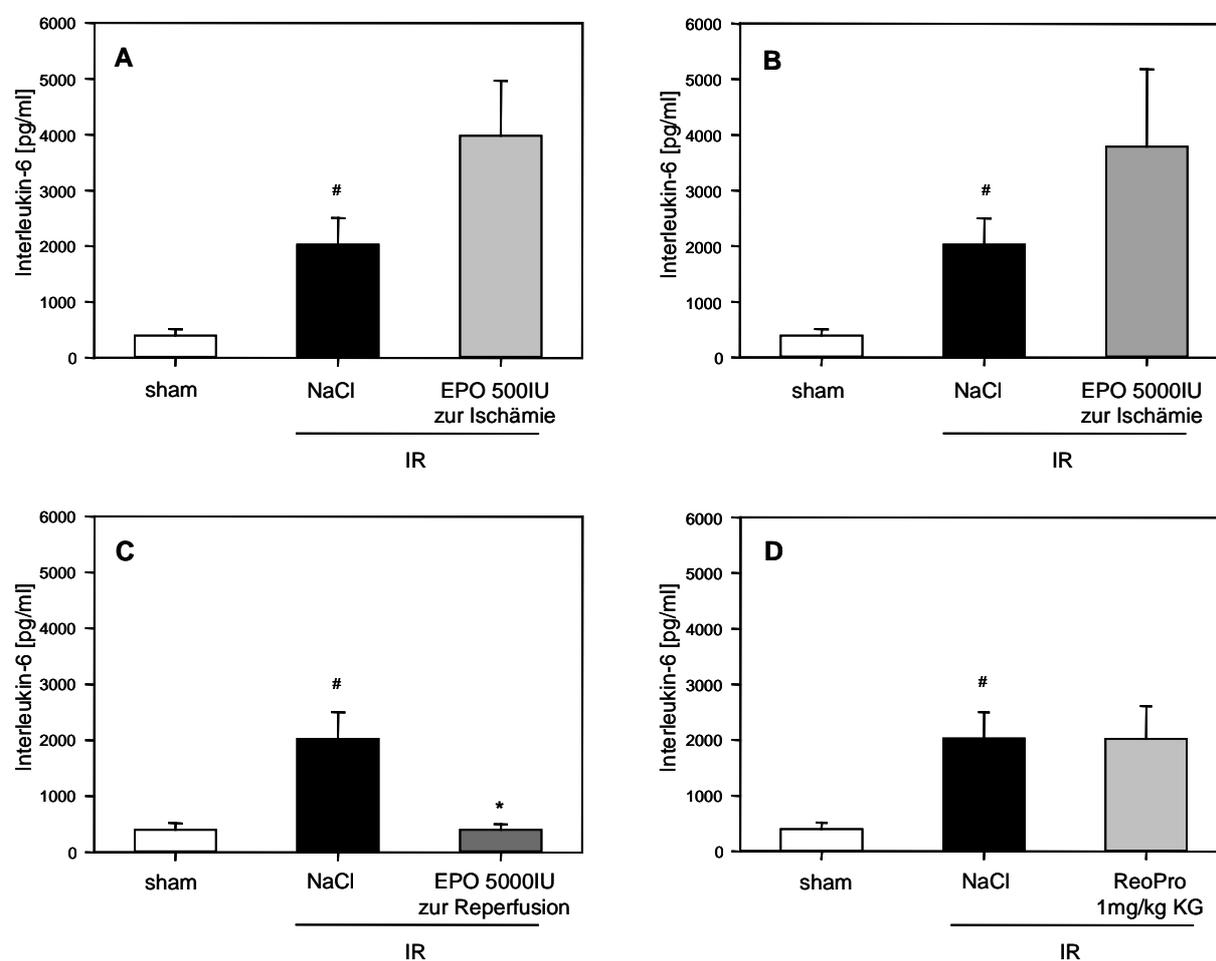


**Abbildung 22:** TNF- $\alpha$ -Konzentration nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die Injektion von ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion hatte einen deutlichen Anstieg der Zytokinaktivität von TNF- $\alpha$  im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren zur Folge (Abb. 22D).

### 6.3.2.3 Interleukin-6 (IL-6)

Nach Ischämie/Reperfusion war eine signifikante Zunahme der Interleukin-6 Plasma-konzentration zu verzeichnen ( $p < 0.05$ ). 500IU EPO und 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie führten zu einer Verdopplung der Zytokinaktivität im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (Abb. 23A/B).

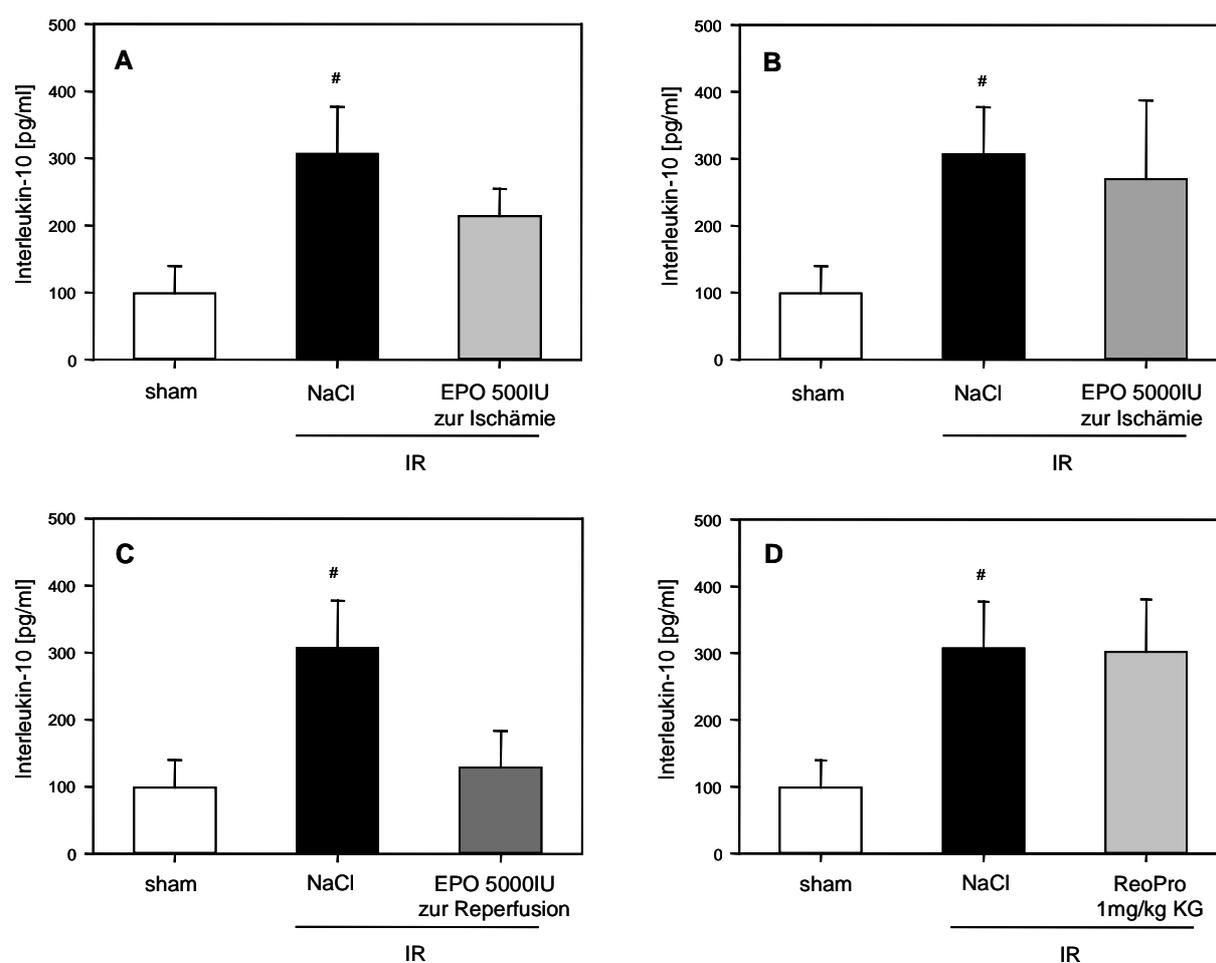


**Abbildung 23:** Interleukin-6-Konzentration nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, #  $p < 0.05$  vs. sham, \*  $p < 0.05$  vs. I/R+NaCl.

Die Behandlung mit 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion konnte die Plasmakonzentration von Interleukin-6 signifikant auf Ausgangsniveau reduzieren (Abb. 23C;  $p < 0.05$ ). ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion bewirkte keine Veränderung der I/R-induzierten Zytokinaktivität (Abb. 23D).

### 6.3.2.4 Interleukin-10 (IL-10)

Nach Ischämie/Reperfusion war eine signifikante Zunahme der Interleukin-10-Plasmakonzentration zu verzeichnen ( $p < 0.05$ ). 500IU EPO zu Beginn der Ischämie bewirkte eine Abnahme der I/R-induzierten Zytokinaktivität um 30% (Abb. 24A). Nach Applikation von 5000IU EPO zu Beginn der Ischämie war keine Veränderung der Plasmakonzentration nachzuweisen (Abb. 24B).



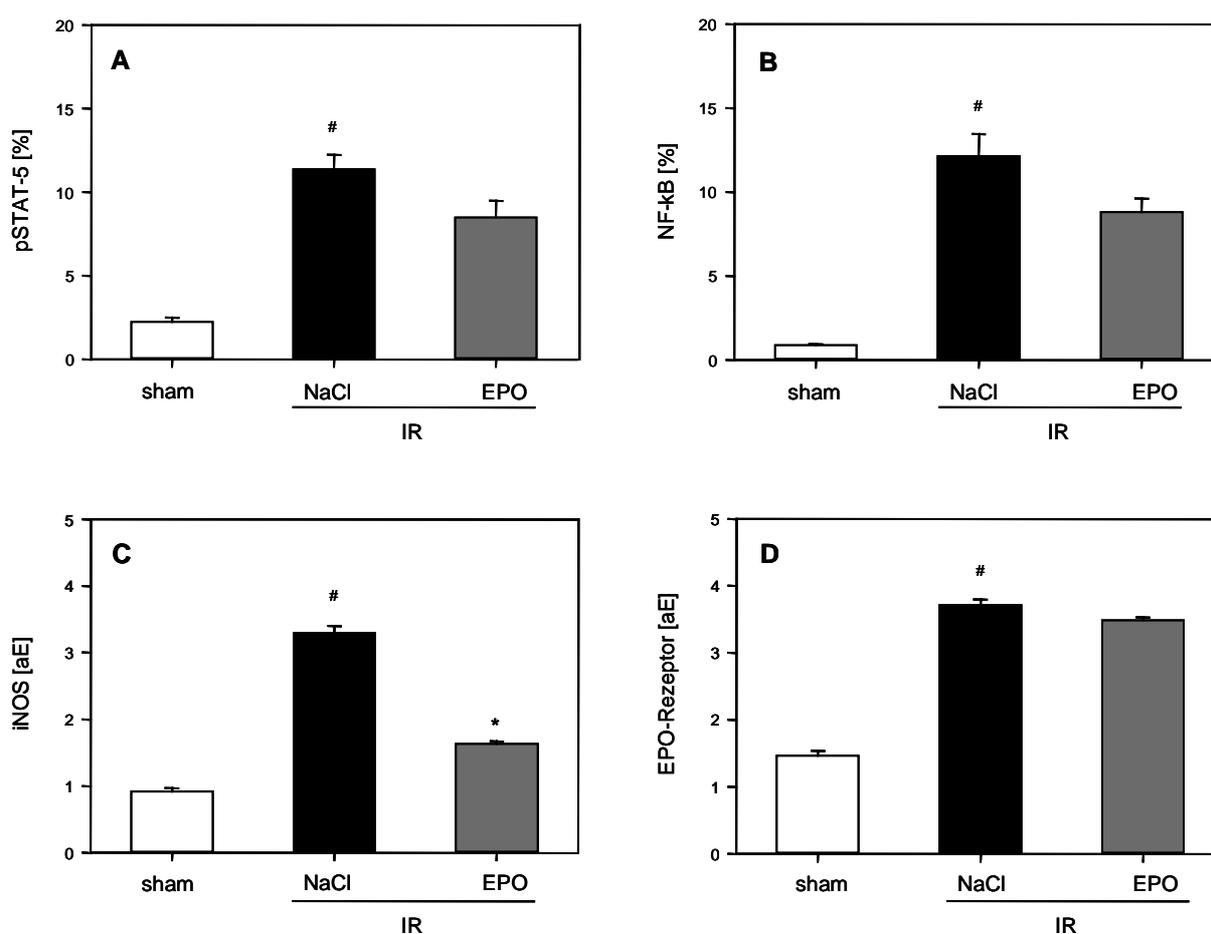
**Abbildung 24:** Interleukin-10-Konzentration nach 90-minütiger Reperfusion nach Vorbehandlung mit 500IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (A; hellgraue Säule;  $n=7$ ), 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie (B; mittelgraue Säule;  $n=6$ ) und 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (C; graue Säule;  $n=5$ ) sowie nach Vorbehandlung mit ReoPro 30 Minuten vor Reperfusion (D; hellgraue Säule;  $n=8$ ); NaCl-behandelte Tiere dienen als I/R-Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=8$ ), sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=6$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. sham.

Im Gegensatz dazu konnte die Injektion von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion die Plasma-Interleukin-10-Konzentration nach Ischämie/Reperfusion auf sham-Niveau reduzieren ( $p=0.092$ ) (Abb 24C). ReoPro 30 Minuten vor Ischämie hatte keinen Einfluss auf die I/R-induzierte Zytokinaktivität (Abb 24D).

## 6.4 Proteinexpression

### 6.4.1 Immunhistochemie

Ischämie/Reperfusion bewirkte einen signifikanten Anstieg der Expression der Transkriptionsfaktoren pSTAT-5 und NF- $\kappa$ B sowie der iNOS und des EPO-Rezeptors ( $p<0.05$ ).

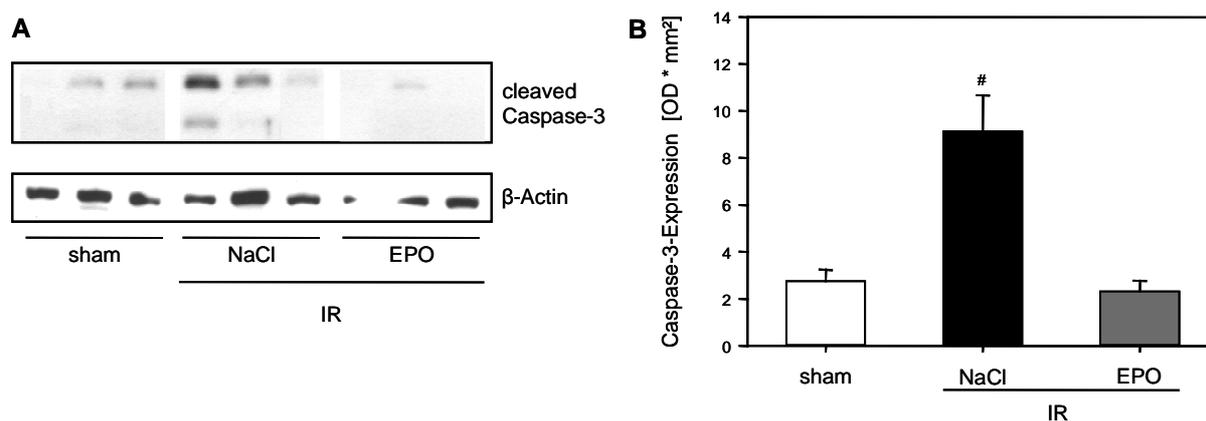


**Abbildung 25:** Quantitative immunhistochemische Auswertung der Expression von pSTAT5 (A), NF- $\kappa$ B (B) sowie iNOS (C) und EPO-Rezeptor (D) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion (graue Säulen;  $n=3$ ). NaCl-behandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen;  $n=3$ ), sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen;  $n=3$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p<0.05$  vs. sham, \* $p<0.05$  vs. I/R+NaCl.

Die Behandlung mit 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion führte zu einer deutlichen Reduktion der pSTAT-5- sowie der NF- $\kappa$ B-Expression im Lebergewebe (Abb. 25A/B). Die iNOS-Expression war durch 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion signifikant reduziert (Abb. 25C;  $p < 0.05$ ). Eine Veränderung der EPO-Rezeptor-Expression im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren war nicht zu beobachten (Abb. 25D).

