

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

**Der Einfluss von Cilostazol auf die hepatische Perfusion und  
Leberregeneration nach 70% Leberresektion**

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

2016

vorgelegt von

Simon Müller

geboren am 18.09.1986 in Bühl/Baden

Meinen Eltern

## INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG .....	1
2	SUMMARY .....	3
3	EINLEITUNG .....	5
3.1	Leberresektion .....	5
3.2	Leberregeneration.....	7
3.3	Blutversorgung der Leber – „hepatic arterial buffer response“ .....	8
3.4	„Small-for-size“-Syndrom .....	10
3.5	Präkonditionierung des Lebergewebes.....	10
3.6	Cilostazol.....	13
4	FRAGESTELLUNG.....	15
5	MATERIAL UND METHODEN.....	16
5.1	Versuchstiere .....	16
5.2	Cilostazol.....	16
5.3	Experimentelles Protokoll und Versuchsmodell .....	16
5.3.1	Präoperative Vorbereitung und Anästhesie .....	18
5.3.2	Chirurgische Präparation der 70% Leberresektion .....	19
5.3.3	Chirurgische Präparation und Entnahme des Restlebergewebes .....	20
5.4	Untersuchungstechniken .....	21
5.4.1	Ultraschall-Flussmessungen .....	21
5.4.2	Laser-Doppler-Flussmessung .....	21
5.4.3	Gallesekretion .....	22
5.4.4	Lebergewicht.....	22
5.5	Histomorphologie.....	22
5.5.1	Leberhistologie (Hämatoxylin-Eosin) .....	22

5.6	Immunhistochemie .....	24
5.6.1	Caspase-3 .....	24
5.6.2	Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA).....	25
5.7	Vascular Endothelial Growth Factor und Transforming Growth Factor- $\beta$ .....	25
5.8	Western Blot.....	26
5.9	Datenerfassung und Statistik .....	27
6	ERGEBNISSE .....	28
6.1	Makro-und Mikroperfusion der Leber .....	28
6.1.1	Portalvenöser Blutfluss .....	28
6.1.2	Hepatoarterieller Blutfluss .....	28
6.1.3	Mikrozirkulation .....	30
6.2	Organfunktion .....	31
6.2.1	Gallensekretion .....	31
6.3	Lebergewicht.....	32
6.4	Leberhistologie Hämatoxylin-Eosin (H&E) .....	33
6.5	Immunhistochemie .....	34
6.5.1	Caspase-3 .....	34
6.5.2	Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und Leberregeneration .....	34
6.6	Transforming Growth Factor- $\beta$ und Vascular Endothelial Growth Factor Expression.....	36
7	DISKUSSION.....	37
7.1	Diskussion von Material und Methoden .....	37
7.1.1	Diskussion des Modells .....	37
7.1.2	Auswahl und Applikation des Phosphodiesterase-III-Inhibitors .....	38
7.1.3	Untersuchungsmethoden.....	39
7.2	Diskussion der Ergebnisse .....	42
7.2.1	Makro- und Mikroperfusion der Leber .....	42

7.2.2	Hepatische Zellintegrität und apoptotischer Zelltod.....	45
7.2.3	Transforming Growth Factor- $\beta$ und Vascular Endothelial Growth Factor.	45
7.3	Schlussfolgerung .....	47
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	48
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	58
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	61
11	TABELLENVERZEICHNIS .....	62
12	PUBLIKATIONEN.....	63
13	DANKSAGUNG.....	64

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Gastrointestinale Tumorerkrankungen, insbesondere das kolorektale Karzinom, gehören zu den am häufigsten vorkommenden Tumorentitäten in Deutschland. Im Verlauf dieser Erkrankungen kommt es häufig zu metastatischen Absiedlungen in die Leber. Die Leberresektion stellt den Goldstandard in der Behandlung maligner und benigner Lebertumoren dar. Dabei repräsentiert die Resektion einen möglichen kurativen Ansatz in der Behandlung von Lebertumoren. Der menschliche Organismus toleriert Leberresektionen bis 75% des Ausgangslebergewichts. Der limitierende Faktor ist hierbei die Regenerationsfähigkeit des verbliebenen Restlebergewebes. Das mögliche Resektionsvolumen kann durch die mangelnde Regenerationskapazität und das damit verbundene potentielle Risiko des postoperativen Leberversagens stark eingeschränkt werden. Dies gilt insbesondere bei gleichzeitig bestehenden Lebererkrankungen wie beispielsweise der Leberzirrhose, infektiösen oder toxischen Hepatitiden oder der Fettleber.

Bisher gibt es zahlreiche klinische Ansätze, welche die Verbesserung der Leberregeneration nach ausgedehnter Resektion zum Ziel haben. In der Literatur werden interventionelle wie auch medikamentöse Therapieverfahren erwähnt. Ziel dieser Therapieverfahren ist die Präkonditionierung des Lebergewebes. Zu den interventionellen Verfahren gehören beispielsweise die interventionelle portalvenöse Embolisation. Hierbei wird eine Atrophie der tumortragenden Lebersegmente und die perfusionsinduzierte Hypertrophie des späteren Restlebergewebes induziert. Ein weiteres Verfahren ist das Pringle Manöver, dabei handelt es sich um eine Okklusion des Ligamentum hepatoduodenale durch eine Gefäßklemme oder ein Tourniquet. Das Manöver kann einmalig oder intermittierend vor der Resektion durchgeführt werden und wird als ischämische Präkonditionierung bezeichnet, um so protektive Einflüsse auf molekularer, mikrozirkulatorischer und hepatozellulärer Ebene zu bewirken. Bisher konnte sich jedoch noch keine medikamentöse Behandlung und somit eine medikamentöse Präkonditionierung im klinischen Alltag etablieren. Vielversprechend zeigen sich Studien mit Phosphodiesterase-III-Inhibitoren, welche die Regenerationsfähigkeit der Leber nach ausgedehnter Resektion verbessern sollen. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Wirkung von Cilostazol (PDE-III-Inhibitor) auf den hepato-arteriellen Blutfluss, die Regenerationsrate und die Auswirkung auf den hepatozellulären Schaden nach ausgedehnter Resektion zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden 32 Sprague-Dawley Ratten mit Cilostazol (5mg/kg/KG p.o. pro Tag) über 5 Tage vorbehandelt, weitere 32 Tiere wurden als Kontrollgruppe mit der entsprechenden Trägersubstanz vorbehandelt. Nach 5 Tagen erhielten die Tiere eine 70% Leberresektion. Weitere 10 Tiere dienten als Sham-Kontrollgruppe und wurden entweder mit Cilostazol oder der Trägersubstanz präkonditioniert. Sie erhielten somit keine Leberresektion. Die Cilostazol-Behandlung wurde in jeder Gruppe bis zum Ende des Beobachtungszeitraums fortgeführt. Mittels Ultraschall-Flow-Messung wurden unmittelbar vor dem Eingriff und direkt im Anschluss der Resektion der portal-venöse und der hepato-arterielle Blutfluss gemessen. Ebenso wurde die hepatische Mikrozirkulation analysiert. Diese Messungen wiederholten sich entsprechend der Gruppe an Tag 0, 1, 3 und 6, sowie in der Sham-Kontrolle nach 5 Tagen Präkonditionierung ohne Resektion.

Das Lebergewebe wurde hinsichtlich der Morphologie, Funktion und Regeneration mittels Histologie, Immunhistochemie, Western Blot und Gallesekretion untersucht.

Die Behandlung mit Cilostazol konnte den gesamten Blutfluss der Leber sowie die Mikrozirkulation, sowohl vor, als auch nach erfolgter Resektion, steigern. Gleichzeitig zeigte sich eine Erhöhung der VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Expression im Lebergewebe. Ferner konnte eine erhöhte hepatozelluläre Proliferationsrate (Proliferating Cell Nuclear Antigen positive Zellen) beobachtet werden. Überdies konnte die hepatozelluläre Desintegrität (Senkung der intrazellulären Vakuolisierung) verringert werden. Cilostazol war folglich in der Lage, die Leberregeneration des verbliebenen Restlebergewebes zu verbessern. Es zeigte sich eine vermehrte Zunahme des Lebergewebes in den mit Cilostazol behandelten Tieren.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass eine Vorbehandlung mit dem Phosphodiesterase-III-Inhibitor Cilostazol, die hepatische Perfusion steigert und die Leberregeneration nach ausgedehnter Hepatektomie verbessert. Somit ist davon auszugehen, dass Cilostazol ein potentes Medikament zur Verringerung des Risikos eines Leberversagens nach ausgedehnter Resektion oder „small-for-size“-Transplantation darstellt.

## 2 SUMMARY

### **The influence of cilostazol on the hepatic perfusion and liver regeneration after 70% liver resection**

Gastrointestinal tumor diseases, particularly colorectal carcinoma, are among the most common tumor entities in Germany. In the course of the disease there are often metastases in the liver. Liver resection has been the gold standard in the treatment of malignant and benign liver tumors. Liver resection represents a possible curative approach in the treatment of liver tumors. The human organism tolerates liver resection of up to 75% of the initial liver weight. However, the limiting factor is the regenerative capacity of the remnant liver tissue. The possible resection volume can be severely limited by the lack of regeneration capacity and the associated potential risk of postoperative liver failure. This is especially true when liver diseases such as liver cirrhosis, infectious or toxic hepatitis, or fatty liver exist at the same time.

So far, there are numerous clinical approaches which are all intended to improve liver regeneration after extensive resection. In literature, interventional and conservative approaches are mentioned. The aim of this treatment method is, the preconditioning of the liver tissue to the upcoming resection. One interventional method is for example the portal-venous embolization. That induces an atrophy of the primary tumor liver segments and a hypertrophy of the other liver segments. Another procedure is the Pringle manoeuvre, therefore an atraumatic haemostat is used to clamp the hepatoduodenal ligament. The manoeuvre is labelled as an ischemic preconditioning, to induce protective factors in hepatocellular, molecular and microcirculatory levels. So far, no medicinal treatment has established itself for a medical preconditioning of the liver in daily clinical practice. Studies with phosphodiesterase III inhibitors, which are intended to improve the regenerative capacity of the liver after extensive resection, have shown themselves to be promising. Therefore, the present study was conducted in order to study the effect of cilostazol on the hepato-arterial blood flow, regeneration rate and effect on hepatocellular damage after extended resection.

For this purpose, 32 Sprague-Dawley rats were pretreated with cilostazol (5mg/kg/BW p.o. per day) for 5 days, while a control group of another 32 animals were pretreated with the corresponding carrier. After 5 days, the animals received a 70% liver resection. Another 10 animals served as a sham-control-group, those were pretreated with cilostazol or glucose

solution. These received consequently no resection. The cilostazol treatment was continued in each group until the end of the observation period. By means of ultrasonic flow measurement the portal-venous and the hepato-arterial blood flow were measured immediately prior to the surgery and immediately after the resection. Similarly, the hepatic microcirculation was analysed. These measurements were repeated according to the group on day 0, 1, 3 and 6, as well as in the sham-control-group after 5 days pretreatment without resection.

The liver tissue was examined in terms of morphology, function, and regeneration by means of histology, immunohistochemistry, Western blot and biliary secretion.

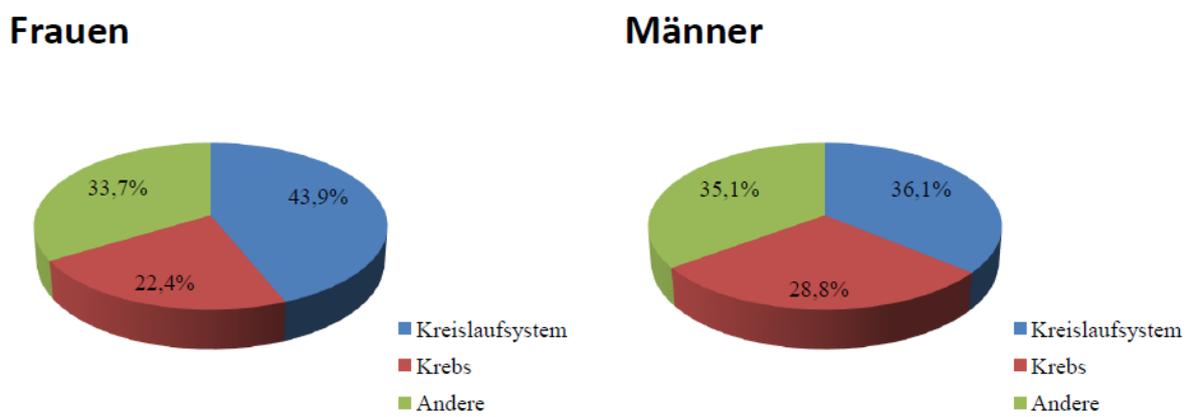
The treatment with cilostazol was able to increase total liver blood flow as well as microcirculation both before and after resection. At the same time, an increase in VEGF expression showed in the liver tissue. Furthermore, an increased hepatocellular proliferation rate (PCNA positive cells) could be observed. Moreover, the hepatocellular disintegrity (reduction of intracellular vacuolisation) could be reduced. Cilostazol was therefore capable of improving the liver regeneration of the remaining residual liver tissue. Furthermore the cilostazol treated animals showed an increase in liver volume.

The present study showed that the phosphodiesterase-III inhibitor cilostazol is able to increase the hepatic perfusion and improve the liver regeneration after an extensive hepatectomy. Thus it can be assumed that cilostazol is a potent medication to reduce the risk of liver failure after extensive resection or a "small-for-size" transplant.

### 3 EINLEITUNG

#### 3.1 Leberresektion

Maligne Tumorerkrankungen stellen in Deutschland, neben Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, die zweithäufigste Todesursache dar. Für das Jahr 2013 ergaben die Statistiken des deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ), dass 28,8% der männlichen bzw. 22,4 % der weiblichen Bevölkerung an einer Krebserkrankung versterben (siehe Abb. 1).



**Abbildung 1: Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2012.**

Die Abbildung zeigt die häufigsten Todesursachen von Frauen und Männern, die Unterteilung setzt sich aus Herz-Kreislaufkrankungen, Krebserkrankungen und andere Ursachen zusammen. [Abb. modifiziert nach Krebsatlas, Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ); [http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort\\_2.html](http://www.dkfz.de/de/krebsatlas/gesamt/mort_2.html)].

Die Hauptproblematik stellt nicht nur der Primärtumor dar, sondern die im Verlauf der Erkrankung entstehende Metastasierung in andere Organe (Liu et al., 2015). Die Leber ist dabei das Organ, das am häufigsten von einer Metastasierung betroffen ist, insbesondere bei Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Eine besondere Rolle spielt hier das kolorektale Karzinom. Bei dieser Tumorentität treten bei 40% bis 80% der Patienten Lebermetastasen auf (Manfredi et al., 2006; Adam et al., 2015).

Die Behandlungsmöglichkeiten von Lebermetastasen sind vielseitig. Zu den interventionellen Verfahren gehören beispielsweise die transarterielle Chemotherapie, die Chemoembolisation und die selektive interne Radiotherapie (SIRT). Das Prinzip der Verfahren beruht auf der mehr oder weniger selektiven lokalen Einbringung eines Chemotherapeutikums oder eines Betastrahlers in die Leber bzw. in einen oder mehrere Tumore (Helmberger, 2010). Ziel dieser Techniken ist, durch die lokale Applikation eines Chemotherapeutikums oder

Betastrahlern eine Dosisescalation und dadurch eine zytotoxische Wirkverstärkung im Zielgebiet zu erreichen (Helmberger, 2010). Zu den weiteren Behandlungsmöglichkeiten gehören thermoablative und radioablative Verfahren. Ziel dieser Methoden ist die Tumorreduktion durch Hitze, Kälte oder ionisierende Strahlung (Helmberger, 2010). Die minimal-invasiven interventionellen Verfahren haben sich in den letzten 15 bis 20 Jahren zu einem wichtigen Bestandteil kurativer und palliativer Behandlungsmöglichkeiten entwickelt (Helmberger, 2010). Die Leberresektion stellt nach wie vor jedoch den Goldstandard in der Behandlung von Lebermetastasen dar. Die chirurgische Therapie bleibt weiterhin eine Möglichkeit eines kurativen Therapieansatzes (Clavien et al., 2007; Kandil et al., 2015; Matias et al., 2015). In Anbetracht der chirurgischen Therapie hat sich die Möglichkeit der Resektabilität von Lebermetastasen erweitert. Die Beurteilung der allgemeinen Operationsfähigkeit des Patienten ist obligat. Des Weiteren gehören neben der technischen und funktionellen Machbarkeit der Resektion auch der onkologische Nutzen und die Prognose des einzelnen Individuums dazu (Nordlinger et al., 1996; Adam et al., 1997; Fong et al., 1999; Konopke, Saeger, 2003; Loss et al., 2010).

In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Resektionen von bis zu 70% des ursprünglichen Lebergewichts realisierbar sind. Solche ausgedehnten Resektionen laufen ohne nennenswerte Komplikationen ab. Das verbliebene Restlebergewebe erholt sich in der Regel gut (Panis et al., 1997). Die meisten Erkenntnisse der Leberregeneration stammen aus Studien an Ratten mit einem 70% Hepatektomie-Modell. Dieses Modell charakterisiert im Wesentlichen die physiologische Antwort auf eine ausgedehnte Resektion und zeichnet sich durch eine konstante Überlebensrate (100%) sowie eine komplette Regeneration aus (Alison, 1986; Michalopoulos, 1990; Panis et al., 1997). Ausgedehntere Leberresektionen bis 90% des Lebergewichts zeigen bereits bei gesunder Leber hohe Mortalitätsraten. Die Überlebensrate bei 85% Hepatektomie beträgt gerade mal 20%, bei 90% Hepatektomie sinkt die Überlebensrate auf nahezu 0% (Panis et al., 1997; Court et al., 2004).

Mittlerweile belegen zahlreiche Studien, dass die Mortalitätsrate einer Leberresektion bei einer nicht-zirrhotischen Patientenpopulation beim Mensch bei unter 5% liegt (Song et al., 2005). Die Herausforderung wird auch in Zukunft die Selektion eines geeigneten Patientenklientels sein. (Nordlinger et al., 1996)

Der Nutzen der chirurgischen Resektion von Lebermetastasen konnte in retrospektiven Studien nachgewiesen werden. So zeigten sich 5-Jahresüberlebensraten von 25-30% nach kompletter Tumorresektion (Nordlinger, Wind, 1994; Nordlinger et al., 2003; Konopke et al., 2013).

Unter Berücksichtigung der funktionellen hepatischen Reserven sind Resektionen von bis zu 75% des Gesamtlebervolumens durchführbar (Lee, Hwang, 2005). Allerdings ist hier zu beachten, dass dies vor allem für Patienten gilt, deren Leber keine parenchymale Vorschädigung aufweist.

### 3.2 Leberregeneration

Die Leber ist ein einzigartiges Organ, welches die Fähigkeit zur Regeneration besitzt. Der Regenerationsprozess wird durch Replikation und Hyperplasie der verschiedenen intrahepatischen Zellen eingeleitet. Im menschlichen Organismus beginnt die Replikation der Hepatozyten im Allgemeinen innerhalb der ersten 24 Stunden nach stattgehabter Leberresektion. Die Initiation und Synchronisation der Replikation der verschiedenen hepatischen Zellen hängt zum einen vom Ausmaß der Resektion, zum anderen von der Vorschädigung des verbliebenen Restlebergewebes ab (Clavien et al., 2007). Der Hauptzelltyp der Leber, der die meisten Funktionen der Leber übernimmt, ist die Parenchymzelle, auch Hepatozyt genannt. Dieser nimmt ca. 80% des Lebergewebes ein. Die Replikation der Hepatozyten kann über die Detektion des „Proliferating Cell Nuclear Antigen“ (PCNA) nachgewiesen werden. PCNA ist ein wichtiges Protein der DNA-Polymerase und spielt eine zentrale Rolle in der Initiierung der Zellproliferation. Die Expression von PCNA ist ein Zeichen für den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus. Unter normalen Bedingungen kann nur bei wenigen Hepatozyten PCNA mittels Antikörper nachgewiesen werden. Die Anzahl steigt jedoch beträchtlich 24 Stunden und 48 Stunden nach ausgeprägter Leberresektion an (Akcan et al., 2006). In der Leber eines Erwachsenen kann man die Zellteilung der Hepatozyten nur in wenigen Fällen beobachten, da sich die meisten dieser Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase befinden (Michalopoulos, DeFrances, 1997). Nach Teilhepatektomie treten etwa 95% der Hepatozyten, die sich normalerweise in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden, in die S-Phase ein. In Rattenlebern beobachtet man einen deutlichen Anstieg der DNA-Synthese 12 Stunden nach Teilhepatektomie. Der Peak wird nach 24 Stunden erreicht. In Cholangiozyten und Kupffer-Zellen findet dieser Prozess 48 Stunden, in Endothelzellen 96 Stunden nach Leberteileresektion statt (Taub, 2004). Yamanaka et al. und Nagasue et al. konnten zeigen, dass eine nahezu vollständige Regeneration der Leber ohne parenchymale Vorschädigung in zwei bis drei Monaten nach Resektion erreicht ist, sowie nach drei bis sechs Monaten bei Lebern mit parenchymaler Vorschädigung wie beispielsweise einer Zirrhose (Nagasue et al., 1987; Yamanaka et al., 1993).

Molekularbiologisch spielen Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-6, welche von den Kupffer-Zellen nach Resektion ausgeschüttet werden, und Mitosefaktoren wie Epidermal Growth Factor (EGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF) und Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), eine wesentliche Rolle bei der Regeneration. Diese Faktoren bewirken im Zusammenspiel einen Übergang der Hepatozyten und anderer Zellen in die S-Phase (Clavien et al., 2007).