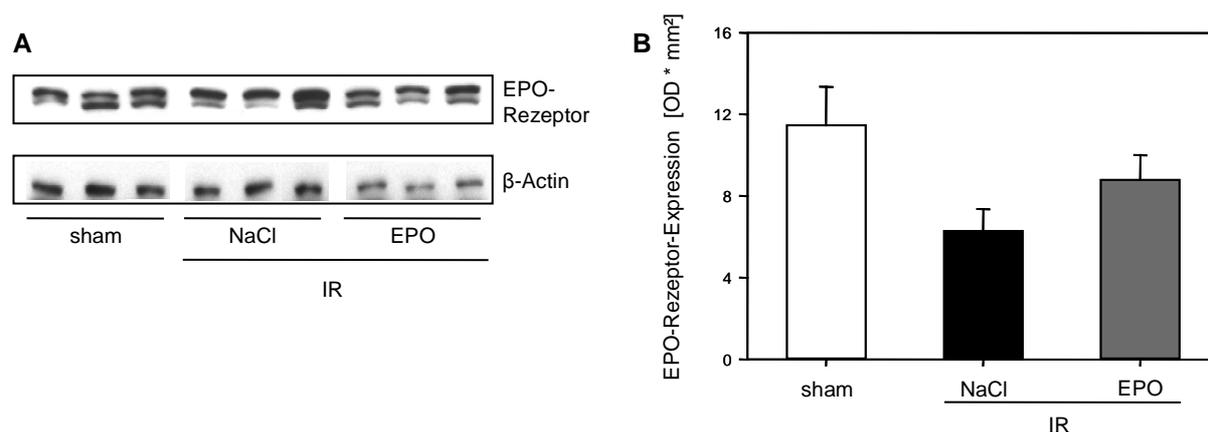
#### 6.4.2 Western blot

I/R führte zu einer signifikanten cleaved Caspase-3-Expression im Lebergewebe ( $p < 0.05$ ). Durch Applikation von 5000IU Erythropoietin zu Beginn der Reperfusion konnte die I/R-induzierte cleaved Caspase-3-Expression auf Ausgangsniveau reduziert werden (Abb. 26B)



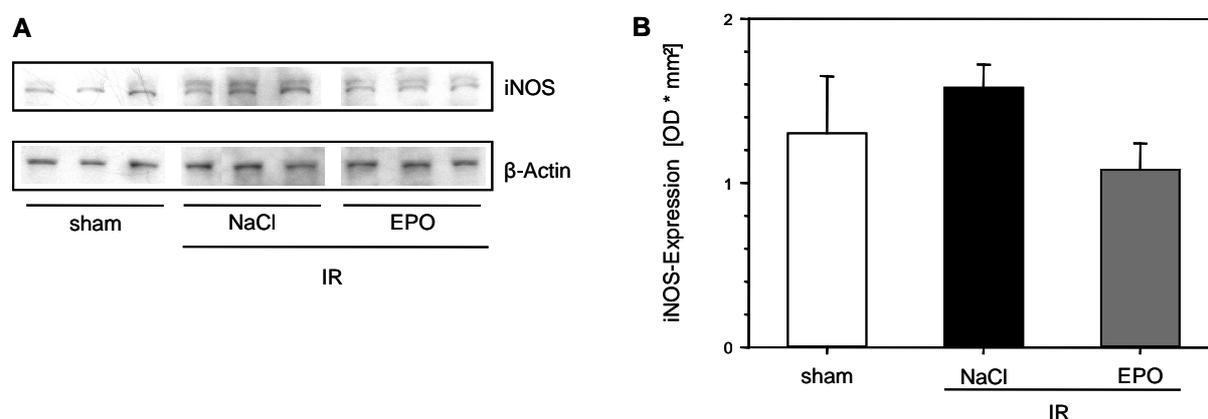
**Abbildung 26:** Repräsentative Western blots für cleaved Caspase-3 (**A**) und quantitative Auswertung der cleaved Caspase-3-Expression (**B**) im Lebergewebe von rhEPO-behandelten (graue Säule;  $n=3$ ) und NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (schwarze Säule;  $n=3$ ) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säule;  $n=3$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. sham.

Ischämie/Reperfusion führte zu einer 50%-igen Reduktion der EPO-Rezeptor-Expression im Vergleich zu sham-Kontrolltieren ( $p=0.078$ ) (Abb. 27B). Die Behandlung mit 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion führte zu keiner signifikanten Zunahme der Expression des EPO-Rezeptors (Abb. 27B).



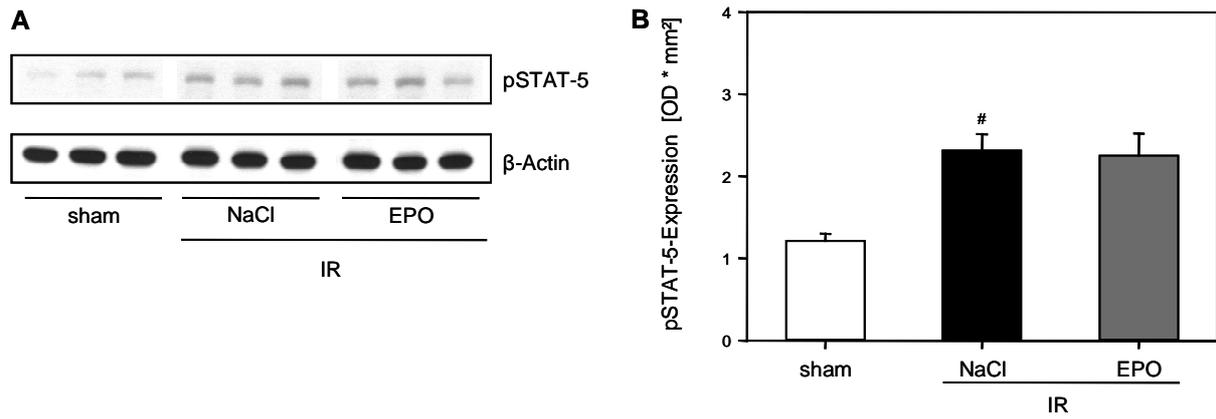
**Abbildung 27:** Repräsentative Western blots für EPO-Rezeptor (A) und quantitative Auswertung der EPO-Rezeptor-Expression (B) im Lebergewebe von rhEPO-behandelten (graue Säule; n=3) und NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (schwarze Säule; n=3) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säule; n=3). Mittelwert  $\pm$  SEM.

I/R hatte einen Anstieg der iNOS-Expression innerhalb des Lebergewebes um 18% zur Folge. Die Injektion von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion bewirkte eine deutliche Verringerung der I/R-induzierten iNOS-Expression (Abb. 28B).



**Abbildung 28:** Repräsentative Western blots für iNOS (A) und quantitative Auswertung der iNOS-Expression (B) im Lebergewebe von rhEPO-behandelten (graue Säule; n=3) und NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (schwarze Säule; n=3) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säule; n=3). Mittelwert  $\pm$  SEM.

Nach I/R war eine signifikante Zunahme der Expression von pSTAT-5 bei NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren zu verzeichnen ( $p < 0.05$ ). 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion bewirkte keine Veränderung der I/R-induzierten pSTAT-5-Expression im Lebergewebe (Abb. 29B).



**Abbildung 29:** Repräsentative Western blots für pSTAT-5 (**A**) und quantitative Auswertung der pSTAT-5-Expression (**B**) im Lebergewebe von rhEPO-behandelten (graue Säule; n=3) und NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren (schwarze Säule; n=3) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säule; n=3). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup>p<0.05 vs. sham.

## 7 Diskussion

### 7.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 7.1.1 Diskussion des Modells

Die vorliegende Untersuchung zur Analyse des Einflusses von EPO und ReoPro auf die hepatische Mikrozirkulation nach Ischämie und Reperfusion wurde an spontanatmenden, laparotomierten Ratten nach intraperitonealer Applikation des Narkotikums durchgeführt.

Experimentelle Untersuchungen zur Analyse des Pathomechanismus der durch Ischämie und Reperfusion induzierten Leberschädigung erfolgten bisher an isolierten Zellen (MAVIER et al., 1988), isoliert perfundierten Organen (WETTSTEIN und HÄUSSINGER, 1994; WYLLIE et al., 2008) oder intakten Organismen (BURKHARDT et al., 2008; JAESCHKE und FARHOOD, 1991; SATO et al., 1993). Studien an Zellkulturen, speziell an isolierten Hepatozyten, dienen zur Untersuchung spezieller zellulärer pathophysiologischer Vorgänge (LITTAUER und DEGROOT, 1992), lassen allerdings komplexe Interaktionen zwischen einzelnen Organsystemen und verschiedenen Zellpopulationen sowie mikrozirkulatorische und hämodynamische Einflussnahmen unberücksichtigt. Experimentelle Untersuchungen an isoliert perfundierten Organen ermöglichen hingegen die Untersuchung der Auswirkungen von Ischämie/Reperfusion auf das gesamte Organ. Allerdings bleiben komplexe Interaktionen zwischen einzelnen Organsystemen und humoralen und neuronalen Einflüssen sowie systemischen Veränderungen ebenfalls unberücksichtigt. Untersuchungen am intakten Organismus hingegen ermöglichen die Analyse pathophysiologischer Vorgänge unter Einfluss des Nervensystems und humoraler Kaskadensysteme. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde in der vorliegenden Studie ein *in-vivo* Modell zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation nach Ischämie/Reperfusion gewählt. Somit konnten interferierende lokale und systemische Effekte sowie positive und negative Rückkopplungsmechanismen bei der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge berücksichtigt werden (MENGER et al., 1993; MENGER et al., 1999).

Eine Narkotisierung der Tiere zum einen für die chirurgische Präparation und des Weiteren für die intravitalmikroskopische Analyse der hepatischen Mikrozirkulation war in der vorliegenden Studie unumgänglich. Als Anästhetikum diente Pentobarbital mit seiner sedati-

ven, hypnotischen und narkotisierenden Wirkung. Allerdings sind bei der Verwendung von Barbituraten innerhalb des anästhetisch wirksamen Dosisbereichs eine erhebliche Atem- und Kreislaufdepression sowie eine ausgeprägte Induktion mikrosomaler Enzyme der Leber zu berücksichtigen (LONGNECKER und SEYDE, 1986). Dies gilt insbesondere für die laborchemische Analyse der Lebertransaminasen. In der vorliegenden Studie wurden die Plasmakonzentration der Transaminasen als Maß für die durch Ischämie/Reperfusion-induzierte Leberschädigung angesehen. Eine fälschliche Erhöhung der Transaminasen als Folge der Barbiturat-Narkose kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Jedoch war in unserer Studie die Barbiturat-Dosierung streng an das Körpergewicht der Versuchstiere angepasst, so dass die Transaminasen allenfalls im Sinne eines systematischen Fehlers erhöht waren.

Die Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie der Leber erforderte die Laparotomie der Versuchstiere und die Auslagerung des linken Leberlappens. Gelman postulierte, dass ein chirurgisches Trauma, insbesondere bei abdominalen Operationen, zu einer signifikanten Veränderung der Leberdurchblutung führt (GELMAN, 1976). Er bezeichnete das chirurgische Trauma sogar als Hauptursache für eine gestörte Mikrozirkulation bei abdominalen Eingriffen. Analysen der Leberdurchblutung an Ratten mit Hilfe von radioaktiv markierten Mikrosphären ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen laparotomierten und nicht-laparotomierten Tieren (KERNER, 1993). Das Ausmaß der Beeinflussung von Durchblutung und Funktion der Leber durch die chirurgische Präparation und das Narkoseverfahren konnte für die vorliegende Studie nicht gänzlich beurteilt werden, da die Durchführung von Vergleichsmessungen am wachen, nicht-laparotomierten Tier aus methodologischen und ethischen Gründen nicht möglich war.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Akut-Modellen zur intravitalmikroskopischen Untersuchung von Organsystemen und der quantitativen Analyse der Mikrozirkulation etabliert. Mittels Epi-Illumination und *in-vivo* Fluoreszenzmikroskopie konnte die Mikrozirkulation von Gehirn (VILLRINGER et al., 1989), Herz (SCHRAMM et al., 2007; VOLLMAR et al., 1995a), Lunge (GROH et al., 1994; KUHNLE et al., 1993), Pankreas (VOLLMAR et al., 1994b), Magen (KOO, 1982), Darm (BOHLEN und GORE, 1976), Milz (MCCUSKEY und MCCUSKEY, 1977) und Niere (STEINHAUSEN et al., 1981) sowie von Knochen (WINET, 1989), Haut (BARKER et al., 1989), Skelettmuskel (CONTALDO et al., 2007; MENGER et al., 1992a/b) und Leber (ABSHAGEN et al., 2006; MENGER et al., 1991) quantitativ beurteilt werden. Die Auslagerung des linken Leberlappens nach medianer Laparotomie erlaubte durch die Anwendung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie die quantitative Analyse mikrohämodynamischer Parameter innerhalb der Sinusoide sowie post-sinusoidaler Venulen (MENGER et al., 1991). Weiterhin wurde durch Applikation spezieller Fluoreszenzmarker

eine Untersuchung individueller Zellfunktionen wie beispielsweise die Kupferzell-Phagozytose-Aktivität ermöglicht.

Darüber hinaus wurden vergleichbare Methoden zur Analyse des hepatozytär-billiären Transports spezifischer Substanzen (GUMUCIO et al., 1981) sowie zur Beurteilung der Motilität biliärer Canaliculi (WATANABE et al., 1991) eingesetzt.

Für die intravitalmikroskopische Analyse der hepatischen Mikrozirkulation wurden die Tiere um 45° in ihrer Längsachse nach links geneigt und der linke Leberlappen mit der Unterseite nach oben, horizontal auf einen Mikromanipulator ausgelagert. Eine mögliche Beeinflussung der Perfusion des Leberlappens durch Zug oder Torsion am Gefäßstiel konnte somit ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurden hydrostatische Effekte, die die hepatische Mikrozirkulation und den venösen Rückstrom zum Herzen beeinflussen könnten, durch die Positionierung des linken Leberlappens auf Herzhöhe vermieden. Das in der vorliegenden Studie verwendete Modell sowie die Durchführung von Präparation und intravitaler Fluoreszenzmikroskopie stellen ein standardisiertes Verfahren zur quantitativen Analyse der hepatischen Mikrozirkulation dar, und wurde bereits in einer Vielzahl vorhergegangener Studien entsprechend durchgeführt (BURKHARDT et al., 2008; VOLLMAR et al., 1994a).

Die Akutpräparation der Leber zeigte in dieser Studie morphologisch und lichtmikroskopisch normales Leberparenchym, intaktes mikrovaskuläres Endothel und unauffällige nicht-parenchymatöse Zellpopulationen (Kupferzellen, Itozellen). Unter physiologischen Bedingungen befand sich die sinusoidale Perfusionsrate bei circa 96%. Dies ist vergleichbar mit Angaben aus der Literatur, worin die sinusoidale Perfusionsrate bei Ratten unter physiologischen Bedingungen mit >98% angegeben wurde (MENGER et al., 1991; POST et al., 1993).

Durch Okklusion des Pedikels des linken Leberlappens mittels eines Yasargil Gefäßclips wurde eine selektive Ischämie des linken Leberlappens induziert (BURKHARDT et al., 2008; NAUTA et al., 1990). Die Reperfusionsphase wurde durch das Entfernen des Clips eingeleitet. Bedingt durch die lobulierte Struktur der Rattenleber und die gute Darstellungsmöglichkeit der biliären Gefäße gestaltete sich die Okklusion des Pedikels des linken Leberlappens unproblematisch. Die richtige Positionierung des Gefäßclips und die somit erfolgreiche Induktion der Ischämie zeigten sich durch ein sofortiges Abblassen und eine im Verlauf livide Verfärbung des gesamten linken Leberlappens.

Die Induktion der Ischämie kann neben der Okklusion des Pedikels eines bestimmten Leberlappens auch durch Okklusion des *Ligamentum hepatoduodenale*, was zu einer Ischämie der gesamten Leber führt, induziert werden. Dieses Verfahren geht auf J. Hogarth

Pringle zurück, der 1908 durch die temporäre Okklusion des *Ligamentum hepatoduodenale*, auch bekannt als Pringle Manöver, eine Methode zur Limitierung des Blutverlustes bei großen operativen Eingriffen an der Leber beschrieb (PRINGLE JH, 1908).

Dieses Verfahren der Ischämieinduktion beinhaltet jedoch neben der ischämisch bedingten Schädigung des Leberparenchyms auch pathophysiologische Auswirkungen, die den gesamten Organismus betreffen. Im Rahmen der kompletten Unterbrechung des Pfortaderkreislaufs mit konsekutiver venöser Kongestion im Splanchnikusgebiet konnten Beach und Mitarbeiter eine bis zu 60%-ige Reduktion des zirkulierenden Blutvolumens in Folge einer massiven Flüssigkeitstransduktion in den interstitiellen Raum beobachten (BEACH et al., 1965). Vollmar und Co-Autoren berichteten zudem von einer systemischen Hypotension, Hämokonzentration sowie einem portalvenösen „pooling“ des Blutes im Rahmen des Pringle Manövers (VOLLMAR et al., 1996a). Des Weiteren berichteten Jolly und Co-Autoren von einer zunehmenden Laktatazidose und Hyperkaliämie als Folge anaerober Stoffwechselbedingungen (JOLLY und FOSTER, 1963). Beach und Mitarbeiter machten zudem die massive Einschwemmung saurer Metabolite in den systemischen Kreislauf nach Wiedereröffnung der portalvenösen Zirkulation als eine der Hauptursachen für die hohe Letalität dieser Eingriffe verantwortlich (BEACH et al., 1965).

Eine Divergenz hinsichtlich der maximal tolerierbaren Ischämiedauer bei verschiedenen Spezies ist bei experimentellen Untersuchungen zur Okklusion des *Ligamentum hepatoduodenale* zu beobachten, was in der unterschiedlichen Ausprägung portosystemischer Shunts begründet liegt (CHILD et al., 1950; BEACH et al., 1965). Diesen portosystemischen Shunts wurde von Mackenzie und Co-Autoren ein protektiver Effekt in Bezug auf die portalvenöse Kongestion zugeschrieben (MACKENZIE et al., 1977). In der vorliegenden Studie wurde eine 90-minütige selektive Ischämie des linken Leberlappens induziert, da die hepatische Mikrozirkulation nach Ischämie/Reperfusion ohne die im Rahmen der Okklusion des *Ligamentum hepatoduodenale* auftretende venöse Kongestion untersucht werden sollte. Zudem wäre im Gegensatz zum Menschen eine 90-minütige Okklusion des *Ligamentum hepatoduodenale* nicht mit dem Überleben der Tiere vereinbar gewesen (HUGUET et al., 1978; GONCE et al., 1995).

### 7.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde als Untersuchungstechnik der hepatischen Mikrozirkulation nach I/R gewählt. Diese Untersuchungstechnik ermöglicht eine direkte Visualisierung sowie die Analyse individueller Segmente der hepatischen Mikrozirkulation (MENGER et al., 1991).

Als direkte Technik ist die intravitale Fluoreszenzmikroskopie sogenannten indirekten Verfahren zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation überlegen. Als indirekte Verfahren zählen beispielsweise die Mikrosphären-Technik (VOLLMAR et al., 1992), die Indikatorverdünnungsmethode (WANG et al., 1992), die Szintigraphie (TAGGE et al., 1987), die H<sub>2</sub>-Clearance-Technik (ASHER et al., 1983), die Rückstreuungsspektrophotometrie (CHÁVEZ-CARTAYA et al., 1995), die Thermodilution (SATO, 1987), die Laser-Doppler Flowmetrie (VOLLMAR et al., 1994a), die Partialdruckmessung des Gewebe-Sauerstoffs (VOLLMAR et al., 1992), Farbstofftechniken (ELIAS und PETTY, 1953) sowie Techniken zur Anfertigung von Mikrokorrosionspräparaten (RIEDEL und MORAVEC, 1959).

Modelle zur intravitalmikroskopischen Analyse der hepatischen Mikrozirkulation wurden bislang an Fröschen (KNISELY, 1936), Mäusen (ABSHAGEN et al., 2006; RAPPAPORT, 1977), Meerschweinchen (IRWIN und MACDONALD, 1953), Hamstern (MENGER et al., 1991), Kaninchen (MCCUSKEY, 1966), Ratten (KLINTMAN et al., 2002; MENGER et al., 1991), Hunden und Affen durchgeführt (BLOCH, 1955).

Die mikroskopische Analyse der hepatischen Mikrozirkulation kann sowohl in Epi-Illumination (Auflicht) als auch in Trans-Illumination (Durchlicht) erfolgen. Das einsehbare Areal wird in der Trans-Illumination auf die äußeren 0.5-1mm eines Leberlappenrandes beschränkt. Dadurch erfolgt eine Begrenzung der untersuchten Lobuli auf eine geringe Anzahl. Ebenso sind nur qualitative Angaben zur Leukozytenadhärenz (REILLY et al., 1983) beziehungsweise zur Phagozytose-Aktivität der Kupfferzellen möglich (BLOCH und MCCUSKEY, 1977). Kritisch bei dieser Technik zu berücksichtigen bleibt zudem, inwieweit eine Untersuchung des Leberrandes physiologischen Bedingungen entspricht, da selbst unter Normalbedingungen ein erheblicher Teil der Sinusoide des Leberrandes nicht perfundiert sind (EGUCHI et al., 1991).

Die Epi-Illumination und die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht hingegen die Untersuchung größerer Leberareale und die Analyse von mikrozirkulatorischen als auch zellulären Mechanismen.

In Folge der Vielzahl intravitalmikroskopischer Parameter war eine Echtzeit-Analyse der Mikrozirkulation nicht realisierbar. Durch Dokumentation der intravitalmikroskopischen Bilder mit Hilfe einer hoch auflösenden CCD-Kamera (HIRAOKA et al., 1987) und einer Videoaufzeichnungseinheit (ELLIS et al., 1986) konnte die quantitative Analyse der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter nach Abschluss der Versuche „off-line“ an einer computer-gestützten Auswerteeinheit erfolgen. Mittels Zeitlupe, Bild-zu-Bild-Analyse oder Standbild konnten auch komplexe, rasch ablaufende Vorgänge erfasst werden (MENGER et al., 1991).

Die Auswertung der einzelnen Videosequenzen kann zudem manuell als auch computergestützt erfolgen. Die Methode der computergestützten Analyse der einzelnen Parameter bietet den Vorteil einer wesentlich rationelleren Quantifizierung der untersuchten Parameter, wodurch in kurzer Zeit eine sehr große Datenmenge erarbeitet werden kann (ELLIS et al., 1986). Die Nachteile einer computergestützten Auswertung liegen in der Beeinflussung der Auswertung durch Bewegungsartefakte (ZEINTL et al., 1986) und in der Notwendigkeit eines konstanten, hohen Signalverhaltens der zu untersuchenden Objekte. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Anwendung automatisierter Verfahren zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation (KOO und LIANG, 1977). Diese beinhalten jedoch gerade in Bezug auf die Analyse der hepatischen Mikrozirkulation in Folge der Atemexkursionen der Leber zahlreiche Probleme, da eine absolute Ruhigstellung des Organs in Folge der Verwachsung mit dem Zwerchfell im Bereich der *Area nuda* nicht erreicht werden kann. Der linke Leberlappen wurde in der vorliegenden Studie zur Ausschaltung von Atemexkursionen auf einen Mikromanipulator ausgelagert. Die somit erreichte Reduktion der Atemexkursionen war zur manuellen und computergestützten Auswertung der einzelnen Parameter völlig ausreichend.

Um eine Induktion photodynamischer Prozesse in Folge einer längeren Lichtexposition während der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zu vermeiden, wurde die Belichtung eines Gesichtsfeldes auf maximal 60 Sekunden und die Gesamtdauer der Mikroskopie auf 10-15 Minuten beschränkt (MENGER et al., 1994). Die Auswahl von Gesichtsfeldern in der Nähe bereits belichteter Gesichtsfelder konnte auf Grund der zur Verfügung stehenden Leberoberfläche von circa 6cm<sup>2</sup>, welche morphologisch circa 2000 Leberazini entspricht, vermieden werden.

Das sinusoidale Perfusionsversagen stellt einen wichtigen Parameter in der Analyse der nutritiven Perfusion dar. Die quantitative Beurteilung erfolgte durch die Auswertung der einzelnen Gesichtsfelder, die als Ellipsen betrachtet und als entsprechende Schablonen auf den Videomonitor aufgelegt wurden. Die Ellipsen sind in Anlehnung an die zonale Unterteilung des Lobulus (RAPPAPORT, 1973) entlang der Flussrichtung des Blutes in drei Segmente gleicher Länge unterteilt und entsprechen einem Sechstel eines hepatischen Lobulus. Bei bekannter Fläche erlauben die Ellipsen die Umrechnung mikrohämodynamischer Parameter auf mm<sup>2</sup> Leberoberfläche. Diese Methode der quantitativen Analyse der hepatischen Mikrozirkulation mittels Epi-Illuminationstechnik wurde bereits in zahlreichen experimentellen Untersuchungen der Leber bei Schock (VOLLMAR et al, 1993b), Ischämie/Reperfusion (MENGER et al., 1993), Endotoxinämie/Sepsis (VOLLMAR et al, 1993a) und Lebertransplantation (POST et al., 1992; VOLLMAR et al., 2002) durchgeführt.

Eine alternative Methode zur Analyse des sinusoidalen Perfusionsversagens mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie wurde von Clemens 1985 durchgeführt. Unter Verwendung von Fluoreszein-markiertem Albumin wurde die mikrovaskuläre Perfusion ermittelt, indem eine 200µm lange Linie im 90° Winkel über die Sinusoide gelegt und die Anzahl der Sinusoide, welche mit Erythrozyten perfundiert waren und gleichzeitig die Linie kreuzten, gezählt wurde. Die sinusoidale Perfusion wurde als Anzahl perfundierter Sinusoide pro 200µm angegeben. Unter physiologischen Bedingungen konnte ein Perfusionsversagen von den Autoren nicht beobachtet werden (CLEMENS et al., 1985). Eine zonale Differenzierung des sinusoidalen Perfusionsversagens und damit eine Aussage über die Heterogenität der Perfusion innerhalb eines Lobulus ist durch diese Methode jedoch nicht möglich.

Die quantitative Beurteilung der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung erfolgte durch Auswertung der entsprechenden Gesichtsfelder nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin 6G. Die einzelnen Gesichtsfelder wurden wiederum als Ellipsen betrachtet und entsprechende Schablonen auf den Videomonitor aufgelegt. Diese Methode der quantitativen Analyse der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung mittels Epi-Illuminationstechnik wurde bereits in zahlreichen Studien angewendet (MENGER et al., 1993). Die Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität gilt als weitere Methode zur Beurteilung der leukozytären Gewebeeinfiltration (JAESCHKE et al., 1990). Es konnte eine lineare Korrelation zwischen Myeloperoxidase-Aktivität (MPO) und der Anzahl von Leukozyten in einer Zellsuspension nachgewiesen werden (KOMATSU et al., 1992). Allerdings ist bei dieser Methode zu berücksichtigen, dass vor Bestimmung der MPO-Aktivität die Organe entnommen und mit einer Spüllösung perfundiert werden müssen, da sonst neben den gewebeständigen Leukozyten auch intravasal vorliegende Leukozyten erfasst werden (BARONE et al., 1991). Eine gezielte Analyse im Hinblick auf eine zonale Differenzierung der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung ist durch diese Methode ebenfalls nicht möglich.

Als Indikatoren zur Beurteilung der Leberschädigung nach Ischämie/Reperfusion dienen weiterhin der Gehalt an energiereichen Phosphaten im Lebergewebe (PELIAS und TOWNSEND, 1992), der Gallefluss (RAO et al, 1990) sowie die hepatische Proteinbiosynthese (HASSELGREN et al., 1982). Experimentelle Untersuchungen an Ratten konnten zeigen, dass der Gallefluss mit dem Ausmaß der ischämischen Gewebeschädigung korreliert (BOWERS et al., 1987). Des Weiteren wurde eine direkte Korrelation des Galleflusses mit dem lebervenösen pO<sub>2</sub> (LARSEN et al., 1976) sowie dem hepatozytären Gehalt an energiereichen Phosphaten (KARWINSKI et al, 1989) beobachtet. Somit ermöglichte die Bestimmung des Galleflusses eine Aussage über die Sauerstoffversorgung der Leber und deren zellulären Energiestoffwechsel und ist hinsichtlich Praktikabilität dem chromatographischen

Nachweis energiereicher Phosphate und der Beurteilung der hepatischen Proteinbiosynthese überlegen.

Die Erhöhung leberspezifischer Transaminasen im Plasma stellt das Korrelat einer gestörten hepatozellulären Integrität unterschiedlicher Genese dar. Farkouh und Co-Autoren konnten zeigen, dass mit steigender Dauer der Leberischämie die Aktivität sowohl von AST als auch von ALT im Plasma ansteigt (FARKOUH et al., 1971). Durch die gleichzeitige Bestimmung zytoplasmatisch und mitochondrial lokalisierter Enzyme war eine Differenzierung hinsichtlich des Ausmaßes der Leberschädigung möglich. Während mitochondrial lokalisierte Enzyme wie beispielsweise GLDH erst bei Nekrose der Hepatozyten und mitochondrialer Desintegrität im Plasma nachweisbar sind, gelangen zytoplasmatische Enzyme wie ALT und LDH bereits bei leichter Schädigung des Lebergewebes ins Plasma (NISHIMURA et al., 1986).

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF- $\alpha$  und IL-6 erfolgte mittels ELISA-Technik und diente als Maß für die systemische Entzündungsreaktion (STENVINKEL et al., 2005).

Mittels immunhistochemischer Färbung beziehungsweise Western blot-Analysen konnte die Expression der am I/R-induzierten Leberschaden beteiligten Signaltransduktionsfaktoren wie beispielsweise pSTAT-5 beziehungsweise NF- $\kappa$ B quantifiziert werden.

## **7.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **7.2.1 Auswirkungen von I/R auf die hepatische Mikrozirkulation**

#### **7.2.1.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie**

Die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Schädigung der hepatischen Mikrozirkulation resultiert aus einer verminderten Bereitstellung von Sauerstoff und führt somit zur Hypoxie der Zellen. Die daraus resultierende verminderte Bereitstellung energiereicher Substrate des Zellstoffwechsels, wie beispielsweise Adenosintriophosphat (ATP), führt durch Zusammenbrechen des strukturerhaltenden Zellstoffwechsels zum Verlust der zellulären Integrität und letztendlich zum Tod der Zellen (GRUNE et al., 1993). Hierbei gilt das Ausmaß

des sinusoidalen Perfusionsversagens als die entscheidende Determinante für die Dimension des postischämischen Reperfusionsschadens (VOLLMAR et al., 1994a; CHUN et al., 1994). Unterschiedlich lange Ischämie- und Reperusionszeiten haben allerdings verschiedene Auswirkungen auf das Ausmaß des I/R-induzierten sinusoidalen Perfusionsversagens, insofern, als dass eine Verlängerung der Ischämiedauer in einer Zunahme des sinusoidalen Perfusionsversagens resultiert (CHUN et al., 1994; CLEMENS et al., 1985; FERGUSON et al., 1993; WANNER et al., 1996). Dem gegenüber ist das sinusoidale Perfusionsversagen in der frühen Reperusionsphase zu unterschiedlichen Reperusionszeiten zwischen 30min und 120min bei ca. 20-25% zunächst zeitunabhängig (KHANDOGA et al., 2006; BURKHARD et al., 2008). In der vorliegenden Studie wurde das in unserem Institut favorisierte Modell einer 90-minütigen selektiven Ischämie des linken Leberlappens mit konsekutiver 90-minütiger Reperfusion gewählt (VOLLMAR et al., 1996b). Das durch dieses Protokoll induzierte sinusoidale Perfusionsversagen lag bei ~22% und war somit vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls diese Ischämie-/Reperusionszeiten genutzt haben (CLEMENS et al., 1985).

Die inflammatorische Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ist ein mehrstufiger Prozess, welcher durch eine Vielzahl humoraler Faktoren und zellulärer Moleküle vermittelt wird (BAGGIOLINI, 1995; CARLOS et al., 1994). Die letztendlich resultierende transendotheliale Migration von Leukozyten sowie die Freisetzung lysosomaler Enzyme und reaktiver Sauerstoffmetabolite führen zur Schädigung des Gewebes (FREEMAN und CRAPO, 1982; ANDERSON et al., 1991). Dieser Rezeptor-vermittelten Adhäsion der Leukozyten am venulären Endothel steht die durch rheologisch-mikrohämodynamische Parameter induzierte sinusoidale Leukostase entgegen.

Durch vorausgegangene Studien wurde gezeigt, dass Ischämie und Reperfusion eine Akkumulation von Leukozyten in der hepatischen Mikrozirkulation induzieren (VOLLMAR et al., 1994c), und dass die I/R-induzierte Leukozytenakkumulation in post-sinusoidalen Venulen im Gegensatz zu hepatischen Sinusoiden durch spezifische Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise ICAM-1 vermittelt wird (VOLLMAR et al., 1995b). Als Ausdruck der durch Ischämie und Reperfusion induzierten inflammatorischen Reaktion konnten in der vorliegenden Studie sowohl die in der Literatur beschriebene Zunahme der sinusoidalen Leukostase (VOLLMAR et al., 1994c; VOLLMAR et al., 1996b) als auch der venulären Leukozytenadhärenz (MENGER et al., 1992a; VOLLMAR et al., 1996b) nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde in dieser Studie die Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität anhand der Elimination fluoreszenzmarkierter Latexpartikeln aus der hepatischen Mikrozirkulation analysiert (VOLLMAR et al., 1994d). Untersuchungen zur Lebertransplantation zeigen, dass durch kalte Ischämie eine Aktivierung der Kupfferzellen zu beobachten ist (CALDWELL-KENKEL et al., 1991). Auch in Bezug auf die warme Ischämie der Leber wurde initial eine Aktivierung

der Kupfferzellen beschrieben (VOLLMAR et al., 1994d). Im Gegensatz dazu konnten Vollmar und Co-Autoren jedoch nachweisen, dass eine Verlängerung der Ischämiedauer zu einer deutlichen Einschränkung der Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität führt (VOLLMAR et al., 1994d). In dem hier verwendeten Modell der 90-minütigen selektiven Ischämie des linken Leberlappens mit konsekutiver 90-minütiger Reperfusion konnte die I/R-bedingte Beeinträchtigung der Kupfferzellen und die daraus resultierende Reduktion der Phagozytose-Aktivität ebenfalls gezeigt werden. Aus der eingeschränkten Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität resultiert eine deutlich erhöhte Mortalität (HOLPER et al., 1974; CRAFA et al., 1991), was die Bedeutung einer intakten lokalen Immunantwort nach Ischämie/Reperfusion betont.

Der apoptotische Zelltod stellt letztendlich das gemeinsame Korrelat der durch I/R-induzierten inflammatorischen Reaktion und des Versagens der hepatischen Mikrozirkulation dar (JAESCHKE, 2003). In der vorliegenden Studie war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Chen und Co-Autoren eine Zunahme der hepatozellulären Apoptoserate nach Ischämie/Reperfusion feststellbar (CHEN et al., 2006). Derzeit findet sich in der aktuellen Literatur eine intensive Diskussion über das Ausmaß der hepatozellulären Apoptose nach Ischämie und Reperfusion. Während aus der Arbeitsgruppe um Jaeschke eine Apoptoserate von ca. 1% berichtet wird (GUJRAL et al., 2001), können Kohli und Mitarbeiter in einem vergleichbaren Modell über 60% apoptotischer Hepatozyten nachweisen (KOHLI et al., 1999b). In der vorliegenden Studie war das Ausmaß der I/R-bedingten hepatozellulären Apoptose von ca. 1% zwar nur sehr gering, aber durchaus vergleichbar mit den Ergebnissen von Gujral und Co-Autoren (GUJRAL et al., 2001).

### **7.2.1.2 Gewebeintegrität und Funktion**

Bedingt durch die inflammatorische Gewebereaktion führen Ischämie und Reperfusion zur histomorphologischen Veränderung des Leberparenchyms. Als maßgebliche Methode wurde die standardhistologische Untersuchung des Gewebes an HE-gefärbten Schnitten durchgeführt, welche derzeit als der Gold-Standard angesehen wird (JAESCHKE et al., 2001). Der I/R-bedingte Leberschaden ist charakterisiert durch eine starke Ausprägung verschiedener histomorphologischer Merkmale, wie zytoplasmatische Vakuolisierung und Grobscholligkeit sowie sinusoidale Kongestion. Diese Parameter wurden an Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gewebepräparate lichtmikroskopisch semiquantitativ analysiert (SCHÖN et al., 1998). Grundlage der semiquantitativen Auswertung war ein Score-System, welches von Suzuki und Mitarbeitern entwickelt worden ist, und dem Ausprägungsgrad des jeweiligen Merkmals einen Score-Wert zuordnet (SUZUKI et al., 1993). Wohingegen in gesundem, nicht-ischämischem Lebergewebe Vakuolisierung, Grobscholligkeit und sinusoidale Kongestion in

nur sehr geringem Ausmaß auftreten, ist der I/R-induzierte Leberschaden mit einer massiven Zunahme dieser histomorphologischen Veränderungen assoziiert (VARADARAJAN R et al., 2004). Diese charakteristischen I/R-induzierten Veränderungen konnten auch in der vorliegenden Studie demonstriert werden, und dienten zur Quantifizierung des Leberschadens nach selektiver Ischämie und Reperfusion des linken Leberlappens.