Zugrunde liegende Erkrankungen des Leberparenchyms wie beispielsweise virale Hepatitiden, Steatosis hepatis, das hepatozelluläre Karzinom oder die Zirrhose, reduzieren die funktionelle und regenerative Kapazität des verbliebenen Restlebergewebes (Hammond et al., 2011). Bei Patienten mit einer Zirrhose, jedoch keiner funktionellen Beeinträchtigung oder portalen Hypertension, können sichere Resektionen nur bis zu einem Volumen von 50% des Lebergewichts durchgeführt werden. Bei Patienten, welche in den Child-Pugh-Kriterien in Kategorie B oder C eingestuft werden, können sogar noch geringere Resektionsvolumina zu einem postoperativen Leberversagen führen (Poon, Fan, 2005; Clavien et al., 2007; Forner et al., 2010).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Resektionen bis 75% des Gesamtlebervolumens bei gesunden Patienten durchführbar sind. Jegliche Ausweitung der Resektion, auch beim gesunden Individuum, erhöht das Risiko, dass das verbliebene Lebervolumen seine metabolischen und entgiftenden Aufgaben sowie seine Synthesefunktionen nicht mehr aufrechterhalten kann (Clavien et al., 2007).

### 3.3 Blutversorgung der Leber – „hepatic arterial buffer response“

Die Leber beansprucht 25% des Herzzeitvolumens, obwohl sie nur etwa 2,5% des Körpergewichts ausmacht. Somit gehören die Leberparenchymzellen zu den mit am besten durchbluteten Zellen des Körpers. Die Leber ist ein Organ, welches sowohl mit venösem als auch arteriellem Blut versorgt wird. Die Blutversorgungen des venösen Niederdrucksystems und des arteriellen Hochdrucksystems vereinigen sich auf der Ebene der Lebersinusoide. Etwa bis zu einem Drittel des durchfließenden Blutvolumens entfallen davon auf die Arteria hepatica propria. Die restlichen zwei Drittel übernimmt die Vena portae. Das mit Sauerstoff angereicherte Blut aus der Leberarterie vermischt sich in den Lebersinusoiden mit dem weniger sauerstoffreichen aber nährstoffhaltigen Blut der Pfortader. Eine wichtige Rolle in der Mikrozirkulation spielt der Leberazinus. Er bildet sozusagen die funktionelle Einheit der Mikrozirkulation. Der Azinus repräsentiert eine Gruppe von Parenchymzellen die um die terminalen Äste der Arteriolen und portalen Venolen gruppiert sind. Der portale Blutfluss wird nicht durch die Leber selbst kontrolliert. Er setzt sich aus dem Rückfluss der unpaaren

Bauchorgane zusammen (Granger, Senchenkova, 2010). Neben der klassischen arteriellen Autoregulation, wie beispielsweise der myogenen Vasokonstriktion der Leberarterie bei steigendem intravasalem Druck, existiert in der Leber ein weiterer Regulationsmechanismus, die sogenannte „hepatic arterial buffer response“ (HABR). Diese ist wahrscheinlich eine der wichtigsten intrinsischen Regulationsmechanismen des hepatischen Blutflusses. Die HABR beschreibt die semireziproke Beziehung zwischen der Durchblutung der Pfortader und der Leberarterie. Kommt es zu einem Abfall oder einem Anstieg der Pfortaderdurchblutung, wird durch einen Abfall bzw. einen Anstieg des Gefäßwiderstandes der A. hepatica der leberarterielle Blutfluss kompensatorisch gesteigert bzw. vermindert. Eine veränderte Durchblutung der Leberarterie wird jedoch nicht durch eine Änderung des Gefäßwiderstands der V. portae ausgeglichen. Das Ziel der HABR ist die Aufrechterhaltung der Lebergesamtdurchblutung, um zum einen eine adäquate Sauerstoffversorgung und zum anderen die metabolische und exkretorische Funktionalität der Leber zu gewährleisten (Eipel et al., 2012). Die metabolische Stoffwechselsituation der Leber scheint keinen Einfluss auf die HABR zu haben (Lautt, 1983; Bredfeldt et al., 1985). Als möglicher Mediator der HABR wurde in zahlreichen Studien das Nukleosid Adenosin vorgeschlagen (Lautt, Legare, 1985; Lautt et al., 1985). Andere potentielle Regulationsmechanismen wie die neurale oder myogene Kontrolle zur Regulation der HABR, konnten widerlegt werden (Mathie et al., 1980; Alexander et al., 1989). Das Adenosin im Mall-Raum sorgt für die Kommunikation zwischen Leberarterie und Pfortader. Zwischen der Sinuswand und den Hepatozyten befindet sich der Disse-Raum. Über diesen Raum findet der Stoffaustausch zwischen den Leberzellen und dem Blut statt. Im Bereich der Portalkanäle geht der Disse-Raum in den Mall-Raum über, der sich als Spalt zwischen den periportalen Leberzellplatten und dem Inhalt der portalen Trakte und Kanäle auftut (Denk, 2000). Im Bereich der Endäste der Arteria hepatica und der Vena portae wird kontinuierlich Adenosin in den Mall-Raum freigesetzt, welches konzentrationsabhängig den Tonus der Arteria hepatica reduziert. Kommt es zu einer verminderten portalvenösen Durchblutung, akkumuliert Adenosin. Dies führt zur Vasodilatation der Leberarterie. Ein gesteigerter portalvenöser Blutfluss führt hingegen zu einem verstärkten „Auswaschen“ von Adenosin und so zur arteriellen Vasokonstriktion (Vollmar, Menger, 2009; Eipel et al., 2012). Es wurden zwar zahlreiche Belege für die Bedeutung von Adenosin für die HABR dargelegt, jedoch ist der genaue Signalweg der Adenosinsynthese, sowie der Ort und der Zelltyp bis dato ungeklärt (Eipel et al., 2012). Des Weiteren ist Adenosin nicht der alleinige Akteur der HABR. Dies konnte in zahlreichen Studien mit Adenosinantagonisten gezeigt werden. Die HABR konnte durch diese nicht vollständig aufgehoben werden (Mathie, Alexander, 1990; Browse et al., 2003).

Andere vasoaktive Stoffe wie Stickstoffmonoxid (NO), Kohlenstoffmonoxid (CO) und Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der HABR (Cantre et al., 2008; Hoetzel et al., 2008).

### 3.4 „Small-for-size“-Syndrom

Das „small-for-size“-Syndrom (SFSS) ist eine relative hepatische Insuffizienz, die zu der klinischen Konstellation mit den Symptomen Cholestase, Koagulopathie, Aszites, erhöhte Aminotransferasen und Enzephalopathie führen kann (Fondevila et al., 2010). Wie der Name bereits impliziert, handelt es sich beim SFSS um ein relativ zu kleines Transplantat für die entsprechende Körpergröße des Empfängers oder eine relativ zu kleine Restleber für den Patienten. Das Spenderorgan oder die Restleber ist, vereinfacht gesagt, den Anforderungen des Empfängers oder des Patienten nicht gewachsen. Dies kann in einem Organversagen münden. Der portale Blutfluss spielt hier die zentrale Rolle im Pathomechanismus des SFSS. Die Spenderleber oder Restleber hat im Vergleich zum ursprünglichen Organ einen wesentlich kleineren Gefäßquerschnitt. Der portale Blutfluss bleibt jedoch weitestgehend konstant. Der erhöhte Blutfluss führt zu einem erhöhten portalen Druck und somit zu einem erhöhten Scherstress in den Sinusoiden. Dieser Scherstress wird als Auslöser für die Schädigung der Sinusendothelzellen gesehen. Dies führt unweigerlich zur hepatozellulären Schädigung und Apoptose (Troisi, de Hemptinne, 2003; Troisi et al., 2005; Demetris et al., 2006; Xu et al., 2006). Die portale Hyperperfusion und die damit einhergehende Reduktion der arteriellen Durchblutung und die daraus resultierende Ischämie wird folglich als die Hauptursache für das SFSS angesehen (Troisi et al., 2005).

### 3.5 Präkonditionierung des Lebergewebes

Der limitierende Faktor der Leberresektion stellt das verbliebene Restlebergewebe bzw. dessen Funktion nach Resektion dar. Daher ist es wichtig, eine adäquate Funktionalität des verbliebenen Leberparenchyms zu garantieren (Garcea, Maddern, 2009). Dies spielt im Speziellen bei Patienten mit einer vorbestehenden Lebererkrankung wie etwa einer Zirrhose, Steatosis oder beispielsweise einer alkoholischen bzw. nichtalkoholischen Steatohepatitis eine wichtige Rolle (Vauthey et al., 2006; Gomez et al., 2007; Nordlinger et al., 2008).

Strategien, um das Lebervolumen vor einer Teilresektion zu beeinflussen, sind beispielsweise die Pfortaderastembolisation oder -ligatur (Rous, Larimore, 1920). Eine selektive Okklusion eines Pfortaderasts verursacht eine Atrophie des ipsilateralen Leberlappens und eine

Hypertrophie des kontralateralen Leberlappens. Die induzierte Atrophie des okkludierten Leberanteils wird durch eine gesteigerte apoptotische Aktivität verursacht, wohingegen die Hypertrophie des nicht okkludierten Lappens durch eine gesteigerte Zellproliferation induziert wird (Harada et al., 1997).

Die Pfortaderembolisation (PVE, „portal vein embolization“) kann perkutan oder über eine ileokolische Vene nach Minilaparotomie erfolgen. Der zu erwartende Parenchymzuwachs beträgt ca. 10-30%, gelegentlich sogar bis zu 50%. Eine operative Ligatur der Pfortaderäste erzielt im Vergleich zur Embolisation vermutlich einen geringeren Parenchymzuwachs, da hierbei nur der Blutzustrom zum Leberhilus unterbunden, aber nicht das nachgeschaltete intrahepatische Pfortaderstromgebiet verlegt wird. Kollateralen können diese Leberabschnitte weiter perfundieren. Ein weiterer Nachteil der Pfortaderligatur ist die Narbenbildung im Leberhilus, welche die Präparation bei der nachfolgenden Leberresektion erschweren kann (Broering et al., 2002; Lang, 2007). Nach welchem Zeitraum die Hypertrophie abgeschlossen ist, ist weiterhin Gegenstand von Diskussionen. Die meisten Autoren empfehlen die Durchführung der Resektion 3-4 Wochen nach erfolgter PVE (Azoulay et al., 2000; Bechstein, Golling, 2005).

Eine weitere Technik zur Präkonditionierung des Lebergewebes ist die ischämische Präkonditionierung (IP). Diese wurde zunächst tierexperimentell an der Niere und anschließend am Herzen durchgeführt. Zager et al. sowie Cave und Zucchi et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass ein kurzes initiales Ischämie-Reperusions-Intervall vor einer längeren Ischämiezeit das funktionelle Outcome deutlich verbessert (Zager et al., 1984; Cave, Garlick, 2000). Bei der Leber wurde die ischämische Präkonditionierung erstmals 1993 in einem Modell an Ratten von Lloris-Carsi et al. beschrieben (Lloris-Carsi et al., 1993). Hier konnte eine Verbesserung des Überlebens sowie eine verbesserte Leberfunktion nach Resektion nachgewiesen werden. Das zugrunde liegende Prinzip der ischämischen Präkonditionierung ist, dass die Leberzellen durch das kurzzeitige Clamping einem vorübergehenden Stress ausgesetzt werden. Hierdurch wird ein multifaktorieller pathophysiologischer Prozess ausgelöst, welcher zu einer intrahepatischen Verminderung von ATP führt und somit oxidativen Stress hervorruft. Zudem werden inflammatorische Mediatoren freigesetzt (Zhu et al., 2015). Dieser Pathomechanismus soll das Lebergewebe triggern, um den darauffolgenden ischämischen Schaden so gering wie möglich zu halten (Belghiti et al., 1999; Clavien et al., 2003; Petrowsky et al., 2006). Peralta et al. konnte in seiner Studie zeigen, dass durch die IP eine Enzymaktivierung der NO-Synthase erfolgt und dies in einer gesteigerten NO Produktion resultiert. NO bindet und inaktiviert Caspasen. Diese

Inhibition schützt die Leberzellen vor der Apoptose (Peralta et al., 1997; Cursio et al., 1999; Mannick et al., 1999; Natori et al., 1999).

In der Literatur werden, wenn auch nur vereinzelt, Verfahren zur medikamentösen Präkonditionierung des Lebergewebes vor Resektion beschrieben. So berichtet beispielsweise Balzan et al. in einem Modell mit Schweinen über den protektiven Effekt einer Präkonditionierung mit Sevofluran in Hinblick auf das Ischämie-Reperfusionssyndrom (Balzan et al., 2014). Zhang et al. erreichten durch eine Präkonditionierung mit Helium in einem Maus Modell die Phosphorylierung von Akt (Proteinkinase B), einem wichtigen Enzym im Phosphoinositid-3-Kinase-Signalweg, welches zelluläre Prozesse wie Wachstum, Zellproliferation, Zellzyklus und Stoffwechsel reguliert (Zhang et al., 2014).

Sildenafil, Glutamin und N-Acetylcystein sind nur einige von zahlreichen Stoffen, die das Outcome nach ausgedehnter Operation an der Leber verbessern sollen (Savvanis et al., 2014; Uysal et al., 2014; Xu et al., 2014).

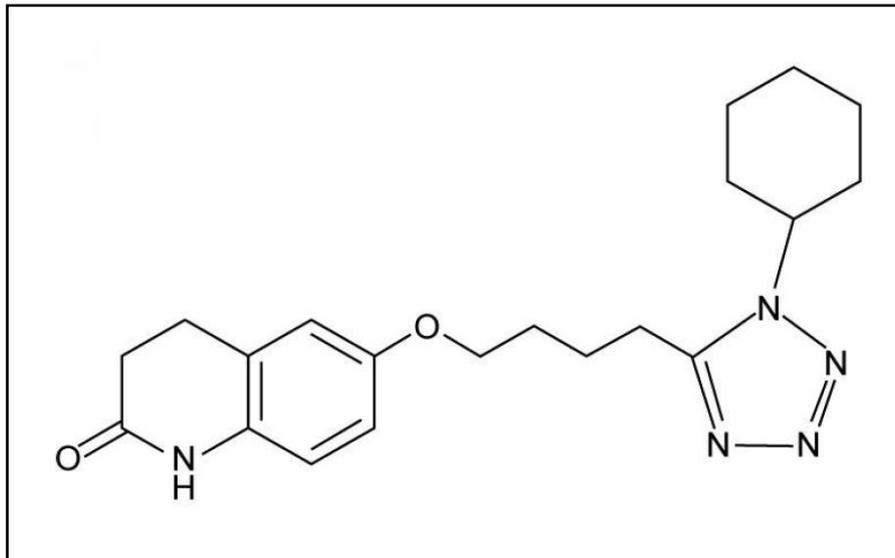
Tian et al. konnten in ihrer Studie an Mäusen zeigen, dass Pentoxifyllin, ein Arzneistoff aus der Gruppe der Xanthin-Derivate, die Synthese von TNF- $\alpha$  in Kupffer-Zellen inhibiert. Eine Unterbrechung des TNF- $\alpha$  Signalwegs konnte den Reperfusionsschaden bei 30% Leberlebendtransplantationen in Mäusen minimieren. So konnte beispielsweise durch eine Inhibierung der TNF- $\alpha$  Synthese durch Pentoxifyllin der Serumspiegel des Enzyms Aspartat-Aminotransferase (ASAT), welcher ein Parameter für eine Leberschädigung darstellt, deutlich gesenkt werden. Der endotheliale Zellschaden konnte somit reduziert und die Überlebensrate signifikant gesteigert werden (Tian et al., 2006). Präkonditionierung mit Pentoxifyllin verbesserte die Leberregeneration und senkte somit die Mortalitätsrate. Es verbesserte die Mikrozirkulation in der transplantierten Leber und förderte die Synthese von anti-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-6 (Cressman et al., 1996; Tian et al., 2006).

Cardiotrophin-1, ein Mitglied der Interleukin-6 (IL-6) Familie, wurde ursprünglich am Herzen entdeckt und schützt dort Herzmuskelzellen, insbesondere vor ischämischen Insulten. Darüber hinaus schützt es unreife Kardiomyozyten vor dem Untergang und sorgt für deren Proliferation. Bustos et al. konnten zeigen, dass Cardiotrophin-1 auch in der sich regenerierenden Rattenleber aufgrund seiner antiapoptotischen Wirkeigenschaften eine wichtige Rolle spielt. Die Behandlung mit Cardiotrophin-1 konnte Ratten vor dem fulminanten Leberversagen nach ausgedehnter Hepatektomie bewahren (Bustos et al., 2003).

Wie oben gezeigt, gibt es bis dato zwar zahlreiche medikamentöse Ansätze einer medikamentösen Präkonditionierung, es konnte jedoch noch keine medikamentöse Behandlung etabliert werden, welche in der Klinik signifikant die Regenerationsfähigkeit der Leber verbessern kann.

### 3.6 Cilostazol

Cilostazol ist ein selektiver Phosphodiesterase-III (PDE-3) Inhibitor mit partieller Wirkung auf die Phosphodiesterase-V (PDE-5) (siehe Abb. 2). Die PDE-3 erhöht den Abbau des cyclischen 3'-5'-Adenosinmonophosphats (cAMP). Die vasodilatatorische Wirkung sowie die verschiedenen antithrombotischen Effekte, wie beispielsweise die Hemmung der Thrombozytenaggregation, lässt sich durch das intrazelluläre Vorkommen von PDE-3 in Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen erklären (Schorr, 2002). Cilostazol erhöht die intrazelluläre Konzentration von cAMP und hemmt so wirksam die Aggregation der Thrombozyten. Interessanterweise verhindert Cilostazol auch eine durch Scherstress induzierte Thrombozytenaggregation, welche durch Aspirin nicht verhindert wird. Eine verlängerte Blutungszeit besteht bei der Einnahme von Cilostazol im Gegensatz zu den herkömmlichen Aggregationshemmern jedoch nicht. Dies konnte in zahlreichen Studien nachgewiesen werden (Elam et al., 1998; Tamai et al., 1999). Die aggregationshemmende Wirkung von Cilostazol wird durch die Hemmung des Adenosin-Reuptakes noch verstärkt. Adenosin alleine hat keine große Wirkung auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation. Dass Adenosin jedoch eine wichtige Rolle in der Hemmung der Plättchenaggregation spielt, konnten zahlreiche Studien, in denen exogenes Adenosin zugeführt wurde, zeigen. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei der Thrombozytenaggregation durch Cilostazol in Abwesenheit von Adenosin. Kombiniert man jedoch Cilostazol und Adenosin, zeigt sich eine vollständige Inhibition der Thrombozytenaggregation. Der Mechanismus, wie Cilostazol die Wiederaufnahme von Adenosin hemmt, ist weiterhin nicht vollständig geklärt (Liu et al., 2000; Sun et al., 2002). Ein weiterer Effekt des PDE-3-Hemmers ist seine antithrombotische Wirkung. Kohda et al. konnten in einem Modell mit Schweinen nachweisen, dass Cilostazol die Plättchenaggregation nach Schädigung des Endotheliums der Arteria carotis communis signifikant inhibiert (Kohda et al., 1999). Die antithrombotische Wirkung konnte ebenfalls in zahlreichen Studien nach Implantation von Koronarstents oder zur Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) nachgewiesen werden (Schomig et al., 1996; Dawson et al., 1998).



**Abbildung 2: Chemische Struktur von Cilostazol.**

6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2(1H)-chinolinon. [Abb. aus (Seo et al., 2015)].

In einem Schlaganfallmodell mit Mäusen, bei denen eine intraluminale Okklusion der Arteria cerebri media durchgeführt wurde, erzielte die Gabe von Cilostazol eine Reduzierung des Infarktolumens. Weiterhin konnte eine signifikante Verbesserung des klinisch-neurologischen Outcomes im Sinne einer schnelleren Erholung von neurologischen Defiziten in der mit Cilostazol behandelten Gruppe gezeigt werden. Außerdem konnte eine Stimulierung der Neurogenese durch Cilostazol nachgewiesen werden (Tanaka et al., 2010). Cilostazol reduziert signifikant das Wiederauftreten eines Schlaganfalls bei stattgehabtem ischämischem Ereignis (Gotoh et al., 2000; Shinohara et al., 2010; Shi et al., 2014). Ferner besitzt Cilostazol eine antiinflammatorische Wirkung (Park et al., 2010).

Cilostazol scheint also in vielfältige physiologische Abläufe einzugreifen. Für die vorliegende Studie von Bedeutung, ist die mögliche Verbesserung der Leberregeneration durch PDE-3-Hemmer. Akcan et al. konnten in einem Leberresektionsmodell an Ratten zeigen, dass die Gabe von Amrinon, einem anderen Phosphodiesterase-III-Inhibitor, sowohl die funktionelle als auch die morphologische Regeneration der Leber nach ausgedehnter Resektion verbessert (Akcan et al., 2006).

## 4 FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung von Cilostazol, einem Phosphodiesterase-III-Inhibitor im Rahmen einer 70% Leberresektion in Sprague-Dawley Ratten untersucht. Dabei waren folgende Fragen von Interesse:

- Kann durch die medikamentöse Therapie der hepato-arterielle Blutfluss nach 70% Hepatektomie verbessert werden?
- Besteht ein Unterschied bezüglich der Mikrozirkulation im verbliebenen Restlebergewebe?
- Ist eine gesteigerte Regenerationsrate unter Cilostazolgabe festzustellen?
- Wird die exkretorische Leberleistung durch die Behandlung beeinflusst?
- Kann durch Cilostazol eine Verringerung des hepatozellulären Schadens nach ausgedehnter Leberresektion erreicht werden?