Zur quantitativen Analyse der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung diente die standardhistologische Quantifizierung CAE-gefärbter Leukozyten. Mit Hilfe dieser Technik kann durch ein stabiles Naphthol-AS-D Chlorazetat die Esterase-Aktivität im Zytoplasma von reifen und unreifen Neutrophilen nachgewiesen werden (MOLONEY WC et al., 1960). Als Ausdruck der I/R-induzierten intrahepatischen Leukozytenrekrutierung (VOLLMAR et al., 1996b) konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls nach Ischämie/Reperfusion eine Zunahme CAE-positiver Leukozyten im Lebergewebe nachgewiesen werden.

Der durch Ischämie und Reperfusion bedingte Verlust der hepatozellulären Integrität resultierte in Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Vollmar und Mitarbeitern in einer signifikant erhöhten Plasmakonzentration der Alanin-Aminotransferase (ALT) sowie der Aspartat-Aminotransferase (AST) (VOLLMAR et al., 1995b). Zudem führte Ischämie/Reperfusion zu einem Anstieg der Laktat-Dehydrogenase-Aktivität im Plasma. Die gestörte mitochondriale Integrität und damit das Ausmaß der durch Ischämie und Reperfusion induzierten Leberschädigung spiegelte sich, wie auch von Glanemann et al. berichtet, in einer deutlich erhöhten Plasmakonzentration der mitochondrial lokalisierten Glutamat-Dehydrogenase wieder (GLANEMANN et al., 2003). Allerdings kann durch erhöhte Plasmakonzentrationen von ALT und AST weder auf die Art der hepatozellulären Schädigung, noch auf die Reversibilität der Schädigung geschlossen werden, da auch ein reversibler hepatozellulärer Schaden mit erhöhten Plasmaenzymaktivitäten einhergehen kann (NISHIMURA et al., 1986).

Aufgrund der Korrelation des Galleflusses mit dem Ausmaß der ischämischen Gewebeschädigung (BOWERS et al., 1987) und dem hepatozytären Gehalt an energiereichen Phosphaten (KARWINSKI et al., 1989), erlaubt die Bestimmung der Galleexkretion eine Aussage über die Sauerstoffversorgung der Leber und deren Energiestoffwechsel im Rahmen von Ischämie und Reperfusion. Es ist bekannt, dass die Galleexkretion bei Zuständen eingeschränkter Organperfusion, wie z.B. Endotoxinämie (VON ALLMEN et al., 1992) oder Ischämie/Reperfusion (LEE et al., 2000), abnimmt. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in der vorliegenden Studie sowohl während Ischämie, wie auch während der über die Phase der Ischämie hinaus bestehenden Hypoxie der Zellen bei Reperfusion (no-reflow) eine Verminderung der hepatozellulären Exkretionsfunktion und damit eine Einschränkung des Galleflusses (BOWERS et al., 1987). Letztendlich spiegelt die nachgewiesene Reduktion der Galleexkretion die durch das Versagen der hepatischen Mikrozirkulation

hervorgerufene Abnahme der Sauerstoffversorgung und daraus resultierend des ATP-Gehaltes des Gewebes wider (LARSEN et al., 1976; KARWINSKI et al., 1989).

Die Induktion und Aufrechterhaltung der bei Ischämie und Reperfusion stattfindenden Inflammation erfolgt durch pro-inflammatorisch wirkende Zytokine. TNF- $\alpha$  sowie Interleukin-6 sind Mediatoren, die maßgeblich an der durch I/R induzierten inflammatorischen Reaktion beteiligt sind (JAESCHKE und LEMASTERS, 2003; RODRIGUEZ-YANEZ und CASTILLO, 2008). Erhöhte Plasmakonzentrationen von TNF- $\alpha$  konnten von Suzuki et al. bereits 5 Minuten nach Einsetzen der Reperfusion beobachtet werden (SUZUKI et al., 1994). Die Gegenregulation der Inflammation erfolgt mittels Interleukin-10, dessen Synthese durch Interleukin-6 induziert wird. Durch Unterdrückung der mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , Chemokinen und Adhäsionsmolekülen führt Interleukin-10 zur Begrenzung der Ischämie/Reperfusion-induzierten Gewebeschädigung (YOSHIDOME et al., 1999). Auch in unserer Studie waren die Plasmakonzentrationen sowohl von TNF- $\alpha$  sowie von Interleukin-6 und Interleukin-10 erhöht, und spiegeln somit die I/R-induzierte Entzündungsreaktion sowie die bereits kompensatorisch begonnene Antiinflammation wider.

## **7.2.2 Auswirkungen von Erythropoietin auf den I/R-induzierten Reperfusionsschaden**

Erythropoietin führt über die Stimulierung der Hämatopoese und die damit verbundene Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes zu einem Schutz des Gewebes vor Ischämie (JOHNSON et al., 2006a). Johnson und Mitarbeiter konnten zeigen, dass dieser Erythropoietin-vermittelte gewebeprotective Effekt auch unabhängig von einer signifikanten Änderung des Hämatokritwertes zu beobachten ist (JOHNSON et al., 2006b). Daraus folgerten sie, dass EPO neben den bekannten hämatopoietischen Effekten über weitere Eigenschaften verfügen muss, die eine direkte Gewebeprotektion bewirken (ERBAYRAKTAR et al. 2003). In der Tat konnten in mehreren experimentellen Studien direkte anti-inflammatorische (AGNELLO et al., 2002) und anti-apoptotische (VAIRANO et al., 2002) Eigenschaften von Erythropoietin nachgewiesen werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von Versuchstieren mit EPO zu einer deutlichen Reduktion des Reperfusionsschadens an Herz (CALVILLO et al., 2003), Niere (VESEY et al., 2004) und Gehirn (SIREN et al., 2001) führt. Ziel dieser Studie war daher, die protektiven Auswirkungen von Erythropoietin auf den mikrovaskulären und parenchymatösen Reperfusionsschaden der Leber zu untersuchen, und eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung nachzuweisen.

In einer ersten Serie wurden Versuchstiere mit einer Dosis von 500IU/kg KG Erythropoietin zu Beginn einer selektiven Ischämie des linken Leberlappens behandelt.

Diese Präkonditionierung führte zu einer signifikanten Reduktion des postischämischen sinusoidalen Perfusionsversagens. Dieses Ergebnis steht mit demjenigen von Contaldo und Mitarbeitern im Einklang, die von einer signifikanten Verbesserung der Mikrozirkulation von „random pattern flaps“ nach einer low-dose Gabe Erythropoietin berichten (CONTALDO et al., 2007), was durch die vorliegende Studie somit bestätigt werden konnte. Im Gegensatz zur Studie von Contaldo et al. konnten wir die Protektion in einem Modell akuter Ischämie nachweisen, während es sich bei dem Modell von Contaldo und Mitarbeitern um ein Modell chronischer Ischämie handelt. Die EPO-vermittelte Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation war allerdings in unserem Modell nicht mit einer Wiederherstellung der Leberexkretionsfunktion assoziiert. Zwar kann davon ausgegangen werden, dass eine Wiederherstellung der mikrovaskulären Perfusion den Sauerstofftransport zum hepatischen Parenchym verbessert, jedoch müssen mit der wiederhergestellten nutritiven Perfusion nicht zwangsläufig eine adäquate Sauerstoffausschöpfung und -utilisation gewährleistet sein. Hinweis auf die möglicherweise gestörte Sauerstoffutilisation und die nachfolgend beeinträchtigte Galleexkretion ist die trotz EPO-Gabe weiterhin unverändert hohe Plasmaaktivität des mitochondrialen Enzyms GLDH als Ausdruck der I/R-bedingten Störung der mitochondrialen Integrität und somit auch Aktivität. Zudem belegen erhöhte Plasmakonzentrationen zytoplasmatisch lokalisierter Enzymen wie ALT, AST und LDH die durch Ischämie und Reperfusion induzierte Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denjenigen von Sepodes und Co-Autoren, die bei 1000IU/kg KG EPO-vorbehandelten Ratten eine signifikante Reduktion von ALT und AST sowie von LDH nach Ischämie/Reperfusion nachweisen konnten (SEPODES et al., 2006). Allerdings wurden in der von Sepodes durchgeführten Studie die Plasmaenzym-Aktivitäten zu einem späteren Zeitpunkt der Reperfusion bestimmt, was sich zusammen mit der kürzeren Ischämiedauer von 30 Minuten günstig auf das Ausmaß der Enzymerhöhung auswirken könnte. In der Tat zeigen mehrere Studien einen zeitabhängigen Verlauf der Plasmaenzymaktivitäten nach Leberzellschädigung (GUJRAL et al., 2001). Somit mag der unterschiedliche Zeitpunkt der Enzymmessung nach Reperfusion sowie die unterschiedliche Erythropoietin-Dosierung als Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse dienen. Weiterhin führten die Vorbehandlung mit niedrig dosiertem Erythropoietin und die daraus resultierende wiederhergestellte mikrovaskuläre Perfusion zu keiner Veränderung des histomorphologisch quantifizierten Gewebeschadens. Dies ist am ehesten dahingehend zu erklären, dass, wie bereits oben diskutiert, die parenchymatöse Sauerstoffutilisation durch die Vorbehandlung mit EPO nicht verbessert wird, und das erhöhte O<sub>2</sub>-Angebot nicht für die Aufrechterhaltung des Strukturstoffwechsels der Hepatozyten herangezogen werden kann. Korrelat der unver-

änderten histomorphologisch nachgewiesenen hepatozellulären Desintegrität sind die persistierend hohen Plasma-Transaminasen.

Die verbesserte mikrovaskuläre Perfusion nach Gabe von 500IU/kg KG Erythropoietin war zudem nicht mit einer Reduktion der post-ischämischen inflammatorischen Gewebereaktion und der damit verbundenen intrahepatischen Leukozytenrekrutierung assoziiert. Die von Agnello beschriebene anti-inflammatorische Wirkung von Erythropoietin (AGNELLO et al., 2002) konnte somit in Bezug auf die intrahepatische Leukozytenrekrutierung in dem vorliegenden Teil der Studie – zumindest durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie – nicht bestätigt werden. Übereinstimmend mit den intravitalmikroskopischen Ergebnissen waren bei EPO-vorbehandelten Tieren keine Veränderungen der Plasmaaktivitäten von TNF- $\alpha$  und IL-6 als Ausdruck der persistierenden Entzündungsreaktion nachzuweisen (SUZUKI et al., 1994). Ebenso konnte nach low-dose EPO-Gabe vor Ischämie der von Sepodes et al. beschriebene anti-apoptotische Effekt von EPO nicht nachgewiesen werden (SEPODES et al., 2006). Somit ist möglicherweise die persistierende hepatozelluläre Apoptose eine Erklärung für die weiter bestehende Entzündungsreaktion nach I/R, da Apoptose und Nekrose zur Aufrechterhaltung der inflammatorischen Gewebereaktion beitragen (LAWSON et al., 1998) und somit eine Reduktion der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung verhindert wird (JAESCHKE et al., 2003). Die diskrepanten Ergebnisse bezüglich der anti-apoptotischen Wirkung von Erythropoietin mögen zudem durch die unterschiedliche Erythropoietin-Dosierung sowie durch die kürzere Ischämiedauer von 30 Minuten bei Sepodes et al. bedingt sein (SEPODES et al., 2006).

Des Weiteren wurden im Unterschied zur vorliegenden Studie von Sepodes männliche Wistar Ratten verwendet (SEPODES et al., 2006). Bisher liegen zwar noch keine Vergleichsstudien vor, ob Erythropoietin bei verschiedenen Tierstämmen unterschiedliche Effekte auslösen kann, jedoch zeigen beispielsweise die Studien von Gujral und Kohli, dass das Ausmaß der hepatozellulären Apoptose maßgeblich vom verwendeten Tierstamm abhängt. Somit konnten Gujral und Co-Autoren bei männlichen Wistar Ratten circa 2% apoptotische Hepatozyten nach 60-minütiger Ischämie/Reperfusion nachweisen. Kohli und Co-Autoren hingegen verzeichneten unter Verwendung männlichen Sprague-Dawley Ratten nach ebenfalls 60-minütiger Ischämie/Reperfusion 0,7% apoptotische Hepatozyten (GUJRAL et al., 2001; KOHLI et al. 1999b). Demnach könnten ebenso pharmakologische Einflüsse auf das apoptotische Zellsterben stamm- und speziesabhängig sein. Im Gegensatz zur durch EPO nicht beeinflussten inflammatorischen Reaktion bewirkte die EPO-Vorbehandlung eine deutliche Steigerung der Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität und vermochte die von Vollmar und Co-Autoren beschriebene I/R-induzierte Beeinträchtigung der Kupfferzellen zu normalisieren (VOLLMAR et al., 1994d).

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie und den Ergebnissen von Sepodes und Co-Autoren kann somit postuliert werden, dass durch eine Gabe von 1000IU/kg EPO im chronischen Modell durchaus protektive Effekte erzielt werden können, allerdings die Dosierung von 500IU/kg EPO zur Beeinflussung des Akutschadens offenbar zu gering gewählt wurde.

Um eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisen zu können, wurden in einer zweiten Serie Versuchstiere mit einer Dosis von 5000IU/kg KG Erythropoietin zu Beginn der selektiven Ischämie des linken Leberlappens behandelt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Contaldo und Co-Autoren, die von einer signifikant verbesserten Mikrozirkulation bei „random pattern flaps“ nach Gabe von Erythropoietin berichten, führte auch hochdosiertes EPO zu Beginn der Ischämie zu einer signifikanten Reduktion des post-ischämischen sinusoidalen Perfusionsversagens und somit zu einer Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation (CONTALDO et al., 2007). Die Anzahl der nicht-perfundierten Sinusoide konnte im Vergleich zum niedrig dosierten EPO weiter reduziert und die hepatische Mikrozirkulation durch das Erreichen des sham-Niveaus vollständig wieder hergestellt werden. Allerdings war die Normalisierung der nutritiven Perfusion wiederum mit keiner Wiederherstellung der Leberexkretionsfunktion assoziiert. Trotz verbesserter mitochondrialer Integrität, gemessen anhand der deutlich reduzierten GLDH-Freisetzung, konnte durch die hochdosierte Gabe von EPO keine Verbesserung der I/R-bedingten Einschränkung der hepatozellulären Exkretionsfunktion erzielt werden. Zudem waren ungeachtet eines deutlich geringeren Ausmaßes der hepatozellulären Desintegrität weiterhin deutlich erhöhte Plasma-Transaminasen nach hochdosierter Gabe von Erythropoietin nachweisbar. Somit führt die Gabe von hochdosiertem Erythropoietin histomorphologisch zwar zu einer verbesserten hepatozellulären Morphologie, nicht jedoch zu einer Verbesserung der zellulären Integrität, die sich ihrerseits in einer Einschränkung der Synthese- und Exkretionsleistung widerspiegelt. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen berichteten Shin und Mitarbeitern ebenfalls von weiterhin erhöhten ALT- und AST-Plasmakonzentrationen nach Myokardinfarkt trotz einer Behandlung mit 3000IU/d EPO (SHIN et al., 2006).

Als Ausdruck einer verbesserten hepatischen Mikrozirkulation und der daraus resultierenden geringeren Gewebeschädigung, zeigte sich nach hochdosierter Gabe von EPO eine Reduktion der sinusoidalen Leukostase und der venulären Leukozytenadhäsion. Da die Leukozytenrekrutierung im Bereich der post-sinusoidalen Venulen jedoch maßgeblich für den Gewebeschaden verantwortlich ist (BROWN et al., 1997), konnte die von Agnello et al. beschriebene anti-inflammatorische Wirkung von EPO in dieser Versuchsserie nun sowohl durch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie, wie auch durch die Standard-Histologie bestä-

tigt werden (AGNELLO et al., 2002). Somit geben unsere Daten Anhalt dafür, dass die anti-inflammatorische Wirkung von EPO dosisabhängig sein könnte.

Ebenso kann die nach EPO-Gabe geringfügig reduzierte hepatozelluläre Apoptose wiederum als Erklärung für die zwar verringerte, aber letztlich doch noch aufrechterhaltene intrahepatische Leukozytenrekrutierung herangezogen werden. Apoptose und Nekrose bedingen letztendlich eine Unterhaltung der post-ischämischen inflammatorischen Gewebereaktion und verhindern somit die Reduktion der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung (JAESCHKE et al., 2003). Da die I/R-bedingte hepatozelluläre Apoptose in diesem Versuchsansatz nicht gänzlich verhindert werden konnte, steht dieses Ergebnis im Gegensatz zu demjenigen von Lipsic und Co-Autoren, die nach Gabe von 5000IU/kg KG EPO vor myokardialer Ischämie von einer signifikanten Reduktion der kardialen Apoptose berichteten (LIPSIC et al., 2004). Allerdings wurden in der von Lipsic beschriebenen Studie eine wesentlich kürzere Ischämiezeit sowie eine 24-stündige Reperfusionzeit durchgeführt. Dieses von unserer Studie sehr verschiedene Protokoll mag letztlich diese Unterschiede erklären, zudem apoptotische Zellen nach Infiltration durch Leukozyten abgeräumt und beseitigt werden. Somit könnte die bei Lipsic et al. nicht mehr nachweisbare Apoptose bereits völlig abgeräumt sein, während zu einem früheren Zeitpunkt durchaus eine messbare Apoptose stattgefunden hat.

Entsprechend der Reduktion der inflammatorischen Reaktion zeigte sich bei hochdosierter Gabe von Erythropoietin eine Normalisierung der Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität und damit auch der lokalen Immunreaktion. Im Sinne der reduzierten inflammatorischen Aktivität nach Ischämie und Reperfusion nach Vorbehandlung mit 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Ischämie war eine leichte Reduktion der Plasmakonzentration von TNF- $\alpha$  zu beobachten, wohingegen die Plasma-Konzentrationen von Interleukin-6 und Interleukin-10 nicht maßgeblich verändert waren. Eine vergleichbare Studie wurde von Liu und Co-Autoren durchgeführt, die 5000IU/kg KG EPO 24 Stunden vor myokardialer Ischämie appliziert und im Anschluss an eine 30-minütige Ischämie die Plasmakonzentrationen von TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 und Interleukin-10 bestimmt haben. Unter Berücksichtigung einer wesentlich kürzeren Ischämiezeit, eines früheren Applikationszeitpunktes von EPO sowie der Verwendung von männlichen Sprague-Dawley Ratten beschrieb Liu eine EPO-induzierte Abnahme der TNF- $\alpha$ - und Interleukin-6- sowie eine Zunahme der Interleukin-10-Plasmakonzentration bei EPO-vorbehandelten Tieren (LIU et al., 2006a/b).

In einer dritten Serie wurden Versuchstiere mit einer Dosis von 5000IU/kg KG Erythropoietin zu Beginn der Reperfusion nach selektiver Ischämie des linken Leberlappens behandelt, um eine mögliche Beeinflussung des Reperfusionsschadens in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt zu untersuchen.

Auch in diesem Versuchsansatz führte die Applikation von hochdosiertem EPO zu einer signifikanten Reduktion des post-ischämischen sinusoidalen Perfusionsversagens, sogar unter Ausgangsniveau. Dieses Ergebnis stimmt mit denen von Contaldo und Co-Autoren überein (CONTALDO et al., 2007), die eine Verbesserung der Mikrozirkulation von „random pattern flaps“ nach EPO Gabe nachweisen konnten, und zeigt interessanterweise, dass sowohl eine low-dose als auch eine high-dose Gabe von Erythropoietin unabhängig vom Applikationszeitpunkt zu einer signifikanten Verbesserung der post-ischämischen hepatischen Mikrozirkulation führen. Die EPO-induzierte Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation war in diesem Versuchsansatz erstmalig mit einer Wiederherstellung der Leberexkretionsfunktion assoziiert. Somit konnte durch high-dose Gabe von EPO die Syntheseleistung des Organs erhalten werden. Die Korrelation der Galleexkretion mit der parenchymatösen Versorgung mit energiereichen Phosphaten lässt daher auch den Rückschluss auf eine verbesserte zelluläre Oxygenierung und Sauerstoffutilisation zu. Voraussetzung für die effektive Sauerstoffutilisation ist eine erhaltene zelluläre Integrität. Dieser protektive Effekt von EPO in der Manifestation des Ischämie/Reperfusionsschadens zeigte sich entsprechend in deutlich reduzierten Plasmakonzentrationen von ALT und AST sowie von LDH, wie dies von Sepodes bereits bei Gabe von EPO vor Beginn der Ischämie beschrieben werden konnte (SEPODES et al., 2006). Des Weiteren zeigte sich in der auf sham-Niveau reduzierten GLDH-Konzentration im Plasma die durch EPO-vermittelte Protektion der zellulären und mitochondrialen Integrität. Histomorphologisch spiegelt sich diese Verbesserung der zellulären Integrität nach Ischämie/Reperfusion in der ebenfalls deutlich reduzierten zytoplasmatischen Vakuolisierung, Grobscholligkeit und sinusoidalen Kongestion wider.

Als morphologisches Korrelat der von Agnello beschriebenen anti-inflammatorischen Wirkung von Erythropoietin konnte nach high-dose Gabe von EPO zu Beginn der Reperfusion eine signifikante Reduktion der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung festgestellt werden (AGNELLO et al., 2002). Zudem unterstreicht die ebenfalls deutlich verringerte Leukozyteninfiltration in der Chloracetatesterase-Färbung die protektive und anti-inflammatorische Wirkung einer high-dose Gabe von Erythropoietin zu Beginn der Reperfusion. Als weiteres Indiz für die protektive Wirkung von Erythropoietin war in diesem Versuchsansatz die Wiederherstellung der hepatischen Mikrozirkulation mit einer Normalisierung der I/R-induzierten Beeinträchtigung der Kupfferzellen verbunden. Darüber hinaus wurden die Konzentration der Entzündungsmediatoren wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 deutlich durch die Gabe von 5000IU/kg KG EPO reduziert. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Studien überein, die ebenfalls von einer EPO-vermittelten Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine berichten (AGNELLO et al., 2002; LIU et al., 2006a/b). Interessanterweise wurde in unserer Studie die IL-10-Plasmaaktivität durch Gabe von EPO auf sham-Niveau reduziert, wohingegen in vergleichbaren Studien von einer EPO-vermittelten Zunahme der Interleukin-10 Konzentration im

Plasma berichtet wurde (LIU et al., 2006a/b). Diese Diskrepanz der Ergebnisse kann allerdings durch die auf sham-Niveau reduzierte Aktivität von Interleukin-6 als Ausdruck einer insgesamt verringerten Zytokin-Kaskade erklärt werden (NISHIMURA et al., 1999).

Hepatozelluläre Apoptose sowie der nekrotische Gewebsuntergang bedingen letztendlich die Induktion und Unterhaltung der post-ischämischen inflammatorischen Gewebereaktion (JAESCHKE et al., 2003). Somit kann als weiteres Indiz für die protektive und anti-inflammatorische Wirkung von Erythropoietin die signifikante Reduktion der hepatozellulären Apoptose sowie der hepatischen cleaved Caspase-3 Expression im Lebergewebe angesehen werden. Somit konnten wir auch im zuletzt gewählten Versuchsansatz die in der Literatur beschriebene anti-apoptotische Wirkung von EPO nachweisen (VAIRANO et al., 2002; LIPSIC et al., 2004).

### **7.2.3 Mechanismus der Gewebeprotektion von Erythropoietin**

Bereits Erbayraktar et al. konnten in ihren Studien nachweisen, dass der Erythropoietin-vermittelte gewebeprotective Effekt unabhängig von hämatopoetischen Effekten zu beobachten ist, und durch EPO eine unmittelbare Gewebeprotektion induziert wird (ERBAYRAKTAR et al. 2003). Diese gewebeprotectiven Eigenschaften wurden letztendlich sowohl als anti-inflammatorische (AGNELLO et al., 2002) wie auch als anti-apoptotische Eigenschaften von EPO identifiziert (VAIRANO et al., 2002). Zur Klärung weiterer möglicher Mechanismen für eine durch EPO vermittelte Protektion des Gewebes vor dem I/R-Schaden und zur Untermauerung der mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und der Histologie gewonnenen Ergebnisse, wurden Western blot-Analysen zur Expression verschiedener an der Signaltransduktion beteiligter Proteine durchgeführt. Da mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und Standardhistologie die deutlichsten protektiven Effekte nach Behandlung mit 5000IU/kg EPO zu Beginn der Reperfusion nachgewiesen wurden, wurden in dieser Gruppe proteinbiochemische Analysen durchgeführt, um Mechanismen der Gewebeprotektion zu analysieren.

Ischämie/Reperfusion führte in der vorliegenden Studie, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Junk und Co-Autoren, zu einer Induktion der EPO-Rezeptor-Expression innerhalb des Lebergewebes (JUNK et al., 2002). Diese I/R-induzierte Steigerung der EPO-Rezeptor-Expression wird als kompensatorischer Mechanismus betrachtet, um das zelluläre Überleben zu gewährleisten. Somit trifft das zu Beginn der Reperfusion applizierte EPO auf die durch Ischämie induzierten, neuerlich exprimierten EPO-Rezeptoren, und kann somit die potenteste Gewebeprotektion vermitteln. Neben dem exogen zugeführten EPO kann nicht

ausgeschlossen werden, dass auch endogen gebildetes EPO an der Vermittlung der Gewebeprotektion beteiligt war. In der Tat konnte in einer *in vitro*-Studie an neuronalen Kulturen demonstriert werden, dass Hypoxie zu einer HIF-1 $\alpha$ -abhängigen Expression von EPO in Astrozyten führt, welches seinerseits protektiv auf die ko-kultivierten Zellen wirkt (LIU et al., 2006c). Umgekehrt führt die Applikation von exogenem EPO zu einer Suppression der endogenen EPO-Freisetzung (ECKARDT et al., 1990; AL-HUNITI et al., 2004), sodass zu spekulieren wäre, ob durch die Applikation von EPO vor Ischämie sowohl die endogene EPO-Expression, wie auch die EPO-Rezeptor-Expression supprimiert werden. Somit käme dem Zeitpunkt der EPO-Applikation zum Erreichen gewebeprotectiver Eigenschaften – zumindest im Modell des akuten hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens - eine zentrale Bedeutung zu. Die Applikation von 5000IU EPO zu Beginn der Reperfusion nach selektiver Ischämie des linken Leberlappens hatte in unserem Modell keine Auswirkung auf die Expression des EPO-Rezeptors im Vergleich zu NaCl-behandelten I/R-Kontrolltieren. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Contaldo und Co-Autoren, die von einer gesteigerten Expression des Rezeptors nach Applikation von EPO berichten. Diese Diskrepanz der Ergebnisse kann jedoch möglicherweise durch unterschiedliche Messzeitpunkte in beiden Studien erklärt werden, so dass der von Contaldo beschriebene Anstieg der EPO-Rezeptor-Expression nach 6-stündiger Reperfusion in der vorliegenden Studie nach 90-minütiger Reperfusion noch nicht festzustellen war (CONTALDO et al., 2007).

Weiterhin konnten in der vorliegenden Studie eine gesteigerte Expression von an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen, wie beispielsweise NF- $\kappa$ B und pSTAT-5, nach Ischämie und Reperfusion nachgewiesen werden. Diese I/R-induzierte Steigerung der Expression von NF- $\kappa$ B und pSTAT-5 wurde auch in weiteren Studien beobachtet (LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006; GAO et al., 2005; RAFIEE et al., 2005). Diese gesteigerte Proteinexpression dient der Signalweiterleitung von EPO-Rezeptor in das Zellinnere und vermittelt letztlich die protektiven Eigenschaften von EPO durch Suppression pro-inflammatorischer Zytokine (LI et al., 2006). Die nach Gabe von EPO beobachtete Reduktion der Expression von NF- $\kappa$ B konnte auch in weiteren Studien belegt werden (LIU et al., 2006a/b; MORISHITA et al., 1997). Zahlreiche Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass eine ganze Reihe von Effektorgenen, beispielsweise die von TNF- $\alpha$  und Interleukin-6, unter der Kontrolle von NF- $\kappa$ B stehen (LIU et al., 2006a/b, MORISHITA et al., 1997). Über diese Wechselwirkung getriggert beeinflusst Erythropoietin via down-regulation von NF- $\kappa$ B die inflammatorische Gewebereaktion nach Ischämie/Reperfusion durch Reduktion der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine (LIU et al., 2006a/b). Des Weiteren haben Rafiee und Co-Autoren über vergleichbare Ergebnisse zur Beeinflussung der pSTAT-5 Expression durch Erythropoietin berichtet (RAFIEE et al., 2005). Dieser Signaltransduktionsweg unter Einbe-

ziehung von JAK2 und pSTAT-5 konnte in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen in zahlreichen anderen Studien für die Prävention von Apoptose im Rahmen von Ischämie/Reperfusion verantwortlich gemacht werden (DIGICAYLIOGLU und LIPTON, 2001; XU-AN et al., 2001).

Auch die durch Joyeux-Faure und Co-Autoren beschriebene Induktion des Stress-Enzyms iNOS konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden (JOYEUX-FAURE et al., 2006). Die in der Western blot-Analyse dargestellte Reduktion der iNOS-Expression nach EPO-Gabe kann als weiterer Parameter einer protektiven Wirkung von EPO in Bezug auf den durch Ischämie/Reperfusion-induzierten Gewebeschaden angesehen werden und entspricht den Ergebnissen von Rui und Co-Autoren (RUI et al., 2005). Hur und Mitarbeiter beschrieben als Folge einer gesteigerten iNOS-Expression eine Verstärkung sowohl des oxidativen Stesses auf das Leberparenchym, als auch der inflammatorischen Gewebereaktion (HUR et al., 1999). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch von Liu und Co-Autoren beschrieben, indem die Induktion der hepatischen iNOS für die Gewebeschädigung nach einer Phase von Ischämie und Reperfusion verantwortlich gemacht wurde (LIU et al., 2002). Im Umkehrschluss stellt die reduzierte iNOS-Expression einen verringerten Gewebe-Stress nach I/R dar und bewirkt gleichzeitig eine geringere Schädigung des Gewebes.

Des Weiteren konnte in Übereinstimmung zu den Ergebnissen anderer Studien eine durch Ischämie/Reperfusion induzierte Erhöhung der Caspase-3-Expression als Ausdruck der hepatozellulären Apoptose innerhalb des Lebergewebes nachgewiesen werden (SEPODES et al., 2006). Die in dieser Studie weiterhin beobachtete Reduktion der Caspase-3 Aktivität auf sham-Niveau nach Applikation von 5000IU/kg KG EPO zu Beginn der Reperfusion verdeutlicht nochmals die bereits von Vairano nachgewiesenen anti-apoptotischen Eigenschaften von Erythropoietin (VAIRANO et al., 2002) und ist zudem in zahlreichen anderen Studien ebenfalls beschrieben worden (HOCHHAUSER et al., 2008, SEPODES et al., 2006).

Als weiterer möglicher Mechanismus, der zur protektiven Wirkung von EPO auf den Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber beiträgt, der allerdings in unserem Modell nicht untersucht wurde, kann die Wechselbeziehung zwischen der Induktion der endothelständigen Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) und dem sinusoidalen Perfusionsversagen angesehen werden. Das nach Ischämie und Reperfusion beobachtete sinusoidale Perfusionsversagen gilt als Determinante der postischämischen Leberdysfunktion (VOLLMAR et al., 1994a). Für das Zustandekommen des Versagens der hepatischen Mikrozirkulation nach einer Phase von Ischämie und Reperfusion wurden zahlreiche Mechanismen diskutiert, mit-

unter auch die Imbalance zwischen vasokonstriktorischem Endothelin-1 und vasodilatorischem Stickstoffmonoxid (CLEMENS et al., 1997; MARZI et al., 1994).

In der Induktion der endothelständigen Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) konnte von Duranski und Mitarbeiter ein protektiver Effekt gegenüber der durch Ischämie und Reperfusion induzierten Organschädigung nachgewiesen werden (DURANSKI et al., 2006). Diese Induktion der eNOS wurde auch von d'Uscio und Co-Autoren nach Applikation von Erythropoietin beschrieben (d'USCIO et al., 2007). Erythropoietin könnte somit über eine eNOS-vermittelte Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Konzentration innerhalb des Kapillarbettes der Leber zum Ausgleich der durch Ischämie und Reperfusion induzierten Imbalance zwischen Endothelin-1 und Stickstoffmonoxid und hierdurch zu einer Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation nach Ischämie/Reperfusion beitragen.

#### **7.2.4 Auswirkungen von ReoPro auf den I/R-induzierten Reperfusionsschaden**

Als Ursache für das bei Ischämie und Reperfusion auftretende Phänomen des „no-reflow“ werden verschiedene Pathomechanismen in der Literatur beschrieben. Der Verschluss der Kapillaren durch Leukozyten (SCHMID-SCHÖNBEIN, 1987) beziehungsweise durch geschwollene Endothelzellen (HAMMERSEN et al., 1989), die Imbalance zwischen Endothelin-1 und Stickstoffmonoxid (CLEMENS et al., 1997), eine intravaskuläre Hämokonzentration (MENGER et al., 1988) sowie eine durch Zellschwellung bedingte Erhöhung des Widerstandes (MAZZONI et al., 1989) werden als mögliche Pathomechanismen für das Zustandekommen des sinusoidalen Perfusionsversagens diskutiert.

Baekström berichtete 1971 bei akuter Hämorrhagie von einer Obstruktion der Kapillaren des Skelettmuskels durch Mikrothromben und machte diese Thrombozytenaggregation für den Ausfall der Mikrozirkulation verantwortlich (BAECKSTRÖM et al., 1971). 1991 diskutierte Quinones-Baldrich bei Versuchen zu Ischämie/Reperfusion des Skelettmuskels ebenfalls mikrovaskuläre Thromben als Ursache für die Entstehung des kapillären „no-reflow“ Phänomens (QUINONES-BALDRICH et al., 1991). Shinohara konnte bei Versuchen zur Ischämie/Reperfusion der Leber eine erhöhte Koagulationsneigung des Blutes nachweisen und nahm daher eine mikrovaskuläre Thrombenbildung als Ursache des sinusoidalen Perfusionsversagens an (SHINOHARA et al., 1985). Entsprechend konnten Kuroe und Co-Autoren durch die Inhibition der Thromboxan-A<sub>2</sub>-Synthetase bei Leberischämie die Bildung von Mikrothromben verhindern und die Durchblutung des Gewebes verbessern (KUROE et al., 1991). Auch für den Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten ONO 3708 konnte ein protektiver Effekt nach Ischämie/Reperfusion nachgewiesen werden (HABA und KURODA, 1995).