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von  $253\text{g} \pm 2,9\text{g}$  durchgeführt. Die Tiere stammten aus dem Institut der Experimentellen Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Dort befanden sie sich während des gesamten Versuchsvorhabens unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur  $22^{\circ}\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit 55%) in einem 12h Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere hatten bis 24h vor dem Versuch freien Zugang zu standardisiertem Laborfutter und bis unmittelbar vor Versuchsbeginn freien Zugang zu Trinkwasser ad libitum.

Die Experimente und die Tierhaltung entsprachen den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes. Eine Genehmigung für das Vorhaben lag von den zuständigen Behörden und der Ethikkommission vor.

### 5.2 Cilostazol

Der Wirkstoff Cilostazol ist ein Phosphodiesterase-III-Hemmer der unter dem Handelsnamen Pletal<sup>®</sup> (UCB Pharma, Anderlecht (Brüssel) Belgien) bei Claudicatio intermittens, d.h. eine pAVK ohne Ruheschmerz oder Anzeichen von peripheren Gewebsnekrosen (pAVK Fontaine-Stadium II) zugelassen ist. Der Wirkstoff wird in Tablettenform (50mg; 100mg) angeboten. Studien zeigten, dass Cilostazol eine wesentliche Rolle in der Verbesserung der Gehstrecke bei pAVK spielt. Die maximale Gehstrecke verbesserte sich im Mittel um 21%. Gleichzeitig zeigte sich eine Verbesserung der Lebensqualität und der klinischen Verfassung der Patienten (Strandness et al., 2002).

### 5.3 Experimentelles Protokoll und Versuchsmodell

Die Versuchstiere (n=74) wurden randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. 32 Tiere erhielten zweimal täglich über fünf Tage hinweg in einer 1ml Spritze in NaCl-Glucose aufgelöstes Cilostazol per os (5mg/kg/KG). Die Kontrollgruppe erhielt entsprechend ein Placebo in Form einer NaCl-Glucose-Lösung. Nach erfolgter Resektion wurde die Medikamentengabe bzw. Placebogabe bis zum Ende des Versuches in den jeweiligen Gruppen fortgeführt.

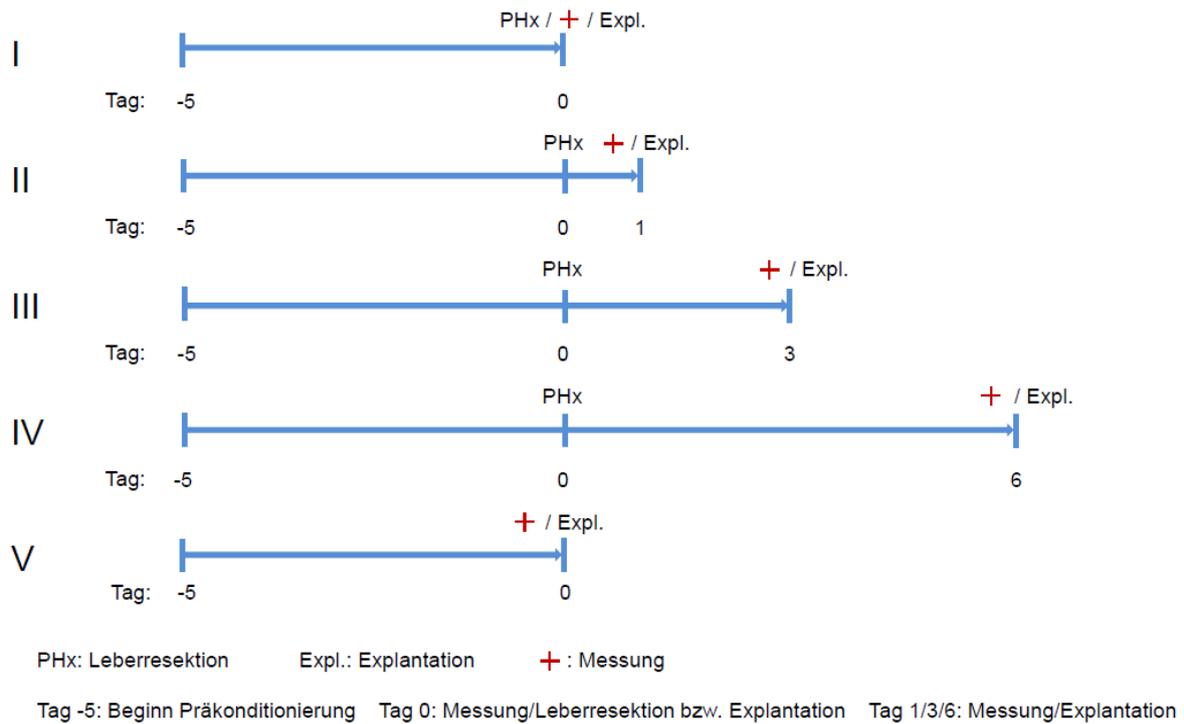
Weitere 10 Tiere dienten als Sham-Kontrollgruppe und erhielten keine Resektion. Jeweils 5 erhielten Cilostazol, die anderen 5 Tiere die Trägersubstanz (siehe Tab. 1).

Nach 5-tägiger Präkonditionierung erhielten die Tiere anschließend in einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran eine 70% Leberresektion nach Higgins und Anderson. Vor und nach Resektion wurden verschiedene Messungen hinsichtlich des hepatischen Blutflusses, der Mikrozirkulation, sowie des Galleflusses durchgeführt. Nach 24h, 72h und 144h wurden die Messungen in den jeweiligen Gruppen erneut durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere getötet und das Lebergewebe für histologische Untersuchungen entnommen. Die Behandlung mit Cilostazol oder Placebo wurde auch nach erfolgter Resektion bis zum Ende des Versuches fortgeführt. Zusätzlich wurden zehn Tiere wiederum randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt und mit Cilostazol oder Placebo fünf Tage präkonditioniert, um den Einfluss von Cilostazol auf den hepatischen Blutfluss unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Diese Tiere erhielten keine Leberresektion (siehe Abb. 3).

Gruppen	Cilostazol	NaCl-Glucose Lösung
I	Tag 0	Tag 0
II	Tag 1	Tag 1
III	Tag 3	Tag 3
IV	Tag 6	Tag 6
V	Kontrolle	Kontrolle

**Tabelle 1: Gruppenaufteilung.**

Gruppe I-IV: Leberresektion an Tag 0, Explantation des Restlebergewebes an Tag 0, 1, 3 und 6. (Präkonditionierung für 5 Tage sowie bis zum Versuchsende). Gruppe V: Kontrolle, keine Leberresektion, Explantation der Leber (nach 5-tägiger Präkonditionierung).



**Abbildung 3: Versuchsablauf und Gruppeneinteilung im Überblick.**

(+ „Messung“: Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Bestimmung des hepato-arteriellen und portalvenösen Blutflusses sowie der Mikrozirkulation und der Gallensekretion).

### 5.3.1 Präoperative Vorbereitung und Anästhesie

Nach fünftägiger Präkonditionierung mit Cilostazol oder Placebo (NaCl-Glucose-Lösung) erfolgte die Durchführung der Versuche.

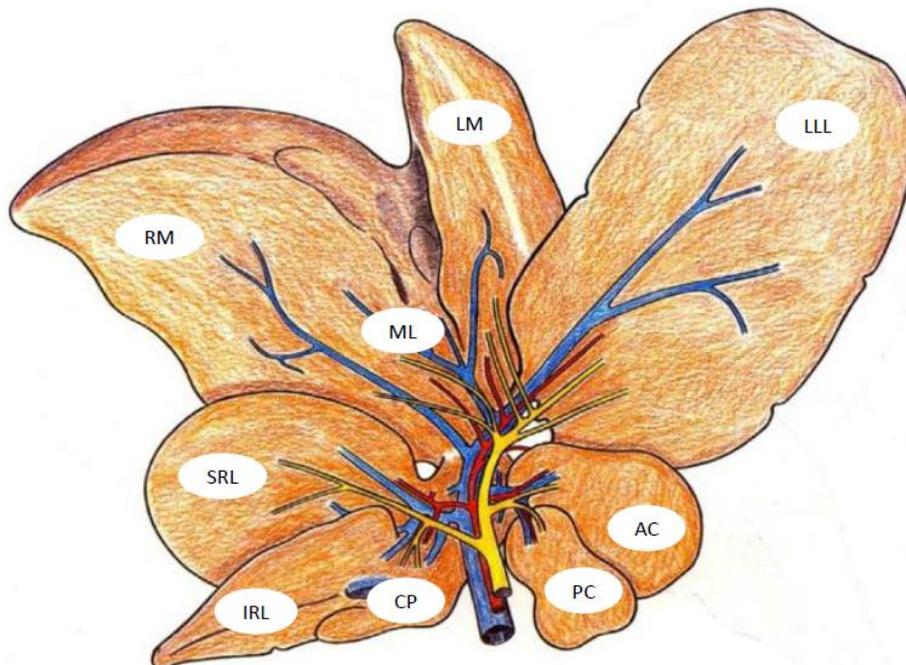
Zur Narkoseeinleitung wurde das Tier in eine Plexiglas-Box gesetzt. In diese Box wurde ein Narkose-Sauerstoffgemisch (Isofluran, Baxter International, Deerfield, Illinois, USA) eingeleitet. Danach wurden die Tiere gewogen. Nach der Rasur der Bauchregion (Electra GH 204; Aesculap, Tuttlingen) wurden die Tiere mit Hilfe von Tape in Rückenlage auf dem OP Tisch fixiert. Auf dem Operationstisch wurde ein Hezelement (Effenberger, Pfaffing/Attel, BRD) angebracht um die Körpertemperatur der Versuchstiere während der Operation konstant bei 36-37°C zu halten. Unmittelbar nach Lagerung der Ratten auf dem Operationstisch wurde diesen eine Maske über die Schnauze gestülpt. Hierüber wurde das Isofluran-Sauerstoff-Gemisch zur Aufrechterhaltung der Narkose zugeführt. Die Konzentration des Gasgemisches wurde im Verlauf auf einen Anteil von 1,5% reduziert, um eine Atemdepression zu verhindern.

### 5.3.2 Chirurgische Präparation der 70% Leberresektion

Nach den in Punkt 5.5.1 durchgeführten Schritten erfolgte die 70% Leberresektion in Anlehnung an die Methoden von Higgins und Anderson.

Die Anatomie der Rattenleber unterscheidet sich von der des Menschen. Die Leber der Ratte wird aus deutlich voneinander abgrenzbaren Leberlappen gebildet. Die beiden größten Leberlappen sind der mediane (ML) und der links lateral (LLL) gelegene Leberlappen. Der ML wird weiter in einen rechten (RM) und einen linken medianen (LM) Leberlappen unterteilt. Rechts der Vena cava inferior (IVC) befindet sich ein nach unten spitz zulaufender der IVC anliegender rechter Leberlappen, welcher in einen superioren rechten (SRL) und einen inferioren rechten (IRL) Leberlappen unterteilt wird. Der kaudale Leberlappen (CL) teilt sich in drei weitere kleine Leberlappen: Lobus caudatus anterior (AC), Lobus caudatus posterior (PC) und kaudaler Fortsatz (CP). AC und PC liegen links der IVC an den Magen angrenzend (Martins et al., 2008). Eine weitere Besonderheit ist, dass die Ratte keine Gallenblase besitzt. Die Gallengänge aus den Leberlappen vereinigen sich direkt zum Ductus choledochus (siehe Abb. 4).

Für die Durchführung einer konventionellen 70% Leberresektion an der Ratte werden hierzu der ML und der LLL reseziert. Dies entspricht etwa 70% des Gesamtlebervolumens.



**Abbildung 4: Anatomie der Rattenleber.**

Die Zeichnung zeigt den Leberhilus einer Ratte mit dem portalen Gefäßsystem, dem arteriellen Gefäßsystem und dem biliären Drainagesystem. ML: mittlerer Leberlappen; LM: linker mittlerer Leberlappen; RM: rechter mittlerer Leberlappen; LLL: linker lateraler Leberlappen; SRL: superiorer rechter Leberlappen; IRL: inferiorer rechter Leberlappen; AC: Lobus caudatus anterior; PC: Lobus caudatus posterior; CP: kaudaler Fortsatz (Abbildung modifiziert nach (Aller et al., 2012)).

Zunächst wurde ein Schmerzreiz an der Hinterpfote gesetzt, um die Narkosetiefe zu kontrollieren. Bei ausreichender Narkosetiefe erfolgte nun eine mediane Längslaparotomie. Hierzu wurde der Hautschnitt durchgeführt und die Haut bis zum Xyphoid in stumpfer Präparation mit der Schere unterminiert. Die Linea alba wurde dargestellt und das Abdomen entlang selbiger mit einem kleinen Schnitt eröffnet. Die Wundränder wurden mit einem Spatel zur besseren Übersicht weggehalten. Anschließend wurde die Oberbauchregion exponiert. Es erfolgte die Mobilisation der Leber. Die Haltebänder wurden hierzu vorsichtig durchtrennt. Die versorgenden Gefäße des linkslateralen und medialen Leberlappens wurden im nächsten Schritt dargestellt. Nun erfolgte die Ligatur dieser Leberlappen so nah wie möglich am Gefäßabgang mittels Faden (Vicryl 2-0, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Nach Dunkelfärbung wurden die entsprechenden Leberlappen mit einer Schere sodann reseziert. Es erfolgte die Blutstillung mittels Bipolarpinzette. Nach Kontrolle der Bluttrockenheit wurde das Abdomen zweischichtig mittels fortlaufender Naht (Vicryl 3-0) verschlossen. Die Narkosezufuhr wurde ausgeschaltet und die Tiere in Einzelkäfige gebracht. Um eine Auskühlung der Tiere zu verhindern, wurden die Käfige bis zum vollständigen Erwachen der Tiere unter einer Wärmelampe positioniert.

Die Tiere erhielten nach erfolgter Resektion Wasser und Futter ad libitum. Zur Analgesie wurde dem Trinkwasser Tramal®-Tropfen-Lösung (50mg/100ml) (Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) zugesetzt.

### 5.3.3 Chirurgische Präparation und Entnahme des Restlebergewebes

Die Tiere wurden entsprechend den zugehörigen Gruppen am jeweiligen Tag zur Entnahme des verbliebenen Lebergewebes und Messung der Parameter herangezogen.

Hierzu wurden die Tiere aus dem Käfig genommen und zur Narkoseeinleitung wiederum in eine Plexiglas-Box gesetzt und das Narkose/Sauerstoffgemisch (Isofluran, Baxter) eingeleitet. Danach wurden die Tiere erneut gewogen. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde Pentobarbital intraperitoneal appliziert (50mg/kg/KG i.p., Narcoren; Braun, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurden die Tiere am Bauch rasiert und auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte gelagert, um die Körpertemperatur während des Versuches konstant auf 36-37 °C zu halten. Die Schnittführung erfolgte entlang des alten OP-Zugangs, wobei der Schnitt zur besseren Übersicht nach cranial und caudal erweitert wurde. Durch einen medialen Schnitt entlang der Linea alba wurde das Abdomen eröffnet. Nun wurden die Arteria hepatica propria, die Vena portae hepatis und der Ductus choledochus vorsichtig aus dem Ligamentum hepatoduodenale präpariert und freigelegt. Um den Gallefluss analysieren zu können, wurde

der Ductus choledochus punktiert und ein Katheter (PE-30, 0.28mm i.d.; Portex, Hythe, UK) eingeführt. Die Galleflüssigkeit wurde über zehn Minuten in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Mittels perivaskulärer Messsonden (0.5V; Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) wurde der Pfortaderfluss und Leberarterienfluss gemessen. Die Perfusion des Leberparenchyms wurde ebenfalls mit Hilfe eines Laser-Doppler-Flussmessers untersucht.

Am Ende des Experiments wurde das Restlebergewebe vollständig explantiert und unmittelbar das Leberfeuchtgewicht ermittelt. Danach wurde das Lebergewebe mit einem Skalpell geteilt. Für die histologischen Untersuchungen wurde es in 4%iger Formalin-Lösung gelagert. Das verbliebene Lebergewebe wurde zunächst in Flüssigstickstoff schockgefroren und danach bis zur weiteren Auswertung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 5.4 Untersuchungstechniken

### 5.4.1 Ultraschall-Flussmessungen

Der hepatische Blutfluss wurde mittels Ultraschall-Messsonden in ml/min gemessen und in ml/g LG/min umgerechnet. Hierzu wurde eine Sonde (0.5V; Transonic Systems, Ithaca, NY, USA) um die Arteria hepatica propria angebracht und gleichzeitig eine weitere Sonde (1.5R; Transonic Systems) um die Vena portae hepatis. So war es möglich die beiden Blutflüsse simultan zu messen. Die beiden Sonden wurden an einen Flussmesser (T206 Animal Research Flowmeter, Transonic Systems) angeschlossen und der Blutfluss über fünf Minuten aufgezeichnet.

### 5.4.2 Laser-Doppler-Flussmessung

Die Perfusion des verbliebenen Leberparenchyms wurde mit einem Laser-Doppler Flussmesser (PeriFlux System 500 model, Perimed Inc., United Kingdom) untersucht. Um eine möglichst genaue und reproduzierbare Messung der Mikrozirkulation zu erhalten, wurden vor dem Aufsetzen der Messelektrode die Ligamente der Leber durchtrennt um so Messfehler durch Atembewegungen des Diaphragmas zu vermeiden. Die fiberoptische Elektrode wurde dann an der dicksten Oberfläche des rechten lateralen Leberlappens platziert und über den gesamten Zeitraum der Messung nicht bewegt.

### 5.4.3 Gallensekretion

Zur Feststellung der exkretorischen Leberleistung wurde der Ductus choledochus mit einem Katheter (PE-30, 0.28mm i.d.; Portex, Hythe, United Kingdom) kanüliert und die Gallenflüssigkeit in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß über zehn Minuten gesammelt. Während dieser zehn Minuten wurde keine andere Untersuchung parallel durchgeführt, um durch mechanische Manipulation eine Beeinflussung des Gallenflusses zu verhindern.

### 5.4.4 Lebergewicht

Zu Beginn der Experimente wurde das Körpergewicht jedes Tieres ermittelt. Durch die Auswertung der Sham-Gruppe konnte gezeigt werden, dass unter normalen Bedingungen das Lebergewicht etwa 3% des Gesamtkörpergewichts der Ratte entspricht. Je nach Gruppenzugehörigkeit wurde das verbliebene Restlebergewebe nach 1h, 24h, 72h und 144h explantiert und unmittelbar das Leberfeuchtgewicht erfasst. Um nun eine Aussage über die Regenerationsrate der Leber anhand der Gewichtszunahme treffen zu können, wurde das relative Lebergewicht bestimmt. Das relative Lebergewicht ist somit ein Hinweis auf die Regenerationsrate. Diese wird in Prozent angegeben und mit folgender Formel ermittelt (Kollmar et al., 2010):

Regenerationsrate =  $[\text{Restlebergewebe zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt} - (\text{geschätztes Gesamtlebergewicht} - \text{reseziertes Lebergewicht}) / \text{Gesamtlebergewicht}] * 100$ .

Am Ende des Experiments wurde das verbliebene Lebergewebe explantiert und sofort im Anschluss das Leberfeuchtgewicht ermittelt. Die Tiere wurden vor dem Versuch ebenfalls gewogen, um so die Leber-Körpergewicht-Ratio bestimmen zu können.

## 5.5 Histomorphologie

Das nach Versuchsende gewonnene Lebergewebe wurde in 4% phosphatgepuffertem Formalin für etwa zwei bis drei Tage bei 4°C fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

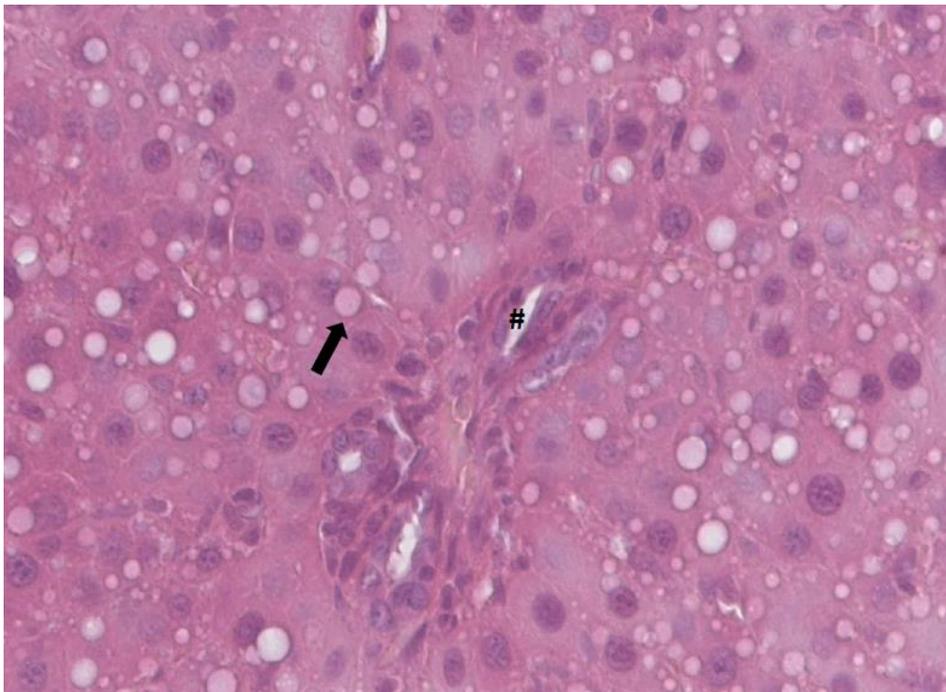
### 5.5.1 Leberhistologie (Hämatoxylin-Eosin)

Aus dem gewonnenen Gewebe wurden 5µm Schnitte gefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für histologische Untersuchungen am Lichtmikroskop gefärbt.