Im Gegensatz hierzu stehen Untersuchungen, die die Hypothese der Thrombosierung von Kapillaren als Ursache für das Zustandekommen des sinusoidalen Perfusionsversagens widerlegen. Messina konnte bei intravitalmikroskopischen Untersuchungen am Skelettmuskel keinen Anhalt für eine Thrombosierung der Kapillaren nach Ischämie/Reperfusion feststellen (MESSINA, 1990). Auch Eriksson berichtet bei Versuchen zur Ischämie des Skelettmuskels mittels Kompression der Aorta von keiner Mikrothrombenformation. Die Bildung von Mikrothromben konnte hingegen nur bei Induktion der Ischämie durch vorangegangenen ausgedehnten Blutverlust beobachtet werden. Dies lässt auf eine Veränderung der Blutzusammensetzung als Voraussetzung für die Bildung von Mikrothromben schließen (ERIKSSON und LISANDER, 1972). Auch in Bezug auf die zerebrale (AMES et al., 1968) beziehungsweise myokardiale Ischämie (ENGLER et al., 1986) wurde die Ausbildung von Thromben als Ursache des mikrovaskulären Perfusionsversagens dementiert. Ebenso konnte bei Applikation von Heparin nach Leberischämie eine Reduktion des sinusoidalen Perfusionsversagens nicht beobachtet werden (SHIBAYAMA et al., 1991). Neuere Studien hingegen machten wiederum die Adhäsion von Thrombozyten für das Zustandekommen des „no-reflow“ Phänomens verantwortlich, und postulierten in der Inhibierung der Thrombozytenadhäsion am Endothel einen wirksamen Mechanismus zur Begrenzung des Gewebeschadens nach Ischämie/Reperfusion (SINDRAM et al., 2000). In diesem Kontext führte die Applikation eines Antifibrinogen-Antikörpers und die dadurch induzierte selektive Blockade der Thrombozytenadhäsion am Endothel zu einer Reduktion der post-ischämischen Enzymerhöhung sowie der Caspase-3-Aktivität nach Leberischämie (KHANDOGA et al., 2002a). Auch die Blockade der P-Selektin Expression in präsinusoidalen Arteriolen und postsinusoidalen Venulen führte zu einer Reduktion der Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion und Verbesserung der sinusoidalen Perfusion. Eine Reduktion der Transaminasen- und Caspase-3-Aktivität konnte durch diese Blockade ebenfalls beobachtet werden (KHANDOGA et al., 2002b).

ReoPro, ein GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antikörper, verhindert die Bindung von Fibrinogen am GPIIb/IIIa Rezeptor, und somit die Thrombozytenaggregation. Auf der Grundlage der Ergebnisse von Khandoga und Co-Autoren sowie von Choudhri und Mitarbeitern, die durch Applikation von ReoPro und der damit reduzierten mikrovaskulären Thrombosierung das klinische Outcome nach Apoplex verbessern konnten (CHOUDHRI et al., 1998), war es Ziel eines weiteren Studienabschnittes der vorliegenden Studie, den Einfluss von ReoPro auf den IR-induzierten Reperfusionsschaden der Leber zu untersuchen.

ReoPro bewirkte eine signifikante Reduktion des post-ischämischen sinusoidalen Perfusionsversagens. Dieses Ergebnis steht mit demjenigen von Kuo und Co-Autoren im Ein-

klang, die ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Mikrozirkulation von „skin flaps“ nach Gabe von ReoPro in gleicher Dosierung nachweisen konnten (KUO et al., 2002). Die verbesserte hepatische Mikrozirkulation ging des Weiteren mit einer verringerten sinusoidalen Leukostase einher, was von Campbell und Co-Autoren ebenfalls berichtet (CAMPBELL et al., 1999) und somit durch die vorliegende Studie bestätigt wurde. Die in diesem Versuchsansatz beobachtete Reduktion der venulären Leukozytenadhäsion kann als Resultat der von ReoPro-induzierten Down-Regulation der P-Selektin-Expression in post-sinusoidalen Venulen gewertet werden und entspricht den Ergebnissen von Khandoga und Co-Autoren (KHANDOGA et al., 2002b). Des Weiteren bewirkte die Gabe von ReoPro eine Wiederherstellung der Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität. Zudem war nach Applikation von ReoPro eine Erhöhung der Plasmakonzentrationen pro-inflammatorisch wirkender Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 sowie von IL-10 nachweisbar. Dies steht im Konsens zu den Ergebnissen von Lincoff und Mitarbeitern, die 24 Stunden nach Koronarangiographie bei myokardialer Ischämie und Applikation von 0,25mg/kg KG Abciximab von einem Anstieg der TNF- $\alpha$ - und Interleukin-6-Plasmakonzentration berichten (LINCOFF et al., 2002). Trotz einer verbesserten Mikrozirkulation und einer reduzierten intrahepatischen inflammatorischen Leukozytenrekrutierung konnte durch Applikation von ReoPro keine Verringerung der hepatozellulären Apoptose erzielt werden. Des Weiteren war als Resultat der I/R-induzierten Zellschädigung und somit durch Mangel an funktionsfähigen Hepatozyten keine Veränderung der exkretorischen Leberfunktion im Vergleich zu NaCl-behandelten Kontrolltieren feststellbar. Als weiteres Indiz der Zellschädigung und der fehlenden protektiven Wirkung von ReoPro konnte durch dessen Gabe keine Verringerung der zytoplasmatischen Vakuolisierung und Grobscholligkeit erzielt werden. Als Korrelat dieser Zellschädigung sind die erhöhten Plasma-Konzentrationen der Lebertransaminasen sowie der LDH und GLDH zu bewerten. Konkret spiegelt die Erhöhung der GLDH-Konzentration im Plasma die gestörte mitochondriale Integrität wider und kennzeichnet somit trotz der verbesserten hepatischen Mikrozirkulation die Schwere des Reperfusionsschadens. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu demjenigen von Khandoga und Co-Autoren, die nach Gabe eines Antifibrinogen-Antikörpers von einer Reduktion der postischämischen Enzymerhöhung berichten. Diese Diskrepanz der Ergebnisse kann allerdings durch die nicht ganz identische Wirkungsprofile der verwendeten Antikörper erklärt werden (KHANDOGA et al., 2002a). Eine Erhöhung der Transaminasen-Konzentration im Plasma konnte jedoch von Eick bei Untersuchungen zur Gabe von ReoPro bei myokardialer Ischämie bestätigt werden (EICK et al., 1997).

## 7.2.5 Schlussfolgerung

Der postischämische Reperfusionsschaden der Leber ist durch das sinusoidale Perfusionsversagen, die Störung der lokalen Immunantwort sowie die Aktivierung von Leukozyten mit Freisetzung von Sauerstoffradikalen und durch die Beeinträchtigung der hepatozellulären Exkretionsfunktion und Integrität mit nachfolgendem parenchymatösen und nicht-parenchymatösen Zellschaden gekennzeichnet.

Durch Applikation von Erythropoietin beziehungsweise ReoPro wurde in der vorliegenden Studie versucht, neue Ansätze zur Therapie und Prävention des hepatischen Reperfusionsschaden der Leber zu finden. In Bezug auf die Gabe von Erythropoietin war es Ziel der vorliegenden Studie, eine mögliche Dosis-Wirkungsbeziehung nachzuweisen und in Abhängigkeit vom Applikationszeitpunkt die bestmögliche Prävention vor der durch Ischämie und Reperfusion induzierten Gewebeschädigung zu erzielen. Somit gelangten wir zu dem Ergebnis, dass die Gabe von hochdosiertem Erythropoietin zu Beginn der Reperfusion zu einer Reduktion des sinusoidalen Perfusionsversagens, der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung, der hepatozellulären Apoptose und des Parenchymschadens führt. Weiterhin schützt hochdosiertes EPO vor der I/R-induzierten Störung der lokalen Immunantwort und bewirkt insbesondere eine Wiederherstellung der exkretorischen Leberfunktion.

Durch Applikation des GP IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten ReoPro konnte zwar eine Reduktion des sinusoidalen Perfusionsversagens sowie der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung erzielt werden, jedoch hatte ReoPro keinen Einfluss auf den durch Ischämie und Reperfusion-induzierten parenchymatösen Zellschaden und die I/R-induzierte exkretorische Dysfunktion.

Somit postulieren wir, dass das bereits klinisch angewendete Erythropoietin einen neuen Therapieansatz darstellt, um den mikrovaskulären und funktionellen Reperfusionsschaden der Leber zu verhindern. Die langfristigen Auswirkungen der durch high-dose Gabe Erythropoietin induzierten Hämatopoese auf die Mikrozirkulation der Leber und auf andere Organe konnten in dieser Studie nicht geklärt werden. Des Weiteren wird Gegenstand weiterer chirurgischer Forschung sein, in wie weit Thrombozyten an der Entstehung und Unterhaltung des hepatischen Ischämie- und Reperfusionsschadens beteiligt sind und diese Wirkung potentiell verhindert werden kann. Da das sinusoidale Perfusionsversagen als Determinante des post-ischämischen Leberversagens angesehen wird und unter Behandlung mit ReoPro eine Verbesserung der sinusoidalen Perfusion zu beobachten war, bietet sich zudem in der Applikation von ReoPro ein möglicher Ansatz zur Therapie beziehungsweise Prävention des hepatischen Reperfusionsschadens der Leber.

## 8 Literatur

Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B (2006) Comprehensive analysis of the regenerating mouse liver: an in vivo fluorescence microscopic and immunohistological study. *J Surg Res* 134(2):354-362

Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P (2002) Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 952(1):128-134

Al-Huniti NH, Widness JA, Schmidt RL, Veng-Pedersen P (2004) Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of paradoxical regulation of erythropoietin production in acute anemia. *J Pharmacol Exp Ther*. 310(1):202-208

Ames A 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G (1968) Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52(2):437-453

Anagnostou A, Lee ES, Kessimian N, Levinson R, Steiner M (1990) Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(15):5978-5982.

Anderson BO, Brown JM, Harken AH (1991) Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res* 51(2):170-179

Annable L, Cotes PM, Mussett MV (1972) The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull World Health Organ* 47(1):99-112

Asher EF, Garrison RN, Ratcliffe DJ, Fry DE (1983) Endotoxin, cellular function, and nutrient blood flow. *Arch Surg* 118(4):441-445

Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP (1985) Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation* 40(6):584-590

Bachmann S, Le Hir M, Eckardt KU (1993) Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J Histochem Cytochem* 41(3):335-341

Baekström P, Folkow B, Kovách AGB, Löfving B, Öerg B (1971) Evidence of plugging of the microcirculation following acute haemorrhage. 6th Europ. Conf. Microcirculation, Aalborg 1970 (eds. J. Ditzel and D. Lewis), 16-22, Karger, Basel

Baggiolini M (1995) Activation and recruitment of neutrophil leukocytes. *Clin Exp Immunol* 101 Suppl 1: 5-6.

Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Uhl E, Galla TJ, Menger MD, Messmer K (1989) The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast Reconstr Surg* 83(6):948-959

Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein GZ, Sarau HM, Clark RK, Griswold DE (1991) Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci Res* 29(3):336-345

Baue AE (1975) Multiple, progressive, or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s. *Arch Surg* 110(7):779-781

Beach PM, Torres E, Litton A, Kundsinn R (1965) Acute occlusion of the portal vein in dogs. *Surg Gynecol Obstet* 121(4):761-766

Bergelson S, Klingmüller U, Socolovsky M, Hsiao JG, Lodish HF (1998) Tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor mediate activation of AP-1 transcription factors. *J Biol Chem* 273(4):2396-2401

- Bilzer M, Gerbes AL (2000) Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 32(3):508-515
- Bittorf T, Büchse T, Sasse T, Jaster R, Brock J (2001) Activation of the transcription factor NF-kappaB by the erythropoietin receptor: structural requirements and biological significance. *Cell Signal* 13(9):673-681
- Bloch EH (1955) The in vivo microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination. *Angiology* 6(4):340-349
- Bloch EH, McCuskey RS (1977) Biodynamics of phagocytosis: An analysis of the dynamics of phagocytosis in the liver by in vivo microscopy. In: Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Wisse E, Knook DL (eds.). Elsevier, Amsterdam, pp. 21-32
- Bohlen HG, Gore RW (1976) Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvasc Res* 11(1):103-110
- Bonsdorff E, Jalavist E (1948) A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 16:150-170
- Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC (1987) Bile flow - an index of ischemic injury. *J Surg Res* 42(5):565-569
- Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(19):10526-10531
- Bronk SF, Gores GJ (1993) pH-dependent nonlysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic injury of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 264(4 Pt 1):G744-G751
- Brown MF, Zibari G, Burney D, Granger DN, McDonald JC (1997) Hepatic ischemia/reperfusion affects leukocyte rolling and velocity. *Clin Transplant* 11(5 Pt 2):511-515
- Burkhardt M, Slotta JE, Garcia P, Seekamp A, Menger MD, Pohlemann T (2008) The effect of estrogen on hepatic microcirculation after ischemia/reperfusion. *Int J Colorectal Dis* 23(1):113-119
- Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL (2003) Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108(1):79-85
- Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ (1991) Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology* 13(1):83-95
- Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M (2003) Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8):4802-4806
- Campbell B, Chuhuran CM, Lefer DJ, Lefer AM (1999) Cardioprotective effects of abciximab (ReoPro) in an isolated perfused rat heart model of ischemia and reperfusion. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 21(8):529-534
- Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84(7): 2068-2101
- Carnot P, Deflandre C (1906). Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération au sang. *C R Acad Sci* 143:384-386
- Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE (1979) Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery* 85(2):205-211
- Chaudry IH (1983) Cellular mechanisms in shock and ischemia and their correction. *Am J Physiol* 245(2):R117-R134

- Chávez-Cartaya RE, Ramirez P, Jamieson NV (1995) Haemoglobin saturation in the rat liver after ischaemia and reperfusion: study using a laser photometry technique and correlation with changes in liver tissue blood flow. *Eur Surg Res* 27(2):82-92
- Chen YX, Sato M, Kawachi K, Abe Y (2006) Neutrophil-mediated liver injury during hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5:436-442.
- Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL (1978) Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* 253(13):4809-4817
- Child CG III, Milnes RF, Holswade GR, Gore AL (1950) Sudden and complete occlusion of the portal vein in the Macaca mulatta monkey. *Ann Surg* 132(3):475-495
- Choudhri TF, Hoh BL, Zerwes HG, Prestigiacomo CJ, Kim SC, Connolly ES Jr, Kottirsch G, Pinsky DJ (1998) Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest* 102(7):1301-1310
- Chun K, Zhang J, Biewer J, Ferguson D, Clemens MG (1994) Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock* 1(1): 3-9.
- Clavien PA (1998) Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 28(2):281-285
- Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE (1985) Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl<sub>2</sub> treatment. *Am J Physiol* 248(6 Pt 2):H804-H811
- Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX (1997) Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 8(2):80-85
- Cohn JN, Bristow MR, Chien KR, Colucci WS, Frazier OH, Leinwand LA, Lorell BH, Moss AJ, Sonnenblick EH, Walsh RA, Mockrin SC, Reinlib L (1997) Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation* 95(4):766-770
- Coller BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA (1983) A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest* 76(1):101-108
- Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, Wanner GA (2007) Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(1):H274-H283
- Cooper D, Stokes KY, Tailor A, Granger DN (2002) Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* 2(3):165-180
- Crafa F, Gugenheim J, Saint-Paul MC, Cavanel C, Lapalus F, Ouzan D, Militerno G, Mouiel J (1991) Protective effects of prostaglandin E1 on normothermic liver ischemia. *Eur Surg Res* 23(5-6):278-284
- Crenshaw BS, Harrington RA, Tcheng JE (1995). Novel antiplatelet agents: the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor. *Exp Opin Invest Drugs* 4:1033-1044
- Dangas G, Badimon JJ, Coller BS, Fallon JT, Sharma SK, Hayes RM, Meraj P, Ambrose JA, Marmur JD (1998) Administration of abciximab during percutaneous coronary intervention reduces both ex vivo platelet thrombus formation and fibrin deposition: implications for a potential anticoagulant effect of abciximab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(8):1342-1349
- Davis JM, Arakawa T, Strickland TW, Yphantis DA (1987) Characterization of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Biochemistry* 26(9):2633-2638
- de Groot H, Rauen U (2007) Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc* 39(2):481-484

- Delva E, Camus Y, Nordlinger B, Hannoun L, Parc R, Deriaz H, Lienhart A, Huguet C (1989) Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg* 209(2):211-218
- Digicaylioglu M, Lipton SA (2001) Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 412(6847):641-647
- Duranski MR, Elrod JW, Calvert JW, Bryan NS, Feelisch M, Lefer DJ (2006) Genetic overexpression of eNOS attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291(6):H2980-H2986
- d'Uscio LV, Smith LA, Santhanam AV, Richardson D, Nath KA, Katusic ZS (2007) Essential role of endothelial nitric oxide synthase in vascular effects of erythropoietin. *Hypertension* 49(5):1142-1148
- Eckardt KU, Dittmer J, Neumann R, Bauer C, Kurtz A (1990) Decline of erythropoietin formation at continuous hypoxia is not due to feedback inhibition. *Am J Physiol*. 258(5 Pt 2): F1432-F1437
- Eguchi H, McCuskey PA, McCuskey RS (1991) Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology* 13(4):751-757
- Eick B, Haude M, Altmann C, Liu F, Caspari G, Leischik R, Erbel R (1997) Treatment of a large intracoronary thrombus with urokinase and a chimeric monoclonal platelet aggregation inhibitor. *Dtsch Med Wochenschr* 122(22):709-715
- Elias H, Petty D (1953) Terminal distribution of the hepatic artery. *Anat Rec* 116(1):9-17
- Ellis CG, Tyml K, Groom AC (1986) Computer-assisted analysis of video images: a new tool for microvascular measurement. *Microcirculatory technology* (eds. Baker CH, Nastuk WL), pp 229-244, Academic Press, Orlando.
- Elliott S, Lorenzini T, Chang D, Barzilay J, Delorme E (1997) Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin. *Blood* 89(2):493-502
- Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schönbein GW (1986) Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 251(2 Pt 2):H314-H323
- Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LØ, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11):6741-6746
- Eriksson E, Lisander B (1972) Low flow states in the microvessels of skeletal muscle in cat. *Acta Physiol Scand* 86(2):202-210
- Erslev A (1953) Humoral regulation of red cell production. *Blood* 8(4):349-357
- Essani NA, McGuire GM, Manning AM, Jaeschke H (1996) Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin messenger RNA in hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol* 156(8):2956-2963
- Farkouh EF, Daniel AM, Beaudoin JG, MacLean LD (1971) Predictive value of liver biochemistry in acute hepatic ischemia. *Surg Gynecol Obstet* 132(5):832-838
- Fenjves ES, Ochoa MS, Cabrera O, Mendez AJ, Kenyon NS, Inverardi L, Ricordi C (2003) Human, nonhuman primate, and rat pancreatic islets express erythropoietin receptors. *Transplantation* 75(8):1356-1360
- Ferguson D, McDonagh PF, Biewer J, Paidas CN, Clemens MG (1993) Spatial relationship between leukocyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia. *Int J Microcirc Clin Exp* 12(1):45-60

- Fitzgerald LA, Leung B, Phillips DR (1985) A method for purifying the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Anal Biochem* 151(1):169-177
- Foster JH, Berman MM (1977) Solid liver tumors. *Major Probl Clin Surg* 22:1-342
- Freeman BA, Crapo JD (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47(5):412-426
- Gao JF, Li JS, Zhou YL, Liu K (2006) Effects of Naomaitong Recipe on expressions of nuclear factor-kappaB and nitric-oxide synthases in brain tissue after focal cerebral ischemia reperfusion in aged rats. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 4(5):530-534
- Gelman SI (1976) Disturbances in hepatic blood flow during anesthesia and surgery. *Arch Surg* 111(8):881-883
- Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD (2003) Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol* 38:59-66.
- Gonce ME, Brackett DJ, Squires RA, Gibson DD, Balla AK, Lerner MR, McCay PB, Pennington LR (1995) Development of circulatory and metabolic shock following transient portal triad occlusion. *J Surg Res* 59:534-543.
- Gralnick HR, Williams SB, Collier BS (1984) Fibrinogen competes with von Willebrand factor for binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex when platelets are stimulated with thrombin. *Blood* 64(4):797-800
- Groh J, Kuhnle GE, Sckell A, Ney L, Goetz AE (1994) Isoflurane inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction. An in vivo fluorescence microscopic study in rabbits. *Anesthesiology* 81(6):1436-1444
- Grune T, Schneider W, Siems WG (1993) Reoxygenation injury of rat hepatocytes: evaluation of nucleotide depletion and oxidative stress as causal components. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 39(6):635-650
- Gugler E, Lüscher EF (1965) Platelet function in congenital afibrinogenemia. *Thromb Diath Haemorrh* 14(3-4):361-373
- Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H (2001) Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 33(2):397-405
- Gumucio JJ, Miller DL, Krauss MD, Zanolli CC (1981) Transport of fluorescent compounds into hepatocytes and the resultant zonal labeling of the hepatic acinus in the rat. *Gastroenterology* 80(4):639-646
- Haba Y, Kuroda T (1995) Thromboxane A2 receptor antagonist (ONO 3708) protects from liver damage induced by cholestasis and ischemia-reperfusion. *Eur Surg Res* 27(2):100-110
- Hammersen F, Barker JH, Gidlöf A, Menger MD, Hammersen E, and Messmer K (1989) The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and reperfusion. *Prog Appl Microcirc* 13:1-26
- Hasselgren PO, Jennische E, Fornander J, Hellman A (1982) No beneficial effect of ATP-MgCl<sub>2</sub> on impaired transmembrane potential and protein synthesis in liver ischemia. *Acta Chir Scand* 148(7):601-607
- Heizmann O, Loehe F, Volk A, Schauer RJ (2008) Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. *Eur J Med Res* 25;13(2):79-86
- Hiraoka Y, Sedat JW, Agard DA (1987) The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures. *Science* 238(4823):36-41

- Hochhauser E, Pappo O, Ribakovsky E, Ravid A, Kurtzwald E, Cheporko Y, Lelchuk S, Ben-Ari Z (2008) Recombinant human erythropoietin attenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model. *Apoptosis* 13(1):77-86
- Holper K, Olcay I, Kitahama A, Miller RH, Brettschneider L, Drapanas T, Trejo RA, Di Luzio NR (1974) Effect of ischemia on hepatic parenchymal and reticuloendothelial function in the baboon. *Surgery* 76(3):423-432
- Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, Conard J (1978) Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. A biological study of 20 patients submitted to extensive hepatectomy. *Arch Surg* 113(12):1448-1451
- Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A, Arrigo E, Harb J, Clement RR (1992) Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg* 163(6):602-605
- Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH (1999) Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 261(3):917-922
- Hynes RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48(4):549-554
- Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K (1992) Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 16(2):454-61
- Irwin JW, Macdonald J 3<sup>rd</sup> (1953) Microscopic observations of the intrahepatic circulation of living guinea pigs. *Anat Rec* 117(1):1-15
- Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, Seehra J, Jones SS, Hewick R, Fritsch EF, et al. (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313(6005):806-810
- Jacobson LO, Goldwasser E, Fried W, Plzak LF (1957) Studies on erythropoiesis. VII. The role of the kidney in the production of erythropoietin. *Trans Assoc Am Physicians* 70:305-17
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW (1990) Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 4(15):3355-3359
- Jaeschke H, Farhood A (1991) Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260(3 Pt 1):G355-G362
- Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ (1993) Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol* 264(4 Pt 1):G801-G809
- Jaeschke H, Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A. Reply to (2001) Mechanism of Hepatocyte Death After Ischemia: Apoptosis Versus Necrosis. *Hepatology* 33(6):1555-1556
- Jaeschke H, Lemasters JJ (2003) Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 125(4):1246-1257
- Jaeschke H (2006) Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(6):G1083-G1088
- Jennings LK, Phillips DR (1982) Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex. *J Biol Chem* 257(17):10458-10466
- Jelkmann W (1992) Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 72(2):449-489

- Johnson DW, Forman C, Vesey DA (2006a) Novel renoprotective actions of erythropoietin: new uses for an old hormone. *Nephrology (Carlton)* 11(4):306-312
- Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, Endre Z, Gobe GC (2006b) Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure. *Kidney Int* 69(10):1806-1813
- Jolly PC, Foster JH (1963) Hepatic inflow stasis. *Surgery* 54:45-55
- Joyeux-Faure M, Ramond A, Béguin PC, Belaïdi E, Godin-Ribuot D, Ribuot C (2006) Early pharmacological preconditioning by erythropoietin mediated by inducible NOS and mitochondrial ATP-dependent potassium channels in the rat heart. *Fundam Clin Pharmacol* 20(1):51-56
- Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM (2002) Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(16):10659-10664
- Katz SC, Shia J, Liau KH, Gonen M, Ruo L, Jarnagin WR, Fong Y, D'Angelica MI, Blumgart LH, DeMatteo RP (2009) Operative blood loss independently predicts recurrence and survival after resection of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 249(4):617-623
- Karwinski W, Husøy AM, Farstad M, Søreide O (1989) Sixty minutes of normothermic ischemia in the rat liver: correlation between adenine nucleotides and bile excretion. *J Surg Res* 46(2):99-103
- Kerner T (1993) Durchblutung und Gewebeoxygenierung von Leber und Pankreas während Hypotension durch volatile Anästhetika. Dissertationsschrift, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
- Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Axmann S, Hutter J, Messmer K, Krombach F (2002a) Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation* 74(5):681-688
- Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, Hutter J, Messmer K, Krombach F (2002b) P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 18(6):529-535
- Khandoga A, Kessler JS, Hanschen M, Khandoga AG, Burggraf D, Reichel C, Hamann GF, Enders G, Krombach F (2006) Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. *J Leukoc Biol* 79(6):1295-1305
- Klintman D, Schramm R, Menger MD, Thorlacius H (2002) Leukocyte recruitment in hepatic injury: selectin-mediated leukocyte rolling is a prerequisite for CD18-dependent firm adhesion. *J Hepatol* 36(1):53-59
- Knisely MH (1936) A method of illuminating living structure for microscopic study. *Anat Rec* 64:499-524
- Kohli V, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA (1999a) Calpain mediates ischemic injury of the liver through modulation of apoptosis and necrosis. *Gastroenterology* 116(1):168-178
- Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA (1999b) Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 67(8):1099-1105
- Komatsu H, Koo A, Guth PH (1990) Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation. *Microvasc Res* 40(1):1-13
- Komatsu H, Koo A, Ghadishah E, Zeng H, Kuhlenkamp JF, Inoue M, Guth PH, Kaplowitz N (1992) Neutrophil accumulation in ischemic reperfused rat liver: evidence for a role for superoxide free radicals. *Am J Physiol* 262(4 Pt 1):G669-G676

- Koo A, Liang IY (1977) Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat. *Microvasc Res* 13(3):315-325
- Koo A (1982) Vagotomy attenuates histamine-induced vasodilatation in rat gastric microcirculation. *J Physiol (Lond.)* 325:23-24
- Kubes P, Jutila M, Payne D (1995) Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest* 95(6):2510-2519
- Kuhnle GE, Leipfinger FH, Goetz AE (1993) Measurement of microhemodynamics in the ventilated rabbit lung by intravital fluorescence microscopy. *J Appl Physiol* 74(3):1462-1471
- Kuo YR, Jeng SF, Wang FS, Huang HC, Wei FC, Yang KD (2002) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist (abciximab) inhibited platelet activation and promoted skin flap survival after ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 107(1):50-55
- Kuroe K, Kurokawa T, Nishikimi M, Nonami T, Harada A, Nakao A, Takagi H (1991) Effects of thromboxane A2 synthetase inhibitor on postischemic liver injury in rats. *Eur Surg Res* 23(1):20-26
- Larsen JA, Krarup N, Munck A (1976) Liver hemodynamics and liver function in cats during graded hypoxic hypoxemia. *Acta Physiol Scand* 98(2):257-262
- Lasne F, de Ceaurriz J (2000) Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* 405(6787):635
- Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H (1998) Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas-antibody-induced liver injury. *Hepatology* 28(3):761-767
- Leaf A (1973) Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury. *Circulation* 48(3):455-458
- Lee SM, Park MJ, Cho TS, Clemens MG (2000) Hepatic injury and lipid peroxidation during ischemia and reperfusion. *Shock* 13(4):279-284
- Lee-Huang S (1984) Cloning and expression of human erythropoietin cDNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(9):2708-2712
- Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG (1981) Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. *Science* 213(4508):661-663
- Le Moine O, Louis H, Stordeur P, Collet JM, Goldman M, Devière J (1997) Role of reactive oxygen intermediates in interleukin 10 release after cold liver ischemia and reperfusion in mice. *Gastroenterology* 113(5):1701-1706
- Lhuillier F, Robert MO, Crova P, Goudable J, Arnal F, Cespuglio R, Annat G, Viale JP (2006) Nitric oxide and liver microcirculation during autoregulation and haemorrhagic shock in rabbit model. *Br J Anaesth* 97(2):137-146
- Li Y, Takemura G, Okada H, Miyata S, Maruyama R, Li L, Higuchi M, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H (2006) Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 71(4):684-694
- Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, et al. (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(22):7580-7584
- Lincoff AM, Kereiakes DJ, Mascelli MA, Deckelbaum LI, Barnathan ES, Patel KK, Frederick B, Nakada MT, Topol EJ (2001) Abciximab suppresses the rise in levels of circulating inflammatory markers after percutaneous coronary revascularization. *Circulation* 104(2):163-167
- Lindberg B (1977) Liver circulation and metabolism in haemorrhagic shock. An experimental study with special reference to the effect of glucagon. *Acta Chir Scand Suppl* 476:1-18

- Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH, Schoemaker RG (2004) Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 44(4):473-479
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79(4):1431-1568
- Littauer A, de Groot H (1992) Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria. *Am J Physiol* 262(6 Pt 1):G1015-G1020
- Liu C, Shen K, Liu Z, Noguchi CT (1997) Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *J Biol Chem* 272(51):32395-32400
- Liu TH, Robinson EK, Helmer KS, West SD, Castaneda AA, Chang L, Mercer DW (2002) Does upregulation of inducible nitric oxide synthase play a role in hepatic injury? *Shock* 18(6):549-554
- Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, Xu J (2006a) Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sci* 78(19):2255-2264
- Liu X, Shen J, Jin Y, Duan M, Xu J (2006b) Recombinant human erythropoietin (rhEPO) preconditioning on nuclear factor-kappa B (NF-kB) activation & proinflammatory cytokines induced by myocardial ischaemia-reperfusion. *Indian J Med Res* 124(3):343-354
- Liu R, Suzuki A, Guo Z, Mizuno Y, Urabe T (2006c) Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *J Neurochem* 96(4):1101-1110
- Longnecker DE, Seyde WC (1986) Anesthetic regimes : advantages and disadvantages. *Microcirculatory technology* eds. Baker CH, Nastuk WL, pp 343-365, Academic Press, Orlando
- Luedde T, Trautwein C (2006) Intracellular survival pathways in the liver. *Liver Int* 26(10):1163-1174
- Luster AD (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338(7):436-445
- Mackenzie RJ, Furnival CM, Wood CB, O'Keane MA, Blumgart LH (1977) The effects of prolonged hepatic ischaemia before 70 per cent partial hepatectomy in the dog. *Br J Surg* 64(1):66-69
- Marzi I, Takei Y, Rücker M, Kawano S, Fusamoto H, Walcher F, Kamada T (1994) Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transpl Int* 7 Suppl 1:S503-S506
- Mascelli MA, Lance ET, Damaraju L, Wagner CL, Weisman HF, Jordan RE (1998) Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation* 97(17):1680-1688
- Mathews WR, Guido DM, Fisher MA, Jaeschke H (1994) Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia. *Free Radic Biol Med* 16(6):763-770
- Mavier P, Preaux AM, Guigui B, Lescs MC, Zafrani ES, Dhumeaux D (1988) In vitro toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: evidence for a proteinase-mediated mechanism. *Hepatology* 8(2):254-258
- Maxwell PH, Ferguson DJ, Nicholls LG, Iredale JP, Pugh CW, Johnson MH, Ratcliffe PJ (1997) Sites of erythropoietin production. *Kidney Int* 51(2):393-401
- Mazzoni MC, Borgström P, Intaglietta M, Arfors KE (1989) Lumenal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal muscle capillaries during hemorrhagic shock. *Circ Shock* 29(1):27-39
- McCord JM (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312(3):159-163

- McCuskey RS (1966) A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am J Anat* 119(3):455-477
- McCuskey RS, McCuskey PA (1977) In vivo microscopy of the spleen. *Bibl Anat* (16 Pt 2):121-125
- McCuskey RS, Urbaschek R, McCuskey PA, Urbaschek B (1983) In vivo microscopic observations of the responses of Kupffer cells and the hepatic microcirculation to *Mycobacterium bovis* BCG alone and in combination with endotoxin. *Infect Immun* 42(1):362-367
- McEver RP, Baenziger JU, Majerus PW (1982) Isolation and structural characterization of the polypeptide subunits of membrane glycoprotein IIb-IIIa from human platelets. *Blood* 59(1):80-85
- Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K (1988) Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med (Berl)* 188(3):151-165
- Menger MD, Marzi I, Messmer K (1991) In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 23(3-4):158-169
- Menger MD, Steiner D, Messmer K (1992a) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 263(6 Pt 2):H1892-H1900
- Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K (1992b) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol* 263(6 Pt 2):H1901-H1906
- Menger MD, Vollmar B, Glasz J, Müller MJ, Post S, Messmer K (1993). Hepatic ischemia/reperfusion. *Prog Appl Microcirc* 19:106-124
- Menger MD, Vollmar B (1994) In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin. *Microsurgery* 15(6):383-389
- Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B (1999) Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 46 Suppl 2:1452-1457
- Messina LM (1990) In vivo assessment of acute microvascular injury after reperfusion of ischemic tibialis anterior muscle of the hamster. *J Surg Res* 48(6):615-621
- Miyake T, Kung CK, Goldwasser E (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252(15):5558-5564
- Moloney WC, McPherson K, Fliegelman L (1960) Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J Histochem Cytochem* 8:200-207
- Morishita R, Sugimoto T, Aoki M, Kida I, Tomita N, Moriguchi A, Maeda K, Sawa Y, Kaneda Y, Higaki J, Ogihara T (1997) In vivo transfection of cis element "decoy" against nuclear factor-kappaB binding site prevents myocardial infarction. *Nat Med* 3(8):894-899
- Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A (1990) Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 171(2):120-125
- Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F, Koseki M, Nishida T, Tagawa K, Kawashima Y (1986) Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. *Hepatology* 6(4):701-707
- Nishimura N, Tohyama C, Satoh M, Nishimura H, Reeve VE (1999) Defective immune response and severe skin damage following UVB irradiation in interleukin-6-deficient mice. *Immunology* 97(1):77-83
- Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M (2006) Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *J Pharmacol Sci* 101(1):31-39