Die HE-gefärbten Präparate wurden semiquantitativ und verblindet ausgewertet. Hierbei wurde die zytoplasmatische Vakuolisierung von Hepatozyten beurteilt (siehe Abb. 5).

Hierfür kamen pro Leberschnitt 20 High Power Fields (HPF) zur Auswertung, wobei die Vakuolisierung in verschiedene Grade von 0-4 eingestuft wurden:

- Grad 0 = keine (0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 1 = gering (<10% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 2 = leicht (10%-25% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 3 = mäßig (25%-50% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 4 = stark (>50% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)



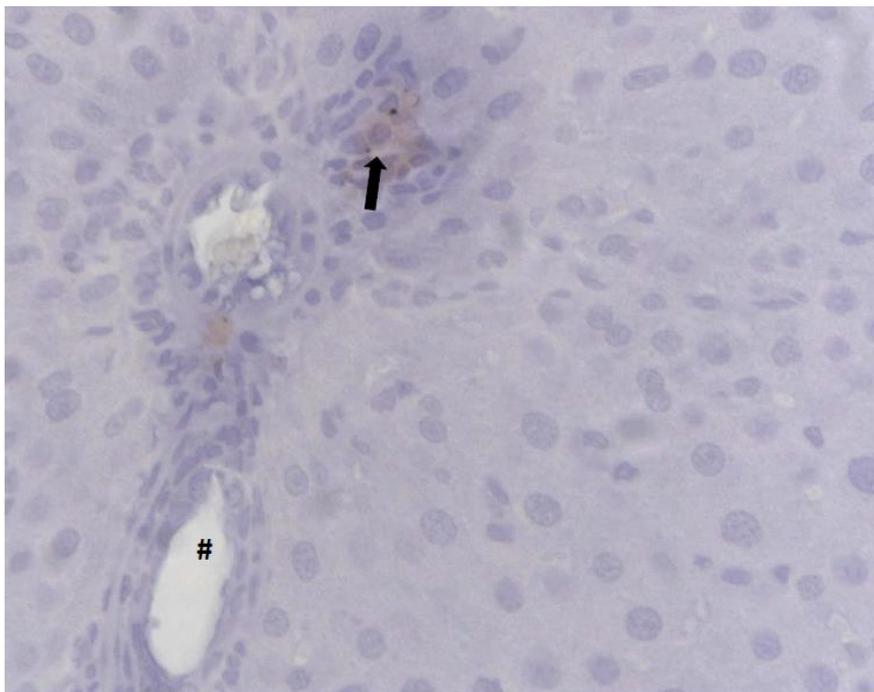
**Abbildung 5: HE-gefärbter Schnitt von Lebergewebe.**

Das Gewebe stammt von einem Cilostazol behandelten Tier, welchem an Tag 3 des Versuchs das verbliebene Restlebergewebe entnommen wurde. Portalfeld (#) und Vakuolisierung (Pfeil). Vergrößerung 200-fach.

## 5.6 Immunhistochemie

### 5.6.1 Caspase-3

Zur Auswertung der Apoptoserate im Lebergewebe wurden 5µm Schnitte von in Paraffin eingebettetem Lebergewebe angefertigt. Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für zehn Minuten inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Die Präparate wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer 30 Minuten mit PBS (1ml) und Normalserum (30µl) inkubiert. Danach wurden die Schnitte bei 4°C über Nacht im Kühlschrank mit polyklonalen „Rabbit Anti Cleaved Caspase-3“ Antikörpern (75µl, Verdünnung 1:100, Cell signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper „goat-anti-rabbit“ (100µl, Verdünnung 1:100) für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Als Chromogen wurde 3,3 Diaminobenzidin (DakoCytomation) verwendet. Schließlich wurden die Schnitte mit Hämalaun nach Meyer gegengefärbt (siehe Abb. 6).



**Abbildung 6: Cleaved-Caspase 3-gefärbter Schnitt von Lebergewebe.**

Das Gewebe stammt von einem Cilostazol behandelten Tier, welchem an Tag 6 des Versuchs das verbliebene Restlebergewebe entnommen wurde. Portalfeld (#) und Caspase-3 positive Zelle (Pfeil). Vergrößerung 200-fach.

### 5.6.2 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Zur Auswertung der Regenerationsrate im Leberparenchym wurde PCNA als Indikator für Zellproliferation herangezogen. Erneut wurden 5µm dicke Schnitte angefertigt. Der Ablauf der Färbung und Inkubation ist mit dem der Caspase-3 Immunhistochemie vergleichbar. Es wurde jedoch der monoklonale „rat anti-pan PCNA“ Antikörper verwendet (75µl, Verdünnung 1:50; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Als Sekundärantikörper diente „goat-anti-mouse“ Ig (100µl, Verdünnung 1:100; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte ebenfalls semiquantitativ und verblindet. Es wurden wiederum 20 High Power Fields (HPF) ausgewertet, wobei die positiv markierten Zellen pro HPF gezählt wurden.

Sämtliche histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden an einem Lichtmikroskop (Olympus BX60, Olympus Optical, Company Ltd., Japan) mit einer 40-fachen Vergrößerung durchgeführt. An das Mikroskop war eine Kamera (Zeiss Axio Cam, Zeiss, Jena, Deutschland) angeschlossen, die eine Darstellung der Bilder in Echtzeit auf einem Computermonitor ermöglichte.

### 5.7 Vascular Endothelial Growth Factor und Transforming Growth Factor-β

Die SYBR Green Real-Time PCR diente zum Nachweis der Genexpression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Transforming Growth Factor-β (TGF-β). Es erfolgte hierzu die Extraktion von Total-RNA durch die Trizol-Extraktion aus dem in flüssigem Stickstoff gefrorenen Lebergewebe nach den Methoden des Herstellers (In vitro gen life technologies, Heidelberg, Deutschland). Die Reinheit und Konzentration wurde durch spektrophotometrische Messungen festgestellt. Sodann wurde 1µg der Total-RNA durch das reverse Transkriptase iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) durch Inkubation für 30min bei 42°C und für weitere 5min bei 85°C in cDNA transkribiert. Nun wurde cDNA entsprechend 400ng Total-RNA zur Durchführung einer real-time PCR verwendet (MJ Mini, Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, California, USA). Jede Reaktion wurde zweifach mit je 10µL cDNA und 12,5µL iQ SYBR green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH), 0,5µL Primer (10µM, VEGF<sub>sense</sub> 5'-CCAAAGCCAGCACATAGGAG-3', VEGF<sub>antisense</sub> 5'-TTTCTCCGCTCTGAACAAGG-3'; TGF-β<sub>sense</sub> 5'-GGAATACAGGGCTTTCGC TTCA-3', TGF-β<sub>antisense</sub> 5'-TCGGTTCATGTCATGGATG GTG-3'; β-Actin<sub>sense</sub> 5'-TGTGTGGATTGGTGGCTCTA-3',

$\beta$ -Actin<sub>antisense</sub> 5'-AGTCCGCCTAG AAGCATTTG -3', Sigma-Aldrich) in einem Gesamtvolumen von 25 $\mu$ L durchgeführt.

Die Proben wurden durch folgendes Zyklusprofil vervielfältigt: 95°C für 3min zur initialen DNA Prä-Denaturierung, 40 Zyklen der Denaturierung bei 95°C für 30s gefolgt von 45s bei 58°C und anschließenden weiteren 30s bei 72°C. Die Qualität der PCR Produkte wurde durch die „Melting curve analysis“ kontrolliert. Die Effizienz und die optimale Inkubationstemperatur der Primer wurde durch Reihenverdünnung der cDNA und Temperaturunterschiede in der PCR gewährleistet. Um die Unterschiede in der RNA Qualität zu berichtigen und die Reinheit der Reagenzien sicher zu stellen, wurde  $\beta$ -Actin als Haushaltsgen (housekeeping gene) sowie eine „no template Probe“ als Negativkontrolle verwendet. Der  $\beta$ -Actin Spiegel wurde zur Normalisierung der Zielgen mRNA Werte in die entsprechenden cDNA Proben verwendet. Die relative Quantifizierung von VEGF und TGF- $\beta$  wurde durch die Comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode, bei der  $\Delta\Delta Ct = Ct_{VEGF} - Ct_{\beta-Actin}$  or  $\Delta\Delta Ct = Ct_{TGF-\beta} - Ct_{\beta-Actin}$  entspricht, kalkuliert. (CFX Manager Software, Version 2.1, Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, California, USA).

## 5.8 Western Blot

Zur Proteinextraktion und Western Blot Analyse von VEGF wurde das Lebergewebe von Tag 1 und Tag 6 nach Leberresektion sowie das Lebergewebe der Sham-Gruppe mittels Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN<sub>3</sub>, 0,2 mM PMSF und Protease Inhibitor Cocktail (1:75 v/v; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)) homogenisiert und für 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde es für 30min bei 16.000xg zentrifugiert. Die Proteinkonzentrationen wurden durch die Proteinbestimmung nach Lowry (Lowry Assay (Lowry et al., 2015)) ermittelt. Die Proteinextrakte (30 $\mu$ g Protein pro Bande) wurden diskontinuierlich auf ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel aufgebracht. Polyvinylidenfluorid Membrane dienten als Trägermembran (BioRad Laboratories GmbH). Nach der Blockade der nicht-spezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen zunächst für 4h bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C mit dem „primary rabbit anti-rat anti-VEGF“ Antikörper inkubiert (A20, 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem horseradish peroxidase conjugated donkey anti-rabbit IgG secondary Antikörper (1,5h, 1:5.000, GE Healthcare Amersham, Freiburg, Deutschland). Die Proteinexpression wurde durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht (ECL, GE Healthcare Amersham). Die Signale wurden densitometrisch gemessen (Quantityone, Geldoc, BioRad, München,

Deutschland) und zu  $\beta$ -Aktin-Signalen (1:250, anti- $\beta$ -Aktin, Santa Cruz Biotechnology) genormt um ungleich verteilte Ladungen auszugleichen.

## 5.9 Datenerfassung und Statistik

Die erhobenen Daten wurden zunächst handschriftlich in Vordrucke eingetragen. Anschließend wurden sie in Excel-Tabellen (Microsoft Office Excel 2007 Ink, Microsoft Corporation, USA) übertragen und zusammengefasst.

Aus den ermittelten Parametern wurden die Mittelwerte (MW), die Standardabweichungen (SD) und die Standardabweichungen der Mittelwerte (SEM, Standard error of the mean) erhoben. Nach Untersuchung der Varianzgleichheit und Normalverteilung der Werte wurden die Unterschiede in den Gruppen mittels ANOVA (one-way analysis of variance) durchgeführt. Hierauf folgte ein geeigneter post-hoc Test, der die Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni beinhaltet, um Mehrfachvergleiche zu kompensieren. Falls die Untersuchung der Varianzgleichheit und Normalverteilung der Werte nicht ausreichte, wurde zur statistischen Einordnung der Daten Kruskal-Wallis one-way ANOVA herangezogen, gefolgt von Mehrfachvergleichen versus Kontrollgruppe (Dunn's method). Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurden die Programme SigmaStat und SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet.

## 6 ERGEBNISSE

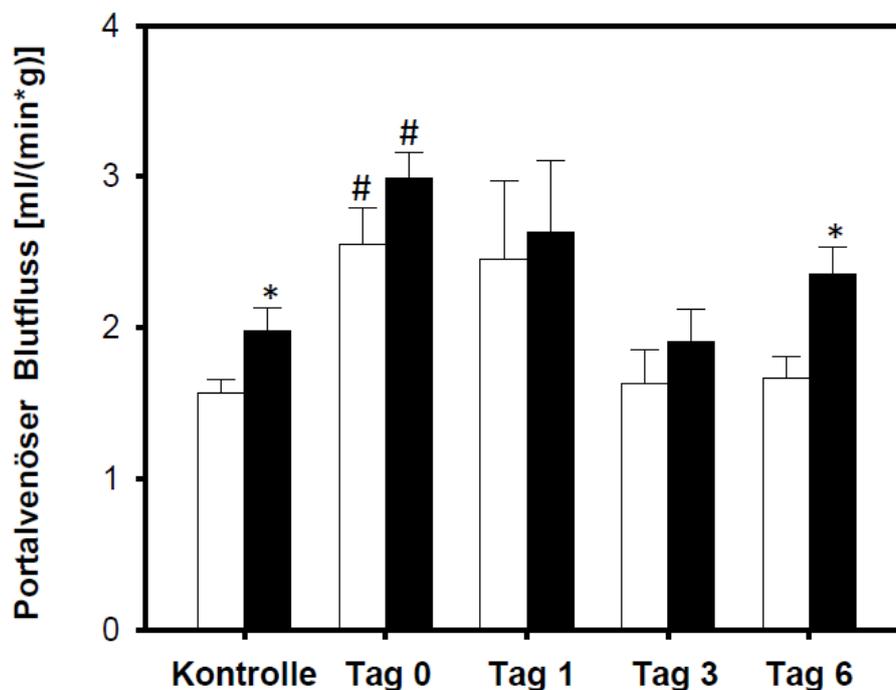
### 6.1 Makro-und Mikroperfusion der Leber

#### 6.1.1 Portalvenöser Blutfluss

Der portalvenöse Blutfluss wurde an Tag 0, 1, 3 und 6 gemessen. Der portalvenöse Blutfluss zeigte sich unmittelbar nach 70% Leberresektion im Vergleich zur Kontrolle in beiden Gruppen erhöht. Die Hepatektomie induzierte einen sofortigen Anstieg des portalvenösen Blutflusses von etwa 50-60 % in Relation zum Lebergewebe, unabhängig davon ob eine Behandlung mit Cilostazol erfolgte oder nicht. Diese zu erwartende Hyperperfusion des verbliebenen Leberparenchyms zeigte sich bis 24h nach erfolgter Resektion. Interessanterweise zeigte sich unter Kontrollbedingungen ohne Resektion, dass die Behandlung mit Cilostazol im Vergleich zum Placebo eine signifikante Erhöhung der portalvenösen Perfusion mit sich brachte. Dieses Resultat konnte erneut an Tag 6 des Versuches erreicht werden. Hier war eine Zunahme von 23% des Blutflusses feststellbar. Im dazwischen liegenden Zeitraum war zwar im Trend eine vermehrte portalvenöse Durchblutung im Vergleich zu den Placebo behandelten Tieren erkennbar, jedoch ohne statistische Signifikanz (siehe Abb. 7)

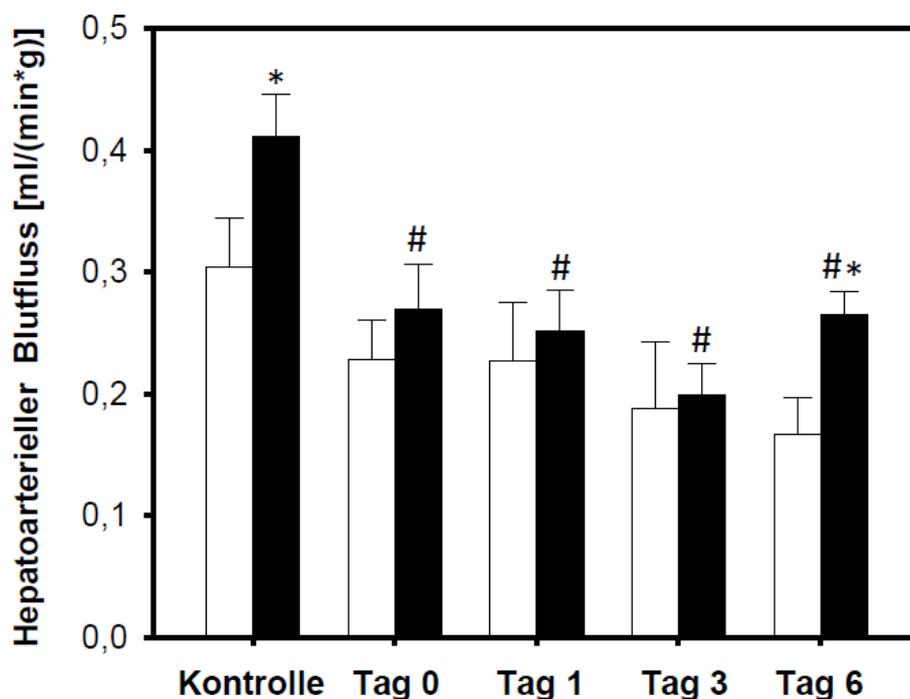
#### 6.1.2 Hepatoarterieller Blutfluss

Simultan zum portalvenösen Blutfluss wurde der arterielle Blutfluss des Restlebergewebes gemessen. Es konnte ebenfalls eine deutliche Zunahme des arteriellen Blutflusses bei Cilostazol behandelten Tieren ohne Resektion festgestellt werden. Diese Steigerung war erneut an Tag 6 unter Cilostazol-Behandlung erkennbar. Unmittelbar nach Resektion sowie an Tag 1 und Tag 3 fand sich ein Abfall des arteriellen Blutflusses im Vergleich zur Cilostazol Kontrolle ohne Resektion. Die Resektion löste eine Senkung des arteriellen Flusses aus, sodass kein signifikanter Unterschied zwischen Cilostazol und Placebo zu den Beobachtungszeiten Tag 0, Tag 1 und Tag 3 messbar war. Obwohl die Resektion einen Abfall des arteriellen Blutflusses auch in der Cilostazol-behandelten Gruppe bewirkte, war der arterielle Blutfluss gleichwohl höher im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen. Eine statistische Signifikanz konnte an Tag 6 erreicht werden (siehe Abb. 8).



**Abbildung 7: Portalvenöser Blutfluss.**

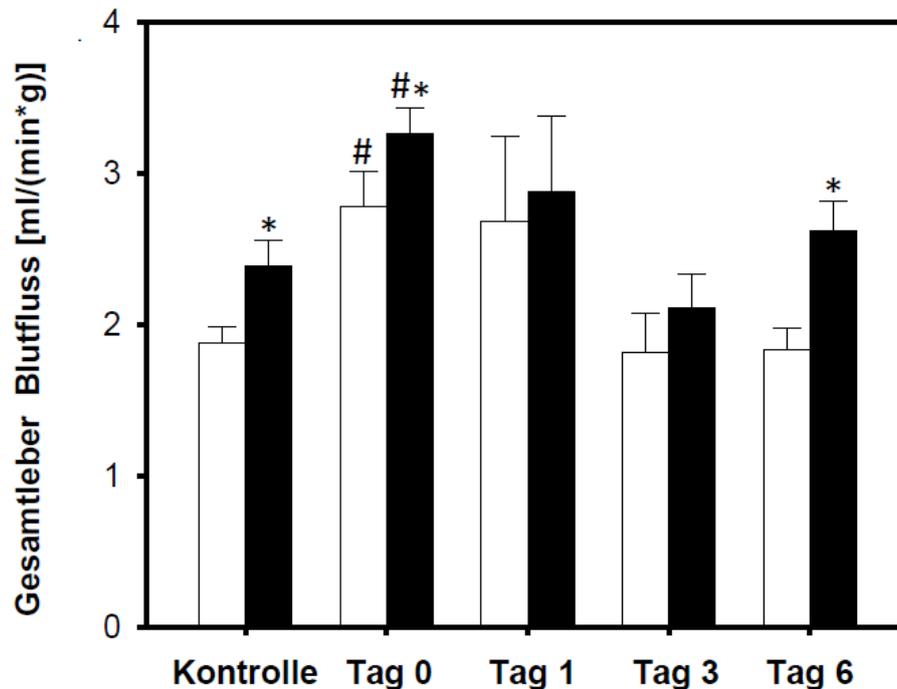
Portalvenöser Blutfluss in ml/min pro Gramm Lebergewicht der nicht-resezierten Tiere (Kontrolle), sowie der Tiere 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) und 144h (Tag 6) nach 70% Leberresektion. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol (schwarze Balken) oder NaCl-Glucose-Lösung (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0.05$  vs. Kontrolle, \* $p < 0.05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.



**Abbildung 8: Hepatoarterieller Blutfluss.**

Hepatoarterieller Blutfluss in ml/min pro Gramm Lebergewicht der nicht-resezierten Tiere (Kontrolle), sowie der Tiere 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) und 144h (Tag 6) nach 70% Leberresektion. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol (schwarze Balken) oder NaCl-Glucose-Lösung (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0.05$  vs. Kontrolle, \* $p < 0.05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.

Die Auswertung des gesamten hepatischen Blutflusses ergab sowohl eine signifikant erhöhte Leberperfusion in den mit Cilostazol behandelten Tieren ohne Leberresektion als auch an Tag 0 und Tag 6 nach erfolgter Leberresektion (siehe Abb. 9).