- Pelias ME, Townsend MC (1992) In vivo [31P]NMR assessment of early hepatocellular dysfunction during endotoxemia. *J Surg Res* 52(5):505-509
- Phillips DR, Agin PP (1977) Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *J Clin Invest* 60(3):535-545
- Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA (1988) The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 71(4):831-843
- Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM (1991) GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65(3):359-362
- Post S, Gonzalez AP, Palma P, Rentsch M, Stiehl A, Menger MD (1992) Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat. *Hepatology* 16(3):803-809
- Post, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD (1993) Hepatic reperfusion injury following cold ischemia in the rat: Potentials of quantitative analysis by in vivo fluorescence microscopy. *Prog Appl Microcirc* 19:152-166
- Pringle JH (1908) V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg* 48(4):541-549
- Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E (1986) Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors. *Science* 231(4745):1559-1562
- Quiñones-Baldrich WJ, Chervu A, Hernandez JJ, Colburn M, Moore WS (1991) Skeletal muscle function after ischemia: "no reflow" versus reperfusion injury. *J Surg Res* 51(1):5-12
- Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr, Tweddell JS, Baker JE (2005) Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol* 100(3):187-197
- Rappaport AM, Borowy ZJ, Lougheed WM, Lottoto WN (1954) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* 119(1):11-33
- Rappaport AM (1973) The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 6(2):212-228
- Rappaport AM (1977) Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibl Anat* (16 Pt 2):116-120
- Rao PN, Walsh TR, Makowka L, Rubin RS, Weber T, Snyder JT, Starzl TE (1990) Purine nucleoside phosphorylase: a new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell. *Hepatology* 11(2):193-198
- Reilly FD, Dimlich RV, Cilento EV, McCuskey RS (1983) Hepatic microvascular regulatory mechanisms. III. Aminergic mechanisms as related to mast cells. *Int J Microcirc Clin Exp* 2(1):61-73
- Riedel J, Moravec R (1959). Das System der Pfortader und der Leberarterie in der Leber der Ratte. *Anat Anz* 107:99-110
- Rodríguez-Yáñez M, Castillo J (2008) Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol* 21(3):353-357
- Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M, Abel ED, Xenocostas A, Kvietys PR (2005) Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res* 65(3):719-727
- Ruggeri ZM, De Marco L, Gatti L, Bader R, Montgomery RR (1983) Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *J Clin Invest* 72(1):1-12

- Rymasa B, Wang JF, de Groot H (1991) O<sub>2</sub>- release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 261(4 Pt 1):G602-G607
- Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K (1994) Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J* 8(11):814-822
- Sato T (1987) New method for measurement of hepatic blood flow in the rat using thermodilution method. *Circ Shock* 21(1):31-37
- Sato T, Shinzawa H, Abe Y, Takahashi T, Arai S, Sendo F (1993) Inhibition of *Corynebacterium parvum*-primed and lipopolysaccharide-induced hepatic necrosis in rats by selective depletion of neutrophils using a monoclonal antibody. *J Leukoc Biol* 53(2):144-150
- Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K (1989) Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 74(1):103-109
- Schmid-Schönbein GW (1987) Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *Fed Proc* 46(7):2397-2401
- Schön MR, Kollmar O, Akkoc N, Matthes M, Wolf S, Schrem H, Tominaga M, Keech G, Neuhaus P (1998) Cold ischemia affects sinusoidal endothelial cells while warm ischemia affects hepatocytes in liver transplantation. *Transplant Proc* 30(5):2318-2320
- Schramm R, Menger MD, Kirsch S, Langer F, Harder Y, Hamacher J, Schäfers HJ (2007) The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multicolor fluorescence microscopy study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 134(1):210-217
- Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, Yaqoob M, Thiernemann C, Mota-Filipe H (2006) Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int* 19(11):919-926
- Shibayama Y, Asaka S, Nishijima A (1991) Mechanism of liver injury following ischemia. *Exp Mol Pathol* 55(3):251-260
- Shin DH, Kwon YI, Choi SI, Park US, Lee J, Shin JH, Lee JU, Kim SG, Kim JH, Lim HK, Lee BH, Kim KS (2006) Accidental ten times overdose administration of recombinant human erythropoietin (rh-EPO) up to 318,000 units a day in acute myocardial infarction: report of two cases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98(2):222-224
- Shinohara M, Nakao A (1985) The effects of hepatic ischemia on systemic blood coagulation and fibrinolysis in mongrel dogs. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 86(5):544-554
- Silver IA (1977) Ion fluxes in hypoxic tissues. *Microvasc Res* 13(3):409-420
- Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA (2001) Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver: a Kupffer cell-mediated injury. *FASEB J* 15(7):1230-1232
- Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):4044-4049
- Spapen H (2008) Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. *Anat Rec (Hoboken)* 291(6):714-720
- Steinhausen M, Zimmerhackl B, Thederan H, Dussel R, Parekh N, Esslinger HU, von Hagens G, Komitowski D, Dallenbach FD (1981) Intraglomerular microcirculation: measurements of single glomerular loop flow in rats. *Kidney Int* 20(2):230-239

- Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M (2005) IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 67(4):1216-1233
- Sumimoto K, Inagaki K, Yamada K, Kawasaki T, Dohi K (1988) Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. Bile flow rate and cellular adenosine triphosphate level. *Transplantation* 46(4):506-509
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D (1993) Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 55(6):1265-1272
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH (1994) Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 57(2):253-258
- Tagge EP, Campbell DA Jr, Reichle R, Averill DR Jr, Merion RM, Dafoe DC, Turcotte JG, Juni JE (1987) Quantitative scintigraphy with deconvolutional analysis for the dynamic measurement of hepatic function. *J Surg Res* 42(6):605-612
- Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ (1992) Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 263(3 Pt 2):F474-F481
- Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS (1975) Factors determining successful liver preservation for transplantation. *Ann Surg* 181(3):289-298
- Townsend MC, Hampton WW, Haybron DM, Schirmer WJ, Fry DE (1986) Effective organ blood flow and bioenergy status in murine peritonitis. *Surgery* 100(2):205-213
- Vairano M, Dello Russo C, Pozzoli G, Battaglia A, Scambia G, Tringali G, Aloe-Spiriti MA, Preziosi P, Navarra P (2002) Erythropoietin exerts anti-apoptotic effects on rat microglial cells in vitro. *Eur J Neurosci* 16(4):584-592
- Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, Traynor O, Geoghegan J, Hegarty JE, O'Farrelly C (2004) Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 78(2):250-256
- Verrier E (1996) The microvascular cell and ischemia-reperfusion injury. *J Cardiovasc Pharmacol* 27 Suppl 1:S26-S30
- Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW (2004) Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 19(2):348-355
- Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 198(6):971-975
- Villringer A, Haberl RL, Dirnagl U, Anneser F, Verst M, Einhüpl KM (1989) Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res* 504(1):159-160
- Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K (1992) Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 75(3):421-430
- Vollmar B, Glasz J, Senkel A, Menger MD, Messmer K (1993a). Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir* 118(11):691-696
- Vollmar B, Menger MD, Lang G, Post S, Messmer K (1993b) Hepatic microcirculation in hemorrhagic shock. *Prog Appl Microcirc* 152-166.
- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD (1994a) Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 145(6):1421-1431

- Vollmar B, Preissler G, Menger MD (1994b) Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas. *Am J Physiol* 267(5 Pt 2):H1936-H1940
- Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K (1994c) Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 267(5 Pt 1):G786-G793
- Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD (1994d) Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol* 20(2):301-304
- Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K (1995a) Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg* 80(2):249-255
- Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K (1995b) Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 117(2):195-200
- Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD (1996a) Role of microcirculatory derangements in manifestation of portal triad cross-clamping-induced hepatic reperfusion injury. *J Surg Res* 60(1):49-54
- Vollmar B, Rücker M, Menger MD (1996b) A new method for the intravital microscopic quantification of hepatic sinusoidal perfusion failure using the dye bisbenzamide H33342. *Microvasc Res* 51(2):250-259
- Vollmar B, Bauer C, Menger MD (2002) n-3 Polyunsaturated fatty acid-enriched diet does not protect from liver injury but attenuates mortality rate in a rat model of systemic endotoxemia. *Crit Care Med* 30(5):1091-1098
- von Allmen D, Hasselgren PO, Higashiguchi T, Fischer JE (1992) Individual regulation of different hepatocellular functions during sepsis. *Metabolism* 41(9):961-969
- Wang P, Ba ZF, Burkhardt J, Chaudry IH (1992) Measurement of hepatic blood flow after severe hemorrhage: lack of restoration despite adequate resuscitation. *Am J Physiol* 262(1 Pt 1):G92-G98
- Wanner GA, Vollmar B, Menger MD (1996) Dissociation of no-reflow and reflow-paradox in postischemic liver (Abstract). 6th World Congress for Microcirculation, Munich, Germany, p 172
- Watanabe N, Tsukada N, Smith CR, Phillips MJ (1991) Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol* 113(5):1069-1080
- Weiss HJ, Rogers J (1971) Fibrinogen and platelets in the primary arrest of bleeding. Studies in two patients with congenital afibrinogenemia. *N Engl J Med* 285(7):369-374
- Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF (1994) Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem* 269(36):22839-22846
- Westenfelder C, Biddle DL, Baranowski RL (1999) Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors. *Kidney Int* 55(3):808-820
- Wettstein M, Häussinger D (1994) Effect of hypoxia on nitric oxide formation and leukotriene metabolism in the perfused rat liver. *Zentralbl Chir* 119(5):328-333
- Winet H (1989) A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation. *Microvasc Res* 37(1):105-114
- Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN (1993) JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* 74(2):227-236
- Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML (1999) Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development* 126(16):3597-3605

- 
- Wyllie S, Barshes NR, Gao FQ, Karpen SJ, Goss JA (2008) Failure of P-selectin blockade alone to protect the liver from ischemia-reperfusion injury in the isolated blood-perfused rat liver. *World J Gastroenterol* 14(44):6808-6816
- Xuan YT, Guo Y, Han H, Zhu Y, Bolli R (2001) An essential role of the JAK-STAT pathway in ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16):9050-9055
- Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA (1998) L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol* 275(6 Pt 1):G1341-G1352
- Yang CW, Li C, Jung JY, Shin SJ, Choi BS, Lim SW, Sun BK, KimYS, Kim J, Chang YS, Bang BK (2003) Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in rat kidney. *FASEB Journal* 17(12): 1754-1755
- Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB (1999) Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology* 30(1):203-208
- Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A, Lodish HF (1993) Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 81(9):2223-2236
- Zeintl H, Tompkins WR, Messmer K, Intaglietta M (1986) Static and dynamic microcirculatory video image analysis applied to clinical investigations. *Prog Appl Microcirc* 11:1-10
- Zhang W, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, Shi J, Zheng S (2007) Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc* 39(5):1332-1337
- Zhou W, McCollum MO, Levine BA, Olson MS (1992) Inflammation and platelet-activating factor production during hepatic ischemia/reperfusion. *Hepatology* 16(5):1236-1240

## 9 Tabellen

<i>Blutbild</i>	baseline	Reperfusion
Leukozytenzahl [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]		
<b>sham</b>	5,1 $\pm$ 0,8	5,7 $\pm$ 0,9
<b>I/R</b>	5,8 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 1,0
<b>Epo 500 prä</b>	4,9 $\pm$ 0,8	6,4 $\pm$ 1,3
<b>Epo 5000 prä</b>	5,4 $\pm$ 1,3	5,5 $\pm$ 1,1
<b>Epo 5000 post</b>	5,0 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 0,8
<b>ReoPro</b>	7,7 $\pm$ 0,8	6,5 $\pm$ 0,9
Erythrozytenzahl [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ]		
<b>sham</b>	7,33 $\pm$ 0,24	7,42 $\pm$ 0,44
<b>I/R</b>	7,61 $\pm$ 0,15	6,52 $\pm$ 0,99
<b>Epo 500 prä</b>	8,34 $\pm$ 0,23	7,26 $\pm$ 0,57
<b>Epo 5000 prä</b>	7,52 $\pm$ 0,21	8,00 $\pm$ 0,49
<b>Epo 5000 post</b>	6,99 $\pm$ 0,12	7,89 $\pm$ 0,23
<b>ReoPro</b>	7,05 $\pm$ 0,11	7,36 $\pm$ 0,30
Thrombozytenzahl [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]		
<b>sham</b>	919 $\pm$ 65	734 $\pm$ 150
<b>I/R</b>	1005 $\pm$ 48	752 $\pm$ 118
<b>Epo 500 prä</b>	956 $\pm$ 32	806 $\pm$ 65
<b>Epo 5000 prä</b>	878 $\pm$ 65	578 $\pm$ 85
<b>Epo 5000 post</b>	849 $\pm$ 59	965 $\pm$ 47
<b>ReoPro</b>	786 $\pm$ 77	778 $\pm$ 87
Hämoglobin [g/dl]		
<b>sham</b>	13,5 $\pm$ 0,6	13,8 $\pm$ 1,0
<b>I/R</b>	14,6 $\pm$ 0,2	12,5 $\pm$ 1,9
<b>Epo 500 prä</b>	15,9 $\pm$ 0,5	14,1 $\pm$ 1,1
<b>Epo 5000 prä</b>	14,5 $\pm$ 0,4	15,6 $\pm$ 1,1
<b>Epo 5000 post</b>	13,6 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 0,5
<b>ReoPro</b>	13,8 $\pm$ 0,2	14,4 $\pm$ 0,6
Hämatokrit [%]		
<b>sham</b>	37 $\pm$ 2	30 $\pm$ 3
<b>I/R</b>	37 $\pm$ 3	34 $\pm$ 3
<b>Epo 500 prä</b>	45 $\pm$ 1	35 $\pm$ 3
<b>Epo 5000 prä</b>	38 $\pm$ 1	37 $\pm$ 3
<b>Epo 5000 post</b>	30 $\pm$ 1	35 $\pm$ 1
<b>ReoPro</b>	34 $\pm$ 1	30 $\pm$ 2

**Tabelle 4:** Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen, Hämoglobinkonzentration und Hämatokrit am Ende der Reperfusion.  $MW \pm SEM$ .

<i>Hämodynamik</i>	baseline	Ischämie	Reperfusion
mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]			
sham	101 ± 5	130 ± 5	133 ± 4
I/R	102 ± 5	130 ± 14	109 ± 9 <sup>#</sup>
Epo 500 prä	99 ± 7	115 ± 7	114 ± 8
Epo 5000 prä	93 ± 10	118 ± 9	121 ± 10
Epo 5000 post	96 ± 7	129 ± 5	134 ± 3
ReoPro	104 ± 4	126 ± 1	119 ± 6
Herzfrequenz [min <sup>-1</sup> ]			
sham	268 ± 20	307 ± 21	315 ± 16
I/R	273 ± 12	298 ± 9	298 ± 14
Epo 500 prä	279 ± 8	311 ± 8	301 ± 7*
Epo 5000 prä	230 ± 13	334 ± 21	321 ± 23
Epo 5000 post	230 ± 15	304 ± 17	312 ± 17
ReoPro	259 ± 9	325 ± 13	320 ± 15

**Tabelle 5:** mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz basal, während Ischämie sowie während Reperfusion. MW±SEM. <sup>#</sup>p<0.05 vs. sham, \*p<0.05 vs. I/R

<i>arterielle Blutgasanalyse</i>	baseline	Reperfusion
pH-Wert		
sham	7,366 ± 0,014	7,302 ± 0,052
I/R	7,311 ± 0,016	7,242 ± 0,044
Epo 500 prä	7,320 ± 0,013	7,262 ± 0,047
Epo 5000 prä	7,334 ± 0,019	7,198 ± 0,060
Epo 5000 post	7,338 ± 0,026	7,347 ± 0,049
ReoPro	7,352 ± 0,005	7,386 ± 0,039*
pO <sub>2</sub> [mmHg]		
sham	82,05 ± 4,35	112,22 ± 10,38
I/R	95,21 ± 3,65	107,61 ± 6,63
Epo 500 prä	98,65 ± 6,53	128,16 ± 5,18*
Epo 5000 prä	90,01 ± 6,44	114,48 ± 11,61
Epo 5000 post	67,90 ± 5,99	112,22 ± 8,66
ReoPro	71,89 ± 3,17	128,21 ± 7,36
pCO <sub>2</sub> [mmHg]		
sham	47,17 ± 2,48	28,05 ± 4,34
I/R	47,27 ± 5,36	41,35 ± 5,61
Epo 500 prä	60,96 ± 2,57	31,36 ± 6,91
Epo 5000 prä	56,74 ± 5,10	37,56 ± 6,34
Epo 5000 post	43,48 ± 3,86	28,86 ± 3,80
ReoPro	45,93 ± 0,73	19,41 ± 3,60*

**Tabelle 6:** arterielle Blutgasanalyse am Ende der Reperfusion. MW±SEM. \*p<0.05 vs. I/R

## 10 Dank, Publikationen

Ohne die Hilfe und Unterstützung folgender Personen wäre die Erstellung der vorliegenden Arbeit unmöglich gewesen:

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Professor Menger, dem Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, für die Überlassung des Themas sowie die Förderung der Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Dr. med. J. E. Slotta für die intensive Betreuung und seine ständige Hilfsbereitschaft bei der Versuchsplanung, bei der Durchführung der Experimente sowie bei der Analyse und Diskussion der Ergebnisse.

Zusammen mit Herrn Professor Menger hat er mich wissenschaftliches Arbeiten gelehrt, durch positive Kritik und Ermutigung zur Eigeninitiative meine Motivation sowie mein wissenschaftliches Interesse gestärkt und gefördert. Ebenso wurde mir die Teilnahme am 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie ermöglicht, auf den sie mich ausgezeichnet vorbereitet haben. Die Erfahrungen, die ich im Rahmen der Zusammenarbeit mit Herrn Professor Menger und Herrn Dr. med. J. E. Slotta bei der Erstellung dieser Arbeit machen durfte, haben zu einer unschätzbaren Bereicherung meiner beruflichen Laufbahn beigetragen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Mathias Jung für seine Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie deren Auswertung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau J. Becker und Frau E. Gluding für die Unterstützung bei der Aufarbeitung der Leberhistologien sowie bei Frau Dr. rer. med. Claudia Scheuer für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen bedanken.

Zuletzt danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft mir immer wieder zuteil wurden. Sie haben einen großen Anteil an der entspannten Atmosphäre in dieser Abteilung geleistet, die ich während der gesamten Zeit dort genießen durfte.

## Kongressteilnahme

### **124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie:**

J.Klein , J.E. Slotta , M. Jung, B. Vollmar, M.D. Menger

Hochdosiertes Erythropoietin (EPO) reduziert den mikrovaskulären und parenchymatösen Reperfusionsschaden der Leber. Chir Forum (Springer), 36: 225-226, 2007