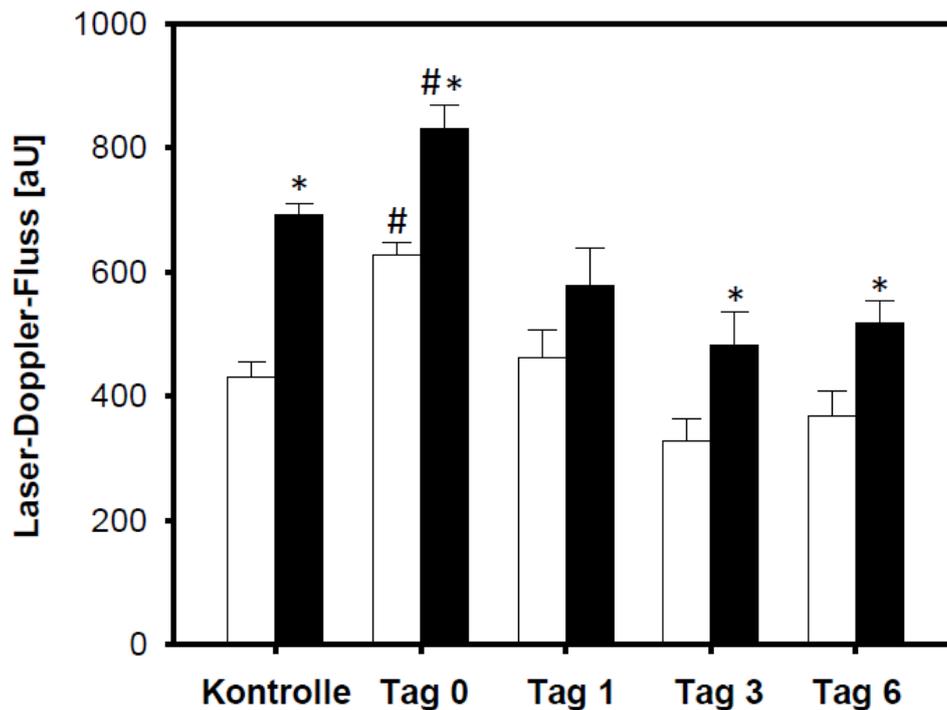


**Abbildung 9: Gesamtleber Blutfluss.**

Gesamtleber Blutfluss in ml/min pro g Lebergewicht der nicht-resezierten Tiere (Kontrolle), sowie der Tiere 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) und 144h (Tag 6) nach 70% Leberresektion. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol (schwarze Balken) oder NaCl-Glucose-Lösung (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0.05$  vs. Kontrolle, \* $p < 0.05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.

### 6.1.3 Mikrozirkulation

Die Analyse der hepatischen Mikrozirkulation mittels Laser-Doppler-Flussmessung ergab eine Verbesserung der Mikroperfusion durch die Cilostazol-Behandlung. Eine Steigerung zeigte sich sowohl unter Kontrollbedingungen ohne Resektion als auch unmittelbar nach Resektion sowie an Tag 3 und Tag 6 nach 70% Leberresektion. Bei den Placebo behandelten Tieren war ein signifikanter Abfall der Mikrozirkulation an Tag 3 nach Resektion feststellbar (siehe Abb. 10).



**Abbildung 10: Hepatische Mikroirkulation.**

Hepatische Mikroirkulation gemessen mittels Laser-Doppler-Flussmetrie in aU der nicht-resezierten Tieren (Kontrolle) sowie der Tiere 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) und 144h (Tag 6) nach 70% Leberresektion. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol (schwarze Balken) oder NaCl-Glucose Lösung (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0.05$  vs. Kontrolle, \* $p < 0.05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.

## 6.2 Organfunktion

### 6.2.1 Gallesekretion

Die exkretorische Leberfunktion wurde mit Hilfe des Galleflusses untersucht. Hierbei wurde für zehn Minuten die Gallenflüssigkeit aufgefangen. Es konnte eine signifikante Erhöhung des Gallenflusses sowohl in der Placebo als auch in der Cilostazol Gruppe an Tag 1 nach Resektion im Vergleich zur Kontrolle ohne Resektion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Der Gallenfluss normalisierte sich im Verlauf des Beobachtungszeitraums bis Tag 6 wieder. Es konnten zu keinem Beobachtungszeitpunkt signifikante Unterschiede bezüglich des Gallenflusses zwischen den Gruppen nach erfolgter Leberresektion beobachtet werden. Eine Beeinträchtigung der exkretorischen Leberfunktion durch die Verabreichung von Cilostazol konnte ebenfalls nicht beobachtet werden (siehe Tabelle 2).

	Kontrolle	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 6
Cilostazol	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,7 ± 0,7*	2,5 ± 0,2	2,2 ± 0,2
NaCl-Glucose	2,0 ± 0,2	1,6 ± 0,3	2,8 ± 0,4*	2,3 ± 0,3	1,9 ± 0,3

**Tabelle 2: Gallenfluss.**

Gallenfluss in nicht-resezierten Tieren (Kontrolle) sowie resezierte Tiere 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) sowie 144h (Tag 6) nach erfolgter 70% Leberresektion. Angaben in  $\mu\text{l/g}$  Leberfeuchtgewicht/min. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol oder NaCl-Glucose-Lösung (Kontrolle). Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.

### 6.3 Lebergewicht

Am Ende des jeweiligen Beobachtungszeitraums wurde das Restlebergewebe entnommen und das Feuchtgewicht unmittelbar im Anschluss ermittelt (siehe Tab. 3 und 4). Dabei wurde das Lebergewicht in Relation zum Körpergewicht berechnet. Eine signifikante Zunahme des Lebergewichtes konnte an Tag 3 und Tag 6 festgestellt werden. Es konnte an Tag 6 unter Cilostazol-Behandlung eine 12% Zunahme des Lebergewichts im Vergleich zur Placebo Behandlung beobachtet werden. Das Ausgangslebergewicht war zum Ende des Beobachtungszeitraums noch nicht erreicht (siehe Abb. 11).

	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 6
Cilostazol	4,1 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,8 ± 0,1	4,7 ± 0,2
NaCl-Glucose	4,3 ± 0,2	4,2 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,5 ± 0,2

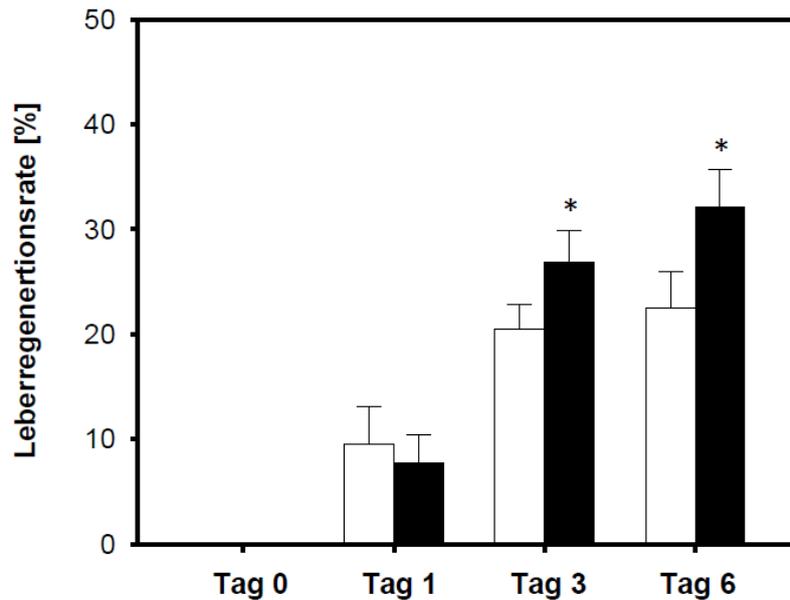
**Tabelle 3: Reseziertes Lebergewicht.**

Reseziertes Lebergewicht als Feuchtgewicht in den resezierten Tieren 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) sowie nach 144h (Tag 6) nach erfolgter 70% Leberresektion. Angaben in g Leberfeuchtgewicht. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol oder NaCl-Glucose-Lösung (Kontrolle).

	Kontrolle	Tag 0	Tag 1	Tag 3	Tag 6
Cilostazol	7,6 ± 0,4	2,3 ± 0,1	3,8 ± 0,3	5,5 ± 0,3	5,6 ± 0,3
NaCl-Glucose	7,2 ± 0,3	2,6 ± 0,2	3,4 ± 0,2	5,1 ± 0,3	5,2 ± 0,2

**Tabelle 4: Explantiertes Lebergewebe.**

Explantiertes Lebergewebe am Ende des Versuchs in nicht-resezierten Tieren (Kontrolle) sowie resezierten Tieren 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) sowie 144h (Tag 6) nach erfolgter 70% Leberresektion. Angaben in g Leberfeuchtgewicht. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol oder NaCl-Glucose-Lösung (Kontrolle).



**Abbildung 11: Leberregenerationsrate.**

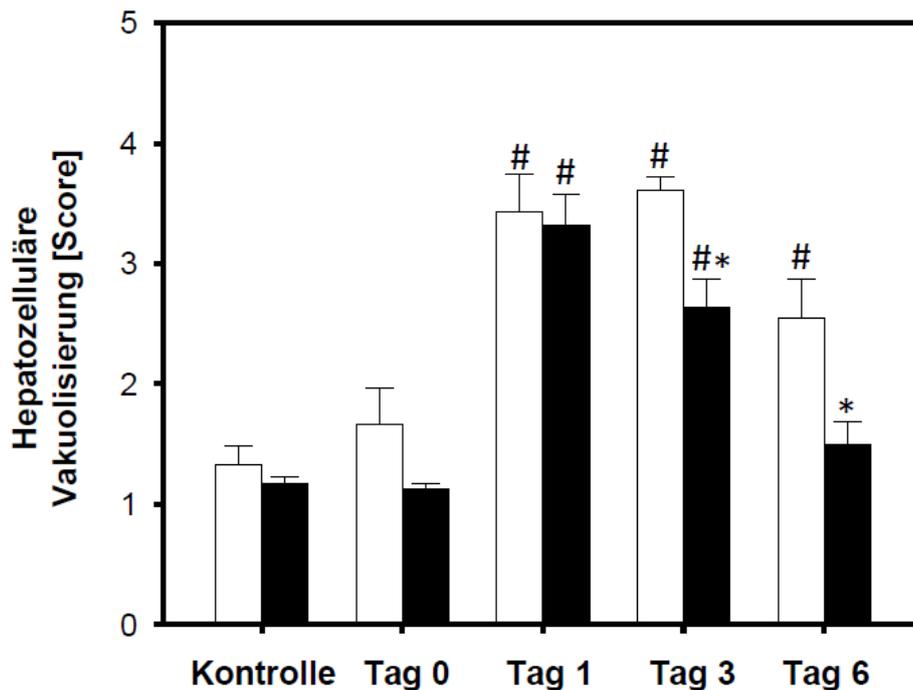
Leberregenerationsrate der Tiere 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) und 144h (Tag 6) nach 70% Leberresektion. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol (schwarze Balken) oder NaCl-Glucose-Lösung (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.

#### 6.4 Leberhistologie Hämatoxylin-Eosin (H&E)

Um den hepatozellulären Schaden durch die Leberresektion zu quantifizieren, wurde eine verblindete semiquantitative Analyse der intrazytoplasmatischen Vakuolisierung der Hepatozyten anhand von HE gefärbten Leberschnitten durchgeführt.

In der Kontrollgruppe ohne Leberresektion konnte gezeigt werden, dass die Präkonditionierung mit Cilostazol im Vergleich zur Placebo behandelten Kontrolle die hepatozelluläre Integrität nicht beeinflusst.

Bei den resezierten Tieren zeigte sich jedoch, dass durch Cilostazol-Behandlung eine signifikante Reduktion der Vakuolisierung an Tag 3 und Tag 6 im Vergleich zum Placebo erreicht werden konnte. Cilostazol konnte jedoch nicht die früh eintretende Vakuolisierung unmittelbar nach Resektion reduzieren (siehe Abb. 12).



**Abbildung 12: Semiquantitative Analyse der hepatozellulären Vakuolisierung.**

Hepatozelluläre Vakuolisierung der nicht-resezierten Tieren (Kontrolle) sowie der Tiere 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) und 144h (Tag 6) nach 70% Leberresektion. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol (schwarze Balken) oder NaCl-Glucose-Lösung (weiße Balken). Die Vakuolisierung wurde in die Grade 0-4 eingeteilt; Grad 0 = keine (0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf), Grad 1 = gering (<10% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf), Grad 2 = leicht (10%-25% der Hepatozyten), Grad 3 = mäßig (25%-50% der Hepatozyten), Grad 4 = stark (>50% der Hepatozyten). Mittelwert  $\pm$  SEM, <sup>#</sup> $p < 0.05$  vs. Kontrolle, <sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.

## 6.5 Immunhistochemie

### 6.5.1 Caspase-3

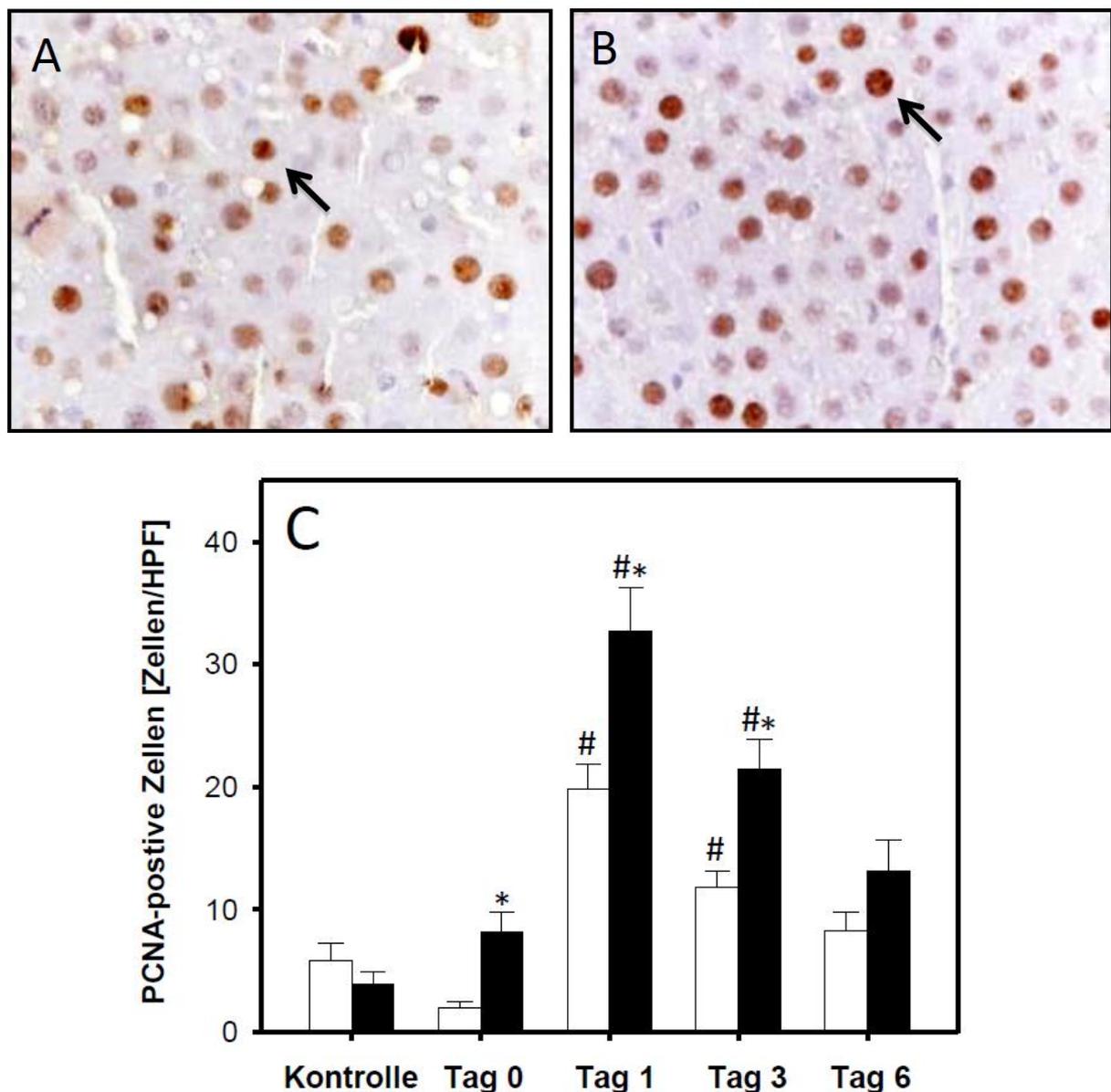
Die Auswertung der Anzahl der Caspase-3 positiven Zellen, welche ein Hinweis auf den apoptotischen Zelluntergang ist, lag in allen Gruppen unter 1%. Dies änderte sich im gesamten Beobachtungszeitraum, auch nach Resektion, nicht.

### 6.5.2 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und Leberregeneration

Die mitotische Aktivität im Lebergewebe wurde durch eine immunhistochemische Färbung der PCNA-Expression bestimmt. Hier zeigte sich vor allem an Tag 1 und Tag 3 nach Resektion eine deutliche Zunahme der PCNA-positiven Zellen pro HPF in beiden Versuchsgruppen. Die Cilostazol-Behandlung führte zu diesen beiden Zeitpunkten zu einer

signifikanten Steigerung der Proliferationsrate im Vergleich zur Placebogruppe. Bemerkenswerterweise zeigte sich unter Kontrollbedingungen ohne Resektion eine gesteigerte PCNA-Aktivität (siehe Abb. 13).

Die Leberregenerationsrate zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Cilostazol behandelten Tieren und den Placebo behandelten Tieren an Tag 1 nach Leberresektion. Es konnte jedoch eine signifikant höhere Regenerationsrate in den Cilostazol behandelten Tieren an Tag 3 und Tag 6 festgestellt werden.



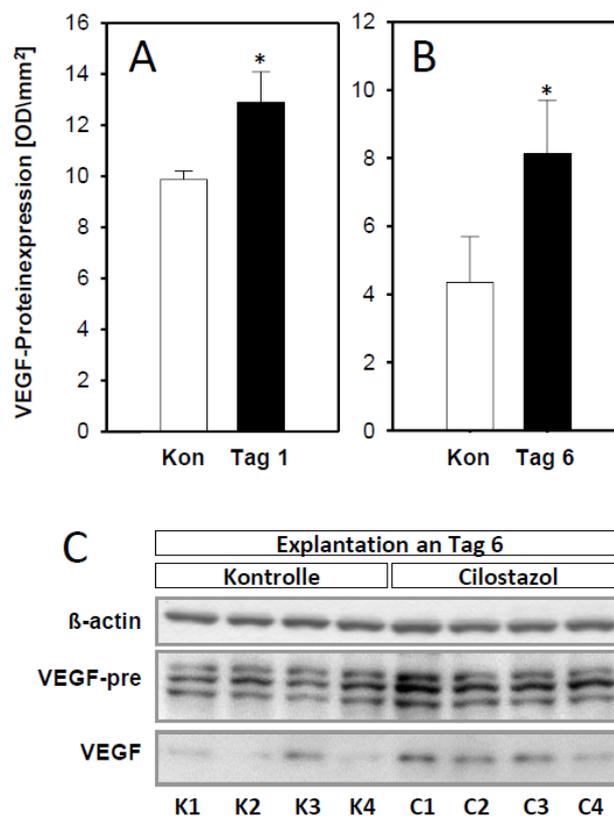
**Abbildung 13: Hepatozelluläre Proliferation (PCNA Immunhistochemie).**

Die Bilder A und B zeigen repräsentative lichtmikroskopische Fotografien PCNA-positiver Zellen (Pfeile) von Lebergewebeschnitten an Tag 1 nach Leberresektion aus dem Restlebergewebe eines nicht-behandelten Tieres (A) sowie eines Cilostazol behandelten Tieres (B), Vergrößerung 200-fach. (C) zeigt die quantitative Analyse PCNA-positiver Zellen der nicht-resezierten Tieren (Kontrolle) sowie der Tiere 30min (Tag 0), 24h (Tag 1), 72h (Tag 3) und 144h (Tag 6) nach 70% Leberresektion. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol (schwarze Balken) oder NaCl-Glucose-Lösung (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, # $p < 0.05$  vs. Kontrolle, \* $p < 0.05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.

## 6.6 Transforming Growth Factor- $\beta$ und Vascular Endothelial Growth Factor Expression

Die Auswertung der PCR bezüglich der TGF- $\beta$ -Genexpression ergab keine signifikanten Unterschiede nach Leberresektion zwischen den Cilostazol behandelten Tieren und den Placebo behandelten Tieren an Tag 1 und Tag 6. Die Genexpression von VEGF zeigte leicht höhere Werte im verbliebenen Restlebergewebe an Tag 1 nach Resektion in den Cilostazol behandelten Tieren ( $4,16 \pm 0,66$  vs.  $3,54 \pm 0,89$ ). An Tag 6 nach Leberresektion zeigte sich sogar ein 3-facher Anstieg der VEGF Genexpression in der Cilostazol Gruppe im Vergleich zur Placebo Gruppe ( $6,17 \pm 2,32$  vs.  $1,93 \pm 0,49$ ). Aufgrund der weiten Streuung der Daten konnte hier jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

Die Auswertung der VEGF-Proteinexpression im Western Blot ergab statistisch signifikant höhere Werte in den Cilostazol behandelten Tieren an Tag 1 und 6 nach Leberresektion im Vergleich zur Placebo Gruppe (siehe Abb.14).



**Abbildung 14: Vergleich der VEGF-Expression in Cilostazol-behandelten Tieren und Kontrolltieren.**

Western Blot Analyse der VEGF-Expression an Tag 1 (A) sowie an Tag 6 (B,C) nach 70% Leberresektion. Die Tiere erhielten täglich Cilostazol (schwarze Balken) oder NaCl-Glucose Lösung (weiße Balken). Mittelwert  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$  vs. nicht-behandelte Kontrollen.

## 7 DISKUSSION

Die vorliegende Studie diente der detaillierten Untersuchung der hepatischen Perfusion und Regeneration unter dem Einfluss von Cilostazol, einem Phosphodiesterase-III-Hemmer. Als Modell diente die 70% Leberresektion nach Higgins und Anderson. Ziel der Studie war es darzulegen, in wie weit eine Behandlung mit Cilostazol die hepatische Perfusion sowie die Regeneration nach ausgedehnter Resektion verbessert. Die Experimente wurden an spontanatmenden, anästhesierten und laparotomierten Ratten durchgeführt.

### 7.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 7.1.1 Diskussion des Modells

Die Leberresektion, insbesondere die 70% Leberresektion, ist ein gängiges Verfahren, welches in Tiermodellen angewendet wird, um die Leberregeneration zu untersuchen (Fausto, 2000). Die 70% Hepatektomie nach Higgins und Anderson ist eine seit Jahrzehnten etablierte Technik und weiterhin „State of the Art“ (Higgins, 1931). Die Methode verläuft in der Regel komplikationslos und kann innerhalb von etwa 20 Minuten unter einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt werden. Insbesondere die 70% Leberresektion ist ein etabliertes Verfahren, um den Stimulus der Leberregeneration untersuchen zu können (Court et al., 2004). Bedeutsam ist, dass die Entfernung des zu resezierenden Gewebes nicht mit einer massiven Nekrose am verbliebenen Gewebe einhergeht, denn die multilobuläre Anatomie der Rattenleber erlaubt eine einfache und saubere Resektion des Gewebes. Somit wird die Regeneration gleich zu Beginn nicht durch Vorgänge wie Makrophagen- und Leukozytenmigration infolge von Nekrose oder entzündlichen Prozessen beeinflusst. Die Hepatektomie initiiert unmittelbar die Regeneration ohne Komplikationen durch entzündliche Prozesse. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Resektion in relativ kurzer Zeit durchgeführt werden kann, somit können die Regenerationsprozesse präzise zeitlich eingeordnet werden (Michalopoulos, DeFrances, 1997; Michalopoulos, 2007, 2010). Nachteil des Modells ist jedoch, dass die menschliche Leber einen anderen anatomischen Aufbau als die der Ratte besitzt. Gerade das zuvor erwähnte Fehlen von nekrotischen oder entzündlichen Prozessen durch die Resektion in diesem Modell, sollte bei der Übertragung auf den Menschen berücksichtigt werden (Michalopoulos, 2010).

Ausgedehntere Resektionsmodelle sind zwar möglich, dabei zeigt sich jedoch dass die Mortalitätsrate stark erhöht ist und so eine ausführliche Analyse der Regeneration nur begrenzt möglich ist (Panis et al., 1997).

### 7.1.2 Auswahl und Applikation des Phosphodiesterase-III-Inhibitors

Das in der Studie verwendete Medikament Pletal® beinhaltet den Wirkstoff Cilostazol, 6-[4-(1-Cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)butoxy]-3,4-dihydro-2(1H)-chinolinon.

Cilostazol ist ein selektiver Phosphodiesterase-III-Inhibitor, der vor allem zur symptomatischen Behandlung von arteriellen Durchblutungsstörungen (pAVK) eingesetzt wird. Ausschlaggebend für die Verwendung eines PDE-III-Inhibitors waren die Häufigkeit seiner Verwendung in experimentellen und klinischen Studien, sowie die mögliche Bedeutung in zukünftigen Experimenten aufgrund der speziellen Eigenschaften des Wirkstoffes (Ikegami et al., 2001; Akcan et al., 2006; Kume et al., 2006). In zahlreichen Studien wurden die chemischen und physiologischen Eigenschaften von Cilostazol auf die unterschiedlichsten Organe bereits vorbeschrieben. Weitere Vorteile von Cilostazol sind die bereits vorhandene klinische Zulassung des Wirkstoffs sowie die Möglichkeit einer einfachen oralen Applikation.

Cilostazol besitzt vielfältige Wirkungen auf den Organismus. Cilostazol wirkt beispielsweise antithrombogen. Des Weiteren besitzt es vasodilatative Eigenschaften. Darüber hinaus werden dem Wirkstoff proangiogene und antioxidative Effekte zugesagt. Ferner werden antifibrogene und antisteatogene Wirkungen beschrieben. Cilostazol erhöht den Blutfluss zu den Extremitäten. Ebenso wird der Substanz eine Verbesserung der Serumlipide zugesagt, indem es die Triglyceride senkt und den HDL-Cholesterinspiegel anhebt. Es inhibiert das Wachstum von glatten Muskelzellen (SMC). Seine antithrombotische Wirkung entfaltet es über die Hemmung der Phosphodiesterase. Folglich wird der Abbau von cyclischem Adenosinmonophosphat verhindert (cAMP), das wiederum Thromboxan A<sub>2</sub> inaktiviert. Seinen vasodilatatorischen Effekt erreicht es über einen Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO). Ein weiterer Vorteil von Cilostazol, gerade im Hinblick auf die Untersuchung der Leberregeneration ist, dass es zum größten Teil über die Niere metabolisiert wird und somit zu keiner Beeinträchtigung der Leberfunktion führt (Schorr, 2002; Weintraub, 2006).

Cilostazol inhibiert zudem sowohl die primäre als auch die sekundäre Thrombozytenaggregation (Kimura et al., 1985; Ikeda et al., 1987). Die thrombozytenaggregationshemmenden Eigenschaften besitzt Cilostazol aufgrund der Fähigkeit den intrazellulären cAMP Spiegel anzuheben (Okuda et al., 1992). Trotz dieser

Eigenschaften konnte nachgewiesen werden, dass Cilostazol weder die Blutungszeit verlängert noch das Risiko einer spontanen Blutung anhebt (Elam et al., 1998; Tamai et al., 1999).

Joe et al. konnten in ihrer Studie an Mäusen nachweisen, dass Cilostazol den Ischämie-Reperfusionsschaden an der Leber senken kann (Joe et al., 2015). In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibierung der PDE-3 eine Verringerung der endothelialen Entzündungsprozesse bewirkt und somit den Ischämie-Reperfusionsschaden an der Leber reduziert (von Heesen et al., 2015). Cilostazol senkt weiter den cholestatischen Leberschaden bei Verschluss des Ductus choledochus durch signifikante Reduktion des portalen Druckes sowie die entzündlichen und fibrotischen Prozesse in der Leber (Abdel Kawy, 2015). Shimizu et al. konnte ebenfalls antifibrotische Eigenschaften durch die Verabreichung von Cilostazol nachweisen (Shimizu et al., 1999). Ferner konnte durch Präkonditionierung mit Milrinon, ebenfalls einem Phosphodiesterase-III-Hemmer, gezeigt werden, dass die Mikrozirkulation verbessert und der hepatozelluläre Schaden reduziert werden konnte (Ikegami et al., 2001; Kume et al., 2006).

Aufgrund der bis dato vorliegenden Studienergebnisse sollte nun im vorliegenden Modell durch die Verabreichung von Cilostazol der „arterial buffer response“ entgegengewirkt werden und so der hepato-arterielle Blutfluss nach Resektion gesteigert werden. Zudem sollte durch Cilostazol die Regenerationsrate der Leber und der hepatozelluläre Schaden nach ausgedehnter Resektion verringert werden.

Die verabreichte Dosis war 5mg/kg/KG. Diese wurde jeweils morgens und abends per os gegeben, um den Plasmaspiegel bei einer Halbwertszeit von 10h annähernd konstant zu halten. Die Dosierung wurde gewählt um einen ausreichenden Wirkspiegel bei der Ratte zu erzielen (Schorr, 2002).

### 7.1.3 Untersuchungsmethoden

#### 7.1.3.1 Makrohämodynamikanalyse mittels Ultraschall-Fluss-Messung

Mittels perivaskulären Ultraschallflussmesssonden kann eine exakte Echtzeitmessung des Blutflusses der Arteria hepatica und der Vena portae durchgeführt werden. Prinzip dieser Methode ist die Ermittlung der Dopplerverschiebung des Streulichts der bewegten Teilchen, hier der Blutbestandteile, welche mit Laserlicht beleuchtet werden. Das Resultat wird in ml/min pro Gramm Lebergewicht ermittelt. Vorteil dieser Methodik ist die einfache

Handhabung und die beliebige Reproduzierbarkeit der Messung. Artefakte können durch Bewegung oder nicht korrekten Kontakt zum messenden Blutgefäß entstehen. Eine Ruptur des Gefäßes durch Anlegen der Messsonde ist bei korrekter Handhabung nahezu ausgeschlossen.

#### 7.1.3.2 Perfusionsanalyse des Leberparenchyms mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF)

Mit der Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) kann sowohl eine invasive als auch eine nicht-invasive Flussmessung eines Gewebes durchgeführt werden. In dieser Studie wird die nicht-invasive Methode verwendet. Bei der LDF wird monochromatisches Laserlicht auf das Lebergewebe abgegeben. Das Prinzip basiert auf der Ermittlung der Dopplerverschiebung des Streulichtes eines bewegten Objektes, welches mit Laserlicht beleuchtet wird, in diesem Fall der Erythrozyten. Das Resultat kann in ein akustisches oder visuelles Signal umgewandelt werden, um die Änderung der Mikrozirkulation darzustellen. In der vorliegenden Studie wurde zur Darstellung der Mikrozirkulation die relative Einheit aU (arbitrary Unit) verwendet. Vorteil der LDF ist die beliebige Wiederholbarkeit der Messung, ohne dass das zu untersuchende Gewebe Schaden nimmt. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass es durch Bewegung, beispielsweise durch Atemverschiebungen des Gewebes, zu Artefakten in der Messung kommen kann. Ein weiterer Nachteil ist die Limitierung der Eindringtiefe des Lasers in das Gewebe. Sie beträgt in etwa 2mm. So können ausschließlich die oberflächlich verlaufenden Gefäße zur Messung der Mikrozirkulation herangezogen werden.

#### 7.1.3.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur ersten Einschätzung des Leberschadens nach 70% Hepatektomie wurden aus dem nach Versuchsende asservierten Restlebergewebe HE-Schnitte hergestellt und histologisch untersucht. In dieser Färbung wird in semiquantitativer Auswertung die zytoplasmatische Vakuolisierung der Hepatozyten untersucht. Die Vakuolisierung ist ein Indikator der hepatozellulären Integrität und somit kein Apoptosenachweis, sondern ein Zeichen von Zellstress (Kollmar et al., 2007; von Heesen et al., 2011).

In der Literatur finden sich lange Diskussionen über den besten Nachweis der hepatozellulären Apoptose. So gibt es beispielsweise biochemische Verfahren zum Nachweis wichtiger Enzyme der Apoptose (Caspasen) oder zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Assays) (Kohli et al., 1999). Die einfache, rein morphologische Beurteilung am HE-gefärbten Lebergewebe stellt jedoch weiterhin den Goldstandard dar. Dieses Verfahren kann

dann durchaus durch weitere biochemische Verfahren untermauert werden (Gujral et al., 2001).

#### 7.1.3.4 Proliferating Cell Nuclear Antigen und Caspase-3

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Färbungen mit Antikörpern gegen Caspase-3 und PCNA angefertigt. Die Auswertung dieser Schnitte erfolgte ebenfalls semiquantitativ. PCNA ist ein Protein, welches während der DNA Replikation die DNA als Ring umgibt, es wird deshalb auch als Ringklemmenprotein bezeichnet (Paunesku et al., 2001). PCNA wird von Zellen in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus exprimiert. Da das Protein jedoch in der G0-Phase der Zelle nicht produziert wird, kann somit die Proliferation einer Zellpopulation gemessen werden (Kurki et al., 1986). Der Peak der PCNA-Expression findet in der späten G1-Phase sowie in der S-Phase statt (Scholzen, Gerdes, 2000). Als alleiniger Nachweis der Zellproliferation ist PCNA jedoch nicht geeignet. Dennoch ist es eine gute Methodik, um diese zu quantifizieren (Assy, Minuk, 1997).

Caspasen sind Cysteinproteasen, welche Peptidbindungen schneiden. Caspase-3 ist ein Marker für den apoptotischen Zelltod. In der Literatur finden sich zahlreiche Kontroversen über die Methodik für den Nachweis von Apoptosen. Einige Autoren bezeichnen die immunhistochemische Färbung mittels Caspase-3 sogar als die Methode der Wahl zum Nachweis von Apoptose (Kohli et al., 1999; Shalini et al., 2015). Dahingegen beschreibt beispielsweise Gujral et al. eine rein morphologische Betrachtung des Zellkerns als Methode der Wahl zur Festlegung von apoptotischen Vorgängen (Gujral et al., 2001). So kann die alleinige Methode des TUNEL-Assays zur Detektion von apoptotischen Zellvorgängen nicht verwendet werden, da nekrotische Zellen ebenfalls TUNEL-positiv sind. Deshalb muss zusätzlich die Morphologie der Zelle mit in Betracht gezogen werden (Gujral et al., 2001). Des Weiteren konnte Gujral et al. in einem Reperfuisionsmodell der Leber nach kalter oder warmer Ischämie zeigen, dass die Aktivität der Caspasen-Enzyme und hier insbesondere Caspase-3 nicht signifikant erhöht ist (Gujral et al., 2001).

Für sämtliche semiquantitative Auswertungen der histologischen Präparate wurde folgender Score verwendet: Grad 0, 0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf; Grad 1 <10% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf; Grad 2 10% - 25% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf; Grad 3 25% - 50% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf; Grad 4 >50% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf (Kollmar et al., 2007). Vorteil dieses Scores ist die einfache Anwendung und die häufige Verwendung in der Literatur.

### 7.1.3.5 Western Blot

Zum Nachweis von VEGF und TGF- $\beta$  wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierbei wurde die VEGF und TGF- $\beta$  Genexpression untersucht. Lee et al. konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Behandlung mit Cilostazol eine durch Diabetes mellitus Typ I hervorgerufene Nephropathie in ihrem klinischen Verlauf abmildern kann, indem es den oxidativen Stress reduziert. Der Pathomechanismus lässt sich durch die Inhibition der TGF- $\beta$  Expression durch Cilostazol erklären (Lee et al., 2010). Da TGF- $\beta$  die frühe Proliferationsphase nach Hepatektomie reduziert, kann angenommen werden, dass Cilostazol durch die Inhibition der TGF- $\beta$  Expression die Regenerationsrate verbessert (Russell et al., 1988). Bedauerlicherweise konnte dies in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Eine Inhibition von der TGF- $\beta$  Produktion konnte in den Cilostazol behandelten Tieren nicht festgestellt werden.

Allerdings konnte durch die Western Blot Analyse zum ersten Mal eine vermehrte VEGF Produktion durch Cilostazol nachgewiesen werden. Cilostazol steigert die Phosphorylierung der Proteinkinase 2 (CK 2) (Kim et al., 2004). Feng et al. zeigte in einer Studie, dass CK 2 ein Regulator der Angiogenese ist (Feng et al., 2012).

## 7.2 Diskussion der Ergebnisse

### 7.2.1 Makro- und Mikroperfusion der Leber

#### 7.2.1.1 Portalvenöser Blutfluss

In zahlreichen Studien bezüglich der Leberresektion und Lebertransplantation wurde ein Anstieg des portalvenösen Blutflusses nach Resektion oder Transplantation beschrieben (Man et al., 2001; Man et al., 2003; Eipel et al., 2005; Fondevila et al., 2010). Auch in der vorliegenden Studie fand sich sowohl direkt nach Resektion als auch nach 24h eine deutliche portalvenöse Hyperperfusion sowohl in der behandelten als auch in der nicht-behandelten-Gruppe. Es konnte nun gezeigt werden, dass auch in den nicht resezierten Tieren nach einer 5-tägigen Behandlung mit Cilostazol ein signifikanter Anstieg des portalvenösen Blutflusses zu verzeichnen ist. Halverscheid et al. konnten durch Hemmung der Phosphodiesterase-V ebenfalls einen Anstieg der portalvenösen Blutzufuhr verzeichnen (Halverscheid et al., 2009). Hierbei ist anzunehmen, dass Cilostazol durch die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) die Stickstoffmonoxid-Produktion über cAMP-, Proteinkinase A- sowie PI3K/Akt-

abhängige Mechanismen anregt. Dies bewirkt über das Endothel eine Vasodilatation (Hashimoto et al., 2006). Zudem führt es zu einer Steigerung des Herzzeitvolumens sowie der viszeralen Perfusion.

#### 7.2.1.2 Hepato-arterieller Blutfluss

Die Auswertung des hepatischen arteriellen Blutflusses zeigte, wie schon beim venösen Blutfluss, einen signifikanten Anstieg bei den nicht resezierten Tieren nach Präkonditionierung mit Cilostazol. Dies ist ebenso mit einer erhöhten NO-Synthese durch Cilostazol zu erklären. Die 70% Leberresektion führte im Vergleich zu den nicht resezierten Tieren zwar zu einem Abfall des arteriellen Zuflusses, dennoch zeigte sich der arterielle Blutfluss in den Cilostazol behandelten Tieren im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren höher. Eine statistische Signifikanz konnte hier an Tag 6 des Beobachtungszeitraums erreicht werden. Durch den oben beschriebenen Anstieg des portalvenösen Blutflusses wäre eigentlich im Sinne der HABR ein Abfall des arteriellen Blutflusses zu erwarten gewesen. Dies spielt besonders nach ausgedehnten Resektionen oder „small-for-size“ Transplantationen eine wesentliche Rolle („small-for-size“-Syndrom). Der erhöhte portalvenöse Blutfluss führt zu einer kritischen Reduktion der arteriellen Perfusion. Dieser kompensatorische Mechanismus basiert auf dem „Washout“ von Adenosin im Mall-Raum (Lautt, 1985). Es konnte gezeigt werden, dass die HABR sowohl nach Transplantation eines ganzen Organs als auch unmittelbar nach Reperfusion von Leberteiltransplantationen intakt ist (Henderson et al., 1992; Marcos et al., 2000). Insbesondere der Abfall der arteriellen Blutzufuhr nach ausgedehnter Hepatektomie oder „small-for-size“ Transplantation kann zu einem akuten Leberversagen führen. Weiter konnte Kelly et al. zeigen, dass insbesondere das „small-for-size“-Syndrom mit einer abnormen HABR verbunden ist. Ferner zeigte sich in derselben Studie, dass trotz des Rückgangs des portalvenösen Blutflusses auf Normwerte, die Vasokonstriktion der Arteria hepatica weiter anhielt (Kelly et al., 2009).

In der nun vorliegenden Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass die selektive Inhibition der Phosphodiesterase-III durch Cilostazol sowohl den portalvenösen als auch den arteriellen Blutfluss zur Leber ohne Resektion erhöht. Auch nach erfolgter 70% Hepatektomie konnte durch Cilostazol ein erhöhter arterieller Blutfluss zum Restlebergewebe beobachtet werden trotz des gleichzeitig erhöhten portalvenösen Zuflusses.

Cantre et al. konnten in einer Studie, in der Ratten einer 85% Hepatektomie unterzogen wurden, zeigen, dass durch Gabe von Molsidomin, einem Stickstoffmonoxid-Donator, dem Absinken des arteriellen hepatischen Zuflusses entgegengewirkt werden kann (Cantre et al.,

2008). Sowohl die Steigerung des portalvenösen als auch des arteriellen Zuflusses in der hier vorliegenden Studie kann durch die vermehrte Expression der Angiogenese-exprimierenden Gene erklärt werden, allen voran die des eNOS kodierenden Gens (Hashimoto et al., 2006; Fujita et al., 2008). Die Erhöhung des hepatischen Blutflusses nach Resektion durch Cilostazol erklärt sich ferner durch die Tatsache, dass Cilostazol die Wiederaufnahme von Adenosin blockiert und dadurch dessen interstitielle Konzentration steigert (Liu et al., 2000). Die Erhöhung der Adenosin-Konzentration könnte somit die vasodilatatorische Kapazität der Arteria hepatica erhalten und so dem „Washout“ von Adenosin im Mall-Raum durch die portale Hyperperfusion entgegenwirken (Lautt, 2007).

### 7.2.1.3 Hepatische mikrovaskuläre Perfusion

Im vorliegenden Experiment zeigte sich die Mikroperfusion durch die Cilostazol-Behandlung in den nicht resezierten Tieren ebenfalls erhöht. Gleichmaßen ergab die Behandlung eine Erhöhung der Mikroperfusion nach Resektion im Vergleich zur Kontrolle. Beide Phänomene lassen sich durch den gesteigerten hepatischen Gesamtblutfluss erklären.

In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass die postoperative Rekonvaleszenz nach ausgedehnter Leberresektion nicht allein eine Frage der Größe des verbliebenen Restlebergewebes ist, sondern die Mikrozirkulation ebenfalls eine wichtige Rolle spielt (Eguchi et al., 2003; Garcia-Valdecasas et al., 2003; Troisi et al., 2003; Glanemann et al., 2005). Es zeigte sich beispielsweise bei Leberlebenstransplantationen, dass der erhöhte portalvenöse Blutfluss und die damit einhergehende Steigerung der Mikrozirkulation einen positiven Effekt auf die hepatozelluläre Regeneration hat (Eguchi et al., 2003; Garcia-Valdecasas et al., 2003). Allerdings wurde in einigen Studien nachgewiesen, dass gerade eine gesteigerte hepatische Mikroperfusion, insbesondere durch einen gesteigerten portalvenösen Blutfluss zu einer Schädigung des verbliebenen Restlebergewebes führt. Ähnliche Beobachtungen konnten auch im Falle einer „small-for-size“ Transplantation beobachtet werden (Ku et al., 1995). Der genaue Mechanismus, welcher zu einer Schädigung des Lebergewebes bei einer „small-for-size“ Transplantation führt, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Lebersinusoiden spielen jedoch eine Schlüsselrolle im Funktionserhalt des Restlebergewebes oder Spenderorgans. Der erhöhte portalvenöse Blutfluss kann zu erhöhtem Scherstress und somit zur Zerstörung der Lebersinusoiden führen. Gleichmaßen kann die reduzierte arterielle Perfusion zu einer Hypoxie führen, was zu einer Schädigung der Lebersinusoiden führt (Schmucker, Curtis, 1974; Rodriguez et al., 1991; Vollmar et al., 1994; Fujiwara et al., 1995).

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Cilostazol und die dadurch hervorgerufene Vasodilatation eine deutliche Reduktion des Scherstress erreicht wird. Das „small-for-size“-Syndrom konnte folglich in der Behandlungsgruppe nicht beobachtet werden. Dies wurde auch durch andere Studien belegt. Halverscheid et al. haben nachgewiesen, dass es durch die Behandlung mit einem PDE-5 Hemmer zu einer Senkung des portalvenösen und arteriellen Widerstands kommt, wodurch ein Anstieg des portalvenösen, arteriellen und parenchymalen Blutfluss zu verzeichnen war (Halverscheid et al., 2009).

### 7.2.2 Hepatische Zellintegrität und apoptotischer Zelltod

In der vorliegenden Studie zeigte die Gabe von Cilostazol in den nicht resezierten Tieren keinen Unterschied hinsichtlich der Zellintegrität im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe konnte nach 70% Resektion ein signifikanter Anstieg der hepatozellulären Vakuolisierung beobachtet werden. Die erhöhte zytoplasmatische Vakuolisierung kann als Zeichen der zellulären Desintegrität gewertet werden. Cilostazol konnte einen initialen Anstieg der Vakuolisierung ebenfalls nicht verhindern. Jedoch konnte im untersuchten Beobachtungszeitraum an Tag 3 und Tag 6 eine Reduzierung der Desintegrität in der Cilostazol-behandelten Gruppe gezeigt werden. Ogawa et al. zeigten in einem Zellkulturmodell, dass durch eine Hypoxie die Permeabilität der Endothelzellen aus der Aorta und Arteria pulmonalis des Rindes gegenüber Albumin und niedermolekularen Stoffen deutlich ansteigt. Diese erhöhte Permeabilität ist mit einem Abfall des intrazellulären cAMP-Spiegels assoziiert (Ogawa et al., 1992). Demnach kann angenommen werden, dass sich durch die Hypoxie-bedingte erhöhte Permeabilität, die Zellintegrität der Hepatozyten verschlechtert und es folglich zu einer vermehrten Vakuolisierung der Leberzellen kommt (Gao et al., 1991). Durch PDE-3-Inhibitoren wie beispielsweise Cilostazol kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären cAMPs sowohl in Endothelzellen (Sunagawa et al., 2006) als auch in Hepatozyten (Ikegami et al., 2001). Der intrazelluläre Anstieg von cAMP in den Cilostazol-behandelten Tieren könnte somit eine wesentliche Rolle in der Protektion der Endothelzellen, aber auch in der Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation und der Erhaltung der hepatozellulären Integrität spielen.

### 7.2.3 Transforming Growth Factor- $\beta$ und Vascular Endothelial Growth Factor

Das Zytokin TGF- $\beta$  ist ein Signalmolekül, welches ursprünglich in Zellkulturmedien entdeckt wurde. TGF- $\beta$  hat die Fähigkeit Prozesse wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu

beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  in Zellkulturen ein potenter Wachstumsinhibitor von Epithelzellen, aber auch Hepatozyten ist (Russell et al., 1988). In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass TGF- $\beta$  die DNA-Synthese, welche beispielsweise durch Epidermal Growth Factor oder andere Wachstumsfaktoren stimuliert wurde, in Rattenzellkulturen signifikant inhibieren kann (Carr et al., 1986; McMahon et al., 1986; Russell, 1988). Strain et al. konnten dieses Phänomen ebenfalls in humanen fötalen Hepatozyten nachweisen (Strain et al., 1986). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass in vivo in der Leber ein hoher Metabolismus von TGF- $\beta$  stattfindet (Coffey et al., 1987). Russell et al. zeigten, dass intravenös verabreichtes TGF- $\beta$  in einem Leberresektionsmodell der Ratte in Abhängigkeit von der injizierten Dosis die frühe Proliferationsphase der Hepatozyten inhibiert. Die Proliferationsrate wurde dadurch gesenkt, indem weniger Hepatozyten im verbleibenden Restlebergewebe in die S-Phase übergangen. Weiter konnte jedoch gezeigt werden, dass auch nach intermittierender Gabe von TGF- $\beta$ , der Effekt nach etwa acht Tagen aufgehoben war und das Restlebergewicht dem der Kontrollgruppe entsprach (Russell et al., 1988). Da Cilostazol inhibitorisch auf die TGF- $\beta$  Expression wirkt, kann nun spekuliert werden, dass über diesen Mechanismus wiederum die gesteigerte Leberregeneration zu erklären ist. Allerdings konnte in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied in der Analyse bezüglich der TGF- $\beta$  Genexpression zwischen den Cilostazol behandelten Tieren und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Eine Hemmung der TGF- $\beta$  Expression durch Cilostazol konnte somit nicht gezeigt werden (Lee et al., 2010).

VEGF spielt eine wichtige Rolle in der Regeneration der Leber. So ist beispielsweise die Angiogenese ein wichtiger Prozess während der Leberregeneration. VEGF stellt unter anderem einen Hauptregulator der physiologischen wie auch pathologischen Angiogenese dar (Yoshida et al., 2011). In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass Cilostazol die Expression von VEGF nach erfolgter Hepatektomie steigert. Yoshida et al. zeigten in ihrer Studie, dass die Expression von VEGF in der sich regenerierenden Leber die Stimulation der Lebersinusoidzellen fördert. Diese sind wiederum für die Rekonstruktion der Sinusoide nach erfolgter Hepatektomie zuständig (Yoshida et al., 2011). Zahlreiche weitere Studien konnten nachweisen, dass Cilostazol die Angiogenese in vivo induziert. Weiter konnte gezeigt werden, dass dieses Phänomen in Abhängigkeit von VEGF steht (Chao et al., 2012; Biscetti et al., 2013). Folglich kann die gesteigerte Leberregeneration durch eine erhöhte VEGF-Expression durch die Cilostazol-Behandlung durchaus erklärt werden.

### 7.3 Schlussfolgerung

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Cilostazol eine Steigerung des hepatischen Blutflusses hervorruft und die Leberregeneration nach 70% Hepatektomie fördert. Dieser Prozess kann mit der verbesserten hepatischen Mikrozirkulation, der Protektion der mikrovaskulären Strukturen und des Parenchyms sowie durch die in Abhängigkeit von VEGF gesteigerten Angiogenese erklärt werden.

Die vorliegende Arbeit konnte nachweisen, dass der PDE-III Inhibitor Cilostazol zukünftig in der Leberchirurgie eine wichtige Rolle in der Verbesserung des postoperativen Outcomes nach ausgeprägter Leberresektion oder „small-for-size“ Lebertransplantation spielen könnte. Cilostazol kann demzufolge dazu beitragen, die Rate postoperativen Leberversagens zu senken.

Es stellt sich nun die Frage der Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen. Ein Vorteil des in der Studie verwendeten Medikamentes, ist die bereits klinische Zulassung des PDE-III-Inhibitors Cilostazol.

Zunächst sollte jedoch die Frage gestellt werden, wann eine Leberresektion beim Menschen durchgeführt wird. Die Indikation kann beispielsweise bei einer Leber-Lebendspende gestellt werden. Der Spender ist in diesem Falle „gesund“. Dies bedeutet, es besteht keine maligne oder infektiöse Grunderkrankung wie etwa eine Hepatitis. Die häufigsten Fälle in denen jedoch die Indikation zur Resektion in der Leberchirurgie gestellt wird, ist der erkrankte Patient. Primäre Lebertumore wie das Hepatozelluläre Karzinom oder das Cholangiozelluläre Karzinom stellen häufige Grunderkrankungen dar, seltener gutartige Tumore wie beispielsweise Leberzysten. Der Großteil der Tumore, die in der Leberchirurgie behandelt werden, sind Absiedlungen anderer Tumoren, allen voran Metastasen von Colon- oder Rektumkarzinomen. In der vorliegenden Studie konnte ausführlich die proliferationsfördernde Komponente von Cilostazol dargestellt werden. Zwangsweise stellt sich nun die Frage, wie sich die Behandlung mit Cilostazol auf das Tumorwachstum auswirkt. Ikeda et al. konnte in einem Leberresektionsmodell mit Ratten nachweisen, dass Cilostazol einen antiproliferativen Effekt auf Lebermetastasen besitzt und somit sicher während der Leberregeneration nach einer Hepatektomie eingesetzt werden kann (Ikeda et al., 1998). Das mittlere Überleben zeigte sich sogar in der Cilostazol behandelten Gruppe erhöht. Ferner konnte Strowitzki et al. ebenfalls nachweisen, dass Cilostazol das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen im Restlebergewebe nach ausgedehnter Resektion nicht stimuliert (Strowitzki et al., 2014). Cilostazol scheint somit anwendbar. Zur sicheren klinischen Anwendung beim Menschen bedarf dies jedoch noch weiterer klinischer Studien.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdel Kawy HS (2015) Cilostazol attenuates cholestatic liver injury and its complications in common bile duct ligated rats. *Eur J Pharmacol* 752:8-17
2. Adam R, Bismuth H, Castaing D, Waechter F, Navarro F, Abascal A, Majno P, Engerran L (1997) Repeat hepatectomy for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 225:51-60; discussion 60-52
3. Adam R, de Gramont A, Figueras J, Kokudo N, Kunstlinger F, Loyer E, Poston G, Rougier P, Rubbia-Brandt L, Sobrero A, Teh C, Tejpar S, Van Cutsem E, Vauthey JN, Pahlman L, of the Eg (2015) Managing synchronous liver metastases from colorectal cancer: A multidisciplinary international consensus. *Cancer Treat Rev*
4. Akcan A, Kucuk C, Ok E, Canoz O, Muhtaroglu S, Yilmaz N, Yilmaz Z (2006) The effect of amrinone on liver regeneration in experimental hepatic resection model. *J Surg Res* 130:66-72
5. Alexander B, Blumgart LH, Mathie RT (1989) The effect of propranolol on the hyperaemic response of the hepatic artery to portal venous occlusion in the dog. *Br J Pharmacol* 96:356-362
6. Alison MR (1986) Regulation of hepatic growth. *Physiol Rev* 66:499-541
7. Aller MA, Arias N, Prieto I, Agudo S, Gilsanz C, Lorente L, Arias JL, Arias J (2012) A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J Hepatol* 4:199-208
8. Assy N, Minuk GY (1997) Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J Hepatol* 26:945-952
9. Azoulay D, Castaing D, Smail A, Adam R, Cailliez V, Laurent A, Lemoine A, Bismuth H (2000) Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg* 231:480-486
10. Balzan SM, Gava VG, Rieger A, Pra D, Trombini L, Zenkner FF, Horta JA, Azambuja G, Schopf L, de Souza PL (2014) Ischemic versus pharmacologic hepatic preconditioning. *J Surg Res* 191:134-139
11. Bechstein WO, Golling M (2005) [Standard surgical resection of colorectal liver metastases]. *Chirurg* 76:543-551
12. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O (1999) Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg* 229:369-375
13. Biscetti F, Pecorini G, Straface G, Arena V, Stigliano E, Rutella S, Locatelli F, Angelini F, Ghirlanda G, Flex A (2013) Cilostazol promotes angiogenesis after peripheral ischemia through a VEGF-dependent mechanism. *Int J Cardiol* 167:910-916
14. Bredfeldt JE, Riley EM, Groszmann RJ (1985) Compensatory mechanisms in response to an elevated hepatic oxygen consumption in chronically ethanol-fed rats. *Am J Physiol* 248:G507-511
15. Broering DC, Hillert C, Krupski G, Fischer L, Mueller L, Achilles EG, Schulte am Esch J, Rogiers X (2002) Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg* 6:905-913; discussion 913
16. Browse DJ, Mathie RT, Benjamin IS, Alexander B (2003) The role of ATP and adenosine in the control of hepatic blood flow in the rabbit liver in vivo. *Comp Hepatol* 2:9

17. Bustos M, Beraza N, Lasarte JJ, Baixeras E, Alzuguren P, Bordet T, Prieto J (2003) Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* 125:192-201
18. Cantre D, Schuett H, Hildebrandt A, Dold S, Menger MD, Vollmar B, Eipel C (2008) Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. *Br J Surg* 95:785-792
19. Carr BI, Hayashi I, Branum EL, Moses HL (1986) Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet-derived type beta transforming growth factor. *Cancer Res* 46:2330-2334
20. Cave A, Garlick P (2000) Re: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 32:1759-1760
21. Chao TH, Tseng SY, Li YH, Liu PY, Cho CL, Shi GY, Wu HL, Chen JH (2012) A novel vasculo-angiogenic effect of cilostazol mediated by cross-talk between multiple signalling pathways including the ERK/p38 MAPK signalling transduction cascade. *Clin Sci (Lond)* 123:147-159
22. Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R (2007) Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med* 356:1545-1559
23. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W (2003) A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 238:843-850; discussion 851-842
24. Coffey RJ, Jr., Kost LJ, Lyons RM, Moses HL, LaRusso NF (1987) Hepatic processing of transforming growth factor beta in the rat. Uptake, metabolism, and biliary excretion. *J Clin Invest* 80:750-757
25. Court FG, Laws PE, Morrison CP, Teague BD, Metcalfe MS, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ (2004) Subtotal hepatectomy: a porcine model for the study of liver regeneration. *J Surg Res* 116:181-186
26. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274:1379-1383
27. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger AP (1999) A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* 13:253-261
28. Dawson DL, Cutler BS, Meissner MH, Strandness DE, Jr. (1998) Cilostazol has beneficial effects in treatment of intermittent claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Circulation* 98:678-686
29. Demetris AJ, Kelly DM, Egtesad B, Fontes P, Wallis Marsh J, Tom K, Tan HP, Shaw-Stiffel T, Boig L, Novelli P, Planinsic R, Fung JJ, Marcos A (2006) Pathophysiologic observations and histopathologic recognition of the portal hyperperfusion or small-for-size syndrome. *Am J Surg Pathol* 30:986-993
30. Denk H, Dienes, H.P. et. al. (2000) *Pathologie der Leber und Gallewege*, Vol Band 10, 2. Auflage).
31. Eguchi S, Yanaga K, Sugiyama N, Okudaira S, Furui J, Kanematsu T (2003) Relationship between portal venous flow and liver regeneration in patients after living donor right-lobe liver transplantation. *Liver Transpl* 9:547-551
32. Eipel C, Abshagen K, Vollmar B (2012) [Small-for-size: experimental findings for liver surgery]. *Chirurg* 83:238-246
33. Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P, Vollmar B (2005) Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. *Ann Surg* 241:477-484
34. Elam MB, Heckman J, Crouse JR, Hunninghake DB, Herd JA, Davidson M, Gordon IL, Bortey EB, Forbes WP (1998) Effect of the novel antiplatelet agent cilostazol on

- plasma lipoproteins in patients with intermittent claudication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:1942-1947
35. Fausto N (2000) Liver regeneration. *J Hepatol* 32:19-31
  36. Feng D, Welker S, Korbel C, Rudzitis-Auth J, Menger MD, Montenarh M, Laschke MW (2012) Protein kinase CK2 is a regulator of angiogenesis in endometriotic lesions. *Angiogenesis* 15:243-252
  37. Fondevila C, Hessheimer AJ, Taura P, Sanchez O, Calatayud D, de Riva N, Munoz J, Fuster J, Rimola A, Garcia-Valdecasas JC (2010) Portal hyperperfusion: mechanism of injury and stimulus for regeneration in porcine small-for-size transplantation. *Liver Transpl* 16:364-374
  38. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH (1999) Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 230:309-318; discussion 318-321
  39. Forner A, Reig ME, de Lope CR, Bruix J (2010) Current strategy for staging and treatment: the BCLC update and future prospects. *Semin Liver Dis* 30:61-74
  40. Fujita K, Nozaki Y, Wada K, Yoneda M, Endo H, Takahashi H, Iwasaki T, Inamori M, Abe Y, Kobayashi N, Kirikoshi H, Kubota K, Saito S, Nagashima Y, Nakajima A (2008) Effectiveness of antiplatelet drugs against experimental non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 57:1583-1591
  41. Fujiwara K, Mochida S, Ohno A, Arai M (1995) Possible cause of primary graft non-function after orthotopic liver transplantation: a hypothesis with rat models. *J Gastroenterol Hepatol* 10 Suppl 1:S88-91
  42. Gao WS, Hijioka T, Lindert KA, Caldwell-Kenkel JC, Lemasters JJ, Thurman RG (1991) Evidence that adenosine is a key component in Carolina rinse responsible for reducing graft failure after orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 52:992-998
  43. Garcea G, Maddern GJ (2009) Liver failure after major hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 16:145-155
  44. Garcia-Valdecasas JC, Fuster J, Charco R, Bombuy E, Fondevila C, Ferrer J, Ayuso C, Taura P (2003) Changes in portal vein flow after adult living-donor liver transplantation: does it influence postoperative liver function? *Liver Transpl* 9:564-569
  45. Glanemann M, Eipel C, Nussler AK, Vollmar B, Neuhaus P (2005) Hyperperfusion syndrome in small-for-size livers. *Eur Surg Res* 37:335-341
  46. Gomez D, Malik HZ, Bonney GK, Wong V, Toogood GJ, Lodge JP, Prasad KR (2007) Steatosis predicts postoperative morbidity following hepatic resection for colorectal metastasis. *Br J Surg* 94:1395-1402
  47. Gotoh F, Tohgi H, Hirai S, Terashi A, Fukuuchi Y, Otomo E, Shinohara Y, Itoh E, Matsuda T, Sawada T, Yamaguchi T, Nishimaru K, Ohashi Y (2000) Cilostazol stroke prevention study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 9:147-157
  48. Granger DN, Senchenkova E (2010). In *Inflammation and the Microcirculation* (San Rafael (CA)).
  49. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H (2001) Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 33:397-405
  50. Halverscheid L, Deibert P, Schmidt R, Blum HE, Dunkern T, Pannen BH, Kreisel W (2009) Phosphodiesterase-5 inhibitors have distinct effects on the hemodynamics of the liver. *BMC Gastroenterol* 9:69
  51. Hammond JS, Guha IN, Beckingham IJ, Lobo DN (2011) Prediction, prevention and management of postresection liver failure. *Br J Surg* 98:1188-1200

52. Harada H, Imamura H, Miyagawa S, Kawasaki S (1997) Fate of the human liver after hemihepatic portal vein embolization: cell kinetic and morphometric study. *Hepatology* 26:1162-1170
53. Hashimoto A, Miyakoda G, Hirose Y, Mori T (2006) Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 189:350-357
54. Helmberger T (2010) [Interventional procedures for hepatic metastases]. *Chirurg* 81:542-550
55. Henderson JM, Gilmore GT, Mackay GJ, Galloway JR, Dodson TF, Kutner MH (1992) Hemodynamics during liver transplantation: the interactions between cardiac output and portal venous and hepatic arterial flows. *Hepatology* 16:715-718
56. Higgins GM, Anderson, R. M. (1931) Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol*:186
57. Hoetzel A, Welle A, Schmidt R, Loop T, Humar M, Ryter SW, Geiger KK, Choi AM, Pannen BH (2008) Nitric oxide-deficiency regulates hepatic heme oxygenase-1. *Nitric Oxide* 18:61-69
58. Ikeda Y, Kikuchi M, Murakami H, Satoh K, Murata M, Watanabe K, Ando Y (1987) Comparison of the inhibitory effects of cilostazol, acetylsalicylic acid and ticlopidine on platelet functions ex vivo. Randomized, double-blind cross-over study. *Arzneimittelforschung* 37:563-566
59. Ikeda Y, Matsumata T, Takenaka K, Yamagata M, Sugimachi K (1998) Effects of doxorubicin and/or cilostazol on cancer cells during liver regeneration after two-thirds hepatectomy in rats. *Oncology* 55:354-356
60. Ikegami T, Nishizaki T, Hiroshige S, Ohta R, Yanaga K, Sugimachi K (2001) Experimental study of a type 3 phosphodiesterase inhibitor on liver graft function. *Br J Surg* 88:59-64
61. Joe Y, Zheng M, Kim HJ, Uddin MJ, Kim SK, Chen Y, Park J, Cho GJ, Ryter SW, Chung HT (2015) Cilostazol attenuates murine hepatic ischemia and reperfusion injury via heme oxygenase-dependent activation of mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 309:G21-29
62. Kandil E, Saeed A, Buell J (2015) Surgical approaches for liver metastases in carcinoid tumors. *Gland Surg* 4:442-446
63. Kelly DM, Zhu X, Shiba H, Irefin S, Trenti L, Cocieru A, Diago T, Wang LF, Quintini C, Chen Z, Alster J, Nakagawa S, Miller C, Demetris A, Fung JJ (2009) Adenosine restores the hepatic artery buffer response and improves survival in a porcine model of small-for-size syndrome. *Liver Transpl* 15:1448-1457
64. Kim KY, Shin HK, Lee JH, Kim CD, Lee WS, Rhim BY, Shin YW, Hong KW (2004) Cilostazol enhances casein kinase 2 phosphorylation and suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced increased phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation and apoptotic cell death in SK-N-SH cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:97-104
65. Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K (1985) Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung* 35:1144-1149
66. Kohda N, Tani T, Nakayama S, Adachi T, Marukawa K, Ito R, Ishida K, Matsumoto Y, Kimura Y (1999) Effect of cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on experimental thrombosis in the porcine carotid artery. *Thromb Res* 96:261-268
67. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA (1999) Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 67:1099-1105
68. Kollmar O, Corsten M, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2007) Portal branch ligation induces a hepatic arterial buffer response, microvascular

- remodeling, normoxygenation, and cell proliferation in portal blood-deprived liver tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292:G1534-1542
69. Kollmar O, Corsten M, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2010) Tumour growth following portal branch ligation in an experimental model of liver metastases. *Br J Surg* 97:917-926
70. Konopke R, Saeger HD (2003) [Liver metastases. Diagnosis and therapy]. *Chirurg* 74:866-884; quiz 885-866
71. Konopke R, Volk A, Gastmeier J, Eehalt F, Distler M, Saeger HD, Kersting S (2013) [Recurrent Colorectal Liver Metastases: Who Benefits from a Second Hepatic Resection?]. *Zentralbl Chir*
72. Ku Y, Fukumoto T, Nishida T, Tominaga M, Maeda I, Kitagawa T, Takao S, Shiotani M, Tseng A, Kuroda Y, et al. (1995) Evidence that portal vein decompression improves survival of canine quarter orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 59:1388-1392
73. Kume M, Banafsche R, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Nobiling R, Gebhard MM, Klar E (2006) Dynamic changes of post-ischemic hepatic microcirculation improved by a pre-treatment of phosphodiesterase-3 inhibitor, milrinone. *J Surg Res* 136:209-218
74. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM (1986) Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 166:209-219
75. Lang H (2007) [Liver resection: Part I. Anatomy and operative planning]. *Chirurg* 78:761-773; quiz 774
76. Lauth WW (1983) Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc* 42:1662-1666
77. Lauth WW (1985) Mechanism and role of intrinsic regulation of hepatic arterial blood flow: hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol* 249:G549-556
78. Lauth WW (2007) Regulatory processes interacting to maintain hepatic blood flow constancy: Vascular compliance, hepatic arterial buffer response, hepatorenal reflex, liver regeneration, escape from vasoconstriction. *Hepatol Res* 37:891-903
79. Lauth WW, Legare DJ (1985) The use of 8-phenyltheophylline as a competitive antagonist of adenosine and an inhibitor of the intrinsic regulatory mechanism of the hepatic artery. *Can J Physiol Pharmacol* 63:717-722
80. Lauth WW, Legare DJ, d'Almeida MS (1985) Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). *Am J Physiol* 248:H331-338
81. Lee SG, Hwang S (2005) How I do it: assessment of hepatic functional reserve for indication of hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12:38-43
82. Lee WC, Chen HC, Wang CY, Lin PY, Ou TT, Chen CC, Wen MC, Wang J, Lee HJ (2010) Cilostazol ameliorates nephropathy in type 1 diabetic rats involving improvement in oxidative stress and regulation of TGF-Beta and NF-kappaB. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:1355-1361
83. Liu W, Kovacevic Z, Peng Z, Jin R, Wang P, Yue F, Zheng M, Huang ML, Jansson PJ, Richardson V, Kalinowski DS, Lane DJ, Merlot AM, Sahni S, Richardson DR (2015) The molecular effect of metastasis suppressors on Src signaling and tumorigenesis: new therapeutic targets. *Oncotarget*
84. Liu Y, Fong M, Cone J, Wang S, Yoshitake M, Kambayashi J (2000) Inhibition of adenosine uptake and augmentation of ischemia-induced increase of interstitial adenosine by cilostazol, an agent to treat intermittent claudication. *J Cardiovasc Pharmacol* 36:351-360
85. Lloris-Carsi JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH, Calvo MA, Suzuki S (1993) Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transplant Proc* 25:3303-3304

86. Loss M, Jung EM, Scherer MN, Farkas SA, Schlitt HJ (2010) [Surgical treatment of liver metastases]. *Chirurg* 81:533-541
87. Lowry TW, Hariri H, Prommapan P, Kusi-Appiah A, Vafai N, Bienkiewicz EA, Van Winkle DH, Stagg SM, Lenhart S (2015) Quantification of Protein-Induced Membrane Remodeling Kinetics In Vitro with Lipid Multilayer Gratings. *Small*
88. Man K, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Fung PC, Liang TB, Lee TK, Tsui SH, Ng IO, Zhang ZW, Wong J (2003) Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intragraft gene expression. *Ann Surg* 237:256-264
89. Man K, Lo CM, Ng IO, Wong YC, Qin LF, Fan ST, Wong J (2001) Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes. *Arch Surg* 136:280-285
90. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM (2006) Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 244:254-259
91. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS (1999) Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284:651-654
92. Marcos A, Olzinski AT, Ham JM, Fisher RA, Posner MP (2000) The interrelationship between portal and arterial blood flow after adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation* 70:1697-1703
93. Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P (2008) Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 28:3-11
94. Mathie RT, Alexander B (1990) The role of adenosine in the hyperaemic response of the hepatic artery to portal vein occlusion (the 'buffer response'). *Br J Pharmacol* 100:626-630
95. Mathie RT, Lam PH, Harper AM, Blumgart LH (1980) The hepatic arterial blood flow response to portal vein occlusion in the dog: the effect of hepatic denervation. *Pflugers Arch* 386:77-83
96. Matias M, Casa-Nova M, Faria M, Pires R, Tato-Costa J, Ribeiro L, Costa L (2015) Prognostic Factors after Liver Resection for Colorectal Liver Metastasis. *Acta Med Port* 28:357-369
97. McMahon JB, Richards WL, del Campo AA, Song MK, Thorgeirsson SS (1986) Differential effects of transforming growth factor-beta on proliferation of normal and malignant rat liver epithelial cells in culture. *Cancer Res* 46:4665-4671
98. Michalopoulos GK (1990) Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEB J* 4:176-187
99. Michalopoulos GK (2007) Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213:286-300
100. Michalopoulos GK (2010) Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 176:2-13
101. Michalopoulos GK, DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* 276:60-66
102. Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T (1987) Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg* 206:30-39
103. Natori S, Selzner M, Valentino KL, Fritz LC, Srinivasan A, Clavien PA, Gores GJ (1999) Apoptosis of sinusoidal endothelial cells occurs during liver preservation injury by a caspase-dependent mechanism. *Transplantation* 68:89-96
104. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Ballardur P, Boudjema K, Bachellier P, Jaeck D (1996) Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie. Cancer* 77:1254-1262
105. Nordlinger B, Peschard F, Malafosse R (2003) Resection of liver metastases from colorectal cancer--how can we improve results? *Colorectal Dis* 5:515-517

106. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, Jaeck D, Mirza D, Parks RW, Collette L, Praet M, Bethe U, Van Cutsem E, Scheithauer W, Gruenberger T, Group EG-ITC, Cancer Research UK, Arbeitsgruppe Lebermetastasen und-tumoren in der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft O, Australasian Gastro-Intestinal Trials G, Federation Francophone de Cancerologie D (2008) Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 371:1007-1016
107. Nordlinger B, Wind P (1994) Repeat resections of primary hepatic malignancies. *Cancer Treat Res* 69:53-56
108. Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, Bilezikian JP, Silverstein SC, Stern D (1992) Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol* 262:C546-554
109. Okuda Y, Mizutani M, Ikegami T, Ueno E, Yamashita K (1992) Hemodynamic effects of cilostazol on peripheral artery in patients with diabetic neuropathy. *Arzneimittelforschung* 42:540-542
110. Panis Y, McMullan DM, Emond JC (1997) Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 121:142-149
111. Park WS, Jung WK, Lee DY, Moon C, Yea SS, Park SG, Seo SK, Park C, Choi YH, Kim GY, Choi JS, Choi IW (2010) Cilostazol protects mice against endotoxin shock and attenuates LPS-induced cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via MAPK inhibition and NF-kappaB inactivation: not involved in cAMP mechanisms. *Int Immunopharmacol* 10:1077-1085
112. Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE (2001) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 77:1007-1021
113. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J (1997) Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 25:934-937
114. Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien PA (2006) A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg* 244:921-928; discussion 928-930
115. Poon RT, Fan ST (2005) Assessment of hepatic reserve for indication of hepatic resection: how I do it. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12:31-37
116. Rodriguez AA, LaMorte WW, Hanrahan LM, Hopkins SR, O'Keane JC, Cachecho R, Hirsch EF (1991) Liver viability after ischemia-reperfusion. *Arch Surg* 126:767-772
117. Rous P, Larimore LD (1920) Relation of the Portal Blood to Liver Maintenance : A Demonstration of Liver Atrophy Conditional on Compensation. *J Exp Med* 31:609-632
118. Russell WE (1988) Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits hepatocyte DNA synthesis independently of EGF binding and EGF receptor autophosphorylation. *J Cell Physiol* 135:253-261
119. Russell WE, Coffey RJ, Jr., Ouellette AJ, Moses HL (1988) Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5126-5130
120. Savvanis S, Nastos C, Tasoulis MK, Papoutsidakis N, Demonakou M, Karmaniolou I, Arkadopoulos N, Smyrniotis V, Theodoraki K (2014) Sildenafil attenuates hepatocellular injury after liver ischemia reperfusion in rats: a preliminary study. *Oxid Med Cell Longev* 2014:161942

121. Schmucker DL, Curtis JC (1974) A correlated study of the fine structure and physiology of the perfused rat liver. *Lab Invest* 30:201-212
122. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-322
123. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K (1996) A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 334:1084-1089
124. Schror K (2002) The pharmacology of cilostazol. *Diabetes Obes Metab* 4 Suppl 2:S14-19
125. Seo JH, Park JB, Choi WK, Park S, Sung YJ, Oh E, Bae SK (2015) Improved oral absorption of cilostazol via sulfonate salt formation with mesylate and besylate. *Drug Des Devel Ther* 9:3961-3968
126. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S (2015) Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 22:526-539
127. Shi L, Pu J, Xu L, Malaguit J, Zhang J, Chen S (2014) The efficacy and safety of cilostazol for the secondary prevention of ischemic stroke in acute and chronic phases in Asian population- an updated meta-analysis. *BMC Neurol* 14:251
128. Shimizu E, Kobayashi Y, Oki Y, Kawasaki T, Yoshimi T, Nakamura H (1999) OPC-13013, a cyclic nucleotide phosphodiesterase type III, inhibitor, inhibits cell proliferation and transdifferentiation of cultured rat hepatic stellate cells. *Life Sci* 64:2081-2088
129. Shinohara Y, Katayama Y, Uchiyama S, Yamaguchi T, Handa S, Matsuoka K, Ohashi Y, Tanahashi N, Yamamoto H, Genka C, Kitagawa Y, Kusuoka H, Nishimaru K, Tsushima M, Koretsune Y, Sawada T, Hamada C, group C (2010) Cilostazol for prevention of secondary stroke (CSPS 2): an aspirin-controlled, double-blind, randomised non-inferiority trial. *Lancet Neurol* 9:959-968
130. Song TJ, Adusumilli P, Fong Y (2005) [Prognostic factors in the evaluation of colorectal liver metastases]. *Chirurg* 76:535-536, 538-542
131. Strain AJ, Hill DJ, Milner RD (1986) Divergent action of transforming growth factor beta on DNA synthesis in human foetal liver cells. *Cell Biol Int Rep* 10:855-860
132. Strandness DE, Jr., Dalman RL, Panian S, Rendell MS, Comp PC, Zhang P, Forbes WP (2002) Effect of cilostazol in patients with intermittent claudication: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Vasc Endovascular Surg* 36:83-91
133. Strowitzki MJ, Dold S, von Heesen M, Korbel C, Scheuer C, Moussavian MR, Schilling MK, Kollmar O, Menger MD (2014) The phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol does not stimulate growth of colorectal liver metastases after major hepatectomy. *Clin Exp Metastasis* 31:795-803
134. Sun B, Le SN, Lin S, Fong M, Guertin M, Liu Y, Tandon NN, Yoshitake M, Kambayashi J (2002) New mechanism of action for cilostazol: interplay between adenosine and cilostazol in inhibiting platelet activation. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:577-585
135. Sunagawa M, Shimada S, Hanashiro K, Nakamura M, Kosugi T (2006) Elevation of intracellular cAMP up-regulated thrombomodulin mRNA in cultured vascular endothelial cells derived from spontaneous type-II diabetes mellitus model rat. *Endothelium* 13:325-333
136. Tamai Y, Takami H, Nakahata R, Ono F, Munakata A (1999) Comparison of the effects of acetylsalicylic acid, ticlopidine and cilostazol on primary hemostasis using a quantitative bleeding time test apparatus. *Haemostasis* 29:269-276

137. Tanaka Y, Tanaka R, Liu M, Hattori N, Urabe T (2010) Cilostazol attenuates ischemic brain injury and enhances neurogenesis in the subventricular zone of adult mice after transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 171:1367-1376
138. Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:836-847
139. Tian Y, Jochum W, Georgiev P, Moritz W, Graf R, Clavien PA (2006) Kupffer cell-dependent TNF-alpha signaling mediates injury in the arterialized small-for-size liver transplantation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:4598-4603
140. Troisi R, de Hemptinne B (2003) Clinical relevance of adapting portal vein flow in living donor liver transplantation in adult patients. *Liver Transpl* 9:S36-41
141. Troisi R, Praet M, de Hemptinne B (2003) Small-for-size syndrome: what is the problem? *Liver Transpl* 9:S1
142. Troisi R, Ricciardi S, Smeets P, Petrovic M, Van Maele G, Colle I, Van Vlierberghe H, de Hemptinne B (2005) Effects of hemi-portocaval shunts for inflow modulation on the outcome of small-for-size grafts in living donor liver transplantation. *Am J Transplant* 5:1397-1404
143. Uysal AI, Ocmen E, Akan M, Ozkardesler S, Ergur BU, Guneli E, Kume T, Koca U, Unal Togrul B (2014) The effects of remote ischemic preconditioning and N-acetylcysteine with remote ischemic preconditioning in rat hepatic ischemia reperfusion injury model. *Biomed Res Int* 2014:892704
144. Vauthey JN, Pawlik TM, Ribero D, Wu TT, Zorzi D, Hoff PM, Xiong HQ, Eng C, Lauwers GY, Mino-Kenudson M, Risio M, Muratore A, Capussotti L, Curley SA, Abdalla EK (2006) Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. *J Clin Oncol* 24:2065-2072
145. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD (1994) Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 145:1421-1431
146. Vollmar B, Menger MD (2009) The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev* 89:1269-1339
147. von Heesen M, Hulser M, Seibert K, Scheuer C, Dold S, Kollmar O, Wagner M, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR (2011) Split-liver procedure and inflammatory response: improvement by pharmacological preconditioning. *J Surg Res* 168:e125-135
148. von Heesen M, Muller S, Keppler U, Strowitzki MJ, Scheuer C, Schilling MK, Menger MD, Moussavian MR (2015) Preconditioning by cilostazol protects against cold hepatic ischemia-reperfusion injury. *Ann Transplant* 20:160-168
149. Weintraub WS (2006) The vascular effects of cilostazol. *Can J Cardiol* 22 Suppl B:56B-60B
150. Xu F, Dai CL, Peng SL, Zhao Y, Jia CJ, Xu YQ (2014) Preconditioning with glutamine protects against ischemia/reperfusion-induced hepatic injury in rats with obstructive jaundice. *Pharmacology* 93:155-165
151. Xu X, Man K, Zheng SS, Liang TB, Lee TK, Ng KT, Fan ST, Lo CM (2006) Attenuation of acute phase shear stress by somatostatin improves small-for-size liver graft survival. *Liver Transpl* 12:621-627
152. Yamanaka N, Okamoto E, Kawamura E, Kato T, Oriyama T, Fujimoto J, Furukawa K, Tanaka T, Tomoda F, Tanaka W (1993) Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology* 18:79-85
153. Yoshida D, Akahoshi T, Kawanaka H, Yamaguchi S, Kinjo N, Taketomi A, Tomikawa M, Shirabe K, Maehara Y, Hashizume M (2011) Roles of vascular

- endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase during revascularization and regeneration after partial hepatectomy in a rat model. *Surg Today* 41:1622-1629
154. Zager RA, Baltes LA, Sharma HM, Jurkowitz MS (1984) Responses of the ischemic acute renal failure kidney to additional ischemic events. *Kidney Int* 26:689-700
155. Zhang R, Zhang L, Manaenko A, Ye Z, Liu W, Sun X (2014) Helium preconditioning protects mouse liver against ischemia and reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway. *J Hepatol* 61:1048-1055
156. Zhu P, Zhang B, Wang R, Mei B, Cheng Q, Chen L, Wei G, Xu DF, Yu J, Xiao H, Zhang BX, Chen XP (2015) Selective Inflow Occlusion Technique Versus Intermittent Pringle Maneuver in Hepatectomy for Large Hepatocellular Carcinoma: A Retrospective Study. *Medicine (Baltimore)* 94:e2250

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A./Aa.	Arteria/Ateriae
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
ANOVA	one-way analysis of variance
aU	arbitrary Units
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
°C	Grad Celsius
CK-2	Casein Kinase 2
cm	Zentimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid
d	Tag
DNA (DNS)	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
d.h.	das heißt
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Ethyldiamintetraessigsäure)
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
g	Gramm
HABR	Hepatic Arterial Buffer Response
HDL	High Density Lipoproteins
HE	Hämatoxylin-Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPF	High Power Field
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin-6
i.p.	intraperitoneal

IP	Ischämische Präkonditionierung
IU	International Units
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Kon	Kontrolle
LDF	Laser-Doppler-Flowmetrie
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mM	Millimol
MW	Mittelwert
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanzniveau
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDE-3	Phosphodiesterase-III
PDE-5	Phosphodiesterase-V
pH	pondus Hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)
PHX	ausgedehnte Leberresektion = partielle Hepatektomie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p.o.	per os
PVE	portal vein embolization
R	elektrischer Widerstand
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
s	Sekunde

SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SFSS	small-for-size-syndrome
SPSS	software package used for statistical analysis
SYBR Green I	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff zum Nachweis von doppelsträngiger DNA
Tab.	Tabelle
TGF- $\alpha$	transforming growth factor-alpha
TGF- $\beta$	transforming growth factor-beta
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
U/min	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
vgl.	vergleiche
vs.	versus (gegenüber)
VSMC	vascular smooth muscle cell
z.B.	zum Beispiel

## 10 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 2012. ....	5
Abbildung 2: Chemische Struktur von Cilostazol.....	14
Abbildung 3: Versuchsablauf und Gruppeneinteilung im Überblick.....	18
Abbildung 4: Anatomie der Rattenleber. ....	19
Abbildung 5: HE-gefärbter Schnitt von Lebergewebe.....	23
Abbildung 6: Cleaved-Caspase 3-gefärbter Schnitt von Lebergewebe. ....	24
Abbildung 7: Portalvenöser Blutfluss. ....	29
Abbildung 8: Hepatoarterieller Blutfluss. ....	29
Abbildung 9: Gesamtleber Blutfluss. ....	30
Abbildung 10: Hepatische Mikrozirkulation.....	31
Abbildung 11: Leberregenerationsrate.....	33
Abbildung 12: Semiquantitative Analyse der hepatozellulären Vakuolisierung. ....	34
Abbildung 13: Hepatozelluläre Proliferation (PCNA Immunhistochemie). ....	35
Abbildung 14: Vergleich der VEGF-Expression in Cilostazol-behandelten Tieren und Kontrolltieren. ....	36

## 11 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Gruppenaufteilung.....	17
Tabelle 2: Gallenfluss.....	32
Tabelle 3: Reseziertes Lebergewicht.....	32
Tabelle 4: Explantiertes Lebergewebe. ....	32

## 12 PUBLIKATIONEN

Maximilian von Heesen\*, Stefan Dold\*, **Simon Müller**, Claudia Scheuer, Otto Kolmar, Martin K. Schilling, Michael D. Menger, Mohammed R. Moussavian (2015) Cilostazol Improves Hepatic Blood Perfusion, Microcirculation, and Liver Regeneration After Major Hepatectomy in Rats. *Liver Transplantation* 21: 792 – 800, 2015. [\* equal contribution]

Maximilian von Heesen, **Simon Müller**, Ulrich Keppler, Mortiz J. Strowitzki, Claudia Scheuer, Martin K. Schilling, Michael D. Menger, Mohammed R. Moussavian (2015) Preconditioning by Cilostazol Protects against Cold Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann. Transplant* 20: 160 – 168, 2015.

### **Kongressbeiträge**

Vortrag in der Sitzung “Pathophysiologie”; 128. Kongress Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, München 2011. Thema: “Effect of Cilostazol on hepatic microcirculation and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model”.

Posterbeitrag 15<sup>th</sup> ESOT Congress; Glasgow 2011. Thema: “Effect of Cilostazol on hepatic microcirculation and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model”.

### **Publizierte Abstracts**

Dold S, Strowitzki M, **Müller S**, von Heesen M, Kollmar O, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR. Cilostazol stimulates liver regeneration but not growth of colorectal liver metastases after major liver resection. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396: 890-891.

Dold S, von Heesen M, **Müller S**, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD, Moussavian MR. Effect of Cilostazol® on hepatic microcirculation and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396: 581.

## 13 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Möglichkeit bedanken, in seinem Institut meine Promotion durchzuführen. Vielen Dank für die Unterstützung und die wegweisende Leitung während meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Privatdozent Dr. med. Mohammed R. Moussavian, Facharzt für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Centre Hospitalier Emile Mayrisch, Luxemburg, für die Überlassung des Themas meiner Promotionsarbeit bedanken. Er hatte stets ein offenes Ohr und war für mich ein wichtiger Ansprechpartner. Sein kompetenter Rat sowie seine Hilfe kamen mir in zahlreichen Angelegenheiten sehr zugute. Ohne seine umfassende Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Maximilian von Heesen, Oberarzt an der Klinik für Allgemeinchirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes und Stefan Dold bedanken. Beide betreuten mich während der experimentellen Operationen und Auswertungen. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. von Heesen. Seine ausdauernde und geduldige Art trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei. Er stand mir jederzeit fachlich kompetent zur Seite und war nie müde mich immer wieder neu zu motivieren.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentellen Chirurgie bedanken. Insbesondere bei Frau Janine Becker für ihre Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Gewebeschnitte. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Claudia Scheuer bedanken für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Untersuchungen.

Am Ende möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die es mir durch ihre Unterstützung ermöglicht haben, Medizin zu studieren. Ebenso möchte ich meinen Freunden danken. Danke, dass ihr mich auf meinem bisherigen Lebensweg begleitet und unterstützt habt.