

Aus dem
Institut für Experimentelle Chirurgie
der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Die Bedeutung des mitochondrialen Proteins UCP2 beim Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber

Inauguraldissertation

zum Erwerb des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät der
Universität Rostock

2011



vorgelegt von:

Andreas Berger

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Universität Rostock, Medizinische Fakultät
Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung
2. Herr Prof. Dr. med. Markus Tiedge
Universität Rostock, Medizinische Fakultät
Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie
3. Herr Prof. Dr. med. Thomas Minor
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Medizinische Fakultät
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Sektion Chirurgische Forschung

Tag der Einreichung:

22. Juli 2011

Tag der Verteidigung:

07. Februar 2012

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|------------|--|----|
| | INHALTSVERZEICHNIS | 2 |
| | ABKÜRZUNGEN | 4 |
| 1. | ABSTRACT | 7 |
| 2. | ZUSAMMENFASSUNG | 8 |
| 3. | EINLEITUNG | 10 |
| 3.1 | Bedeutung von Ischämie/Reperfusion in der Leberchirurgie | 10 |
| 3.2 | Entkopplerproteine (Uncoupling Proteins) | 12 |
| 3.2.1 | Die verschiedenen Entkopplerproteine und deren Funktion | 13 |
| 3.2.1.1 | <i>Uncoupling Protein 1</i> | 14 |
| 3.2.1.2 | <i>Uncoupling Protein 2 und Uncoupling Protein 3</i> | 16 |
| 3.2.1.3 | <i>Uncoupling Protein 4 und Uncoupling Protein 5</i> | 17 |
| 3.3 | Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber | 17 |
| 3.3.1 | Definition | 17 |
| 3.3.2 | Ischämieschaden der Leber | 18 |
| 3.3.3 | Reperfusionsschaden der Leber | 19 |
| 4. | ZIELSETZUNG | 23 |
| 5. | MATERIAL UND METHODEN | 24 |
| 5.1 | Versuchstiere | 24 |
| 5.2 | Modell | 24 |
| 5.2.1 | Narkose | 24 |
| 5.2.2 | Chirurgische Präparation | 24 |
| 5.3 | Methoden | 25 |
| 5.3.1 | Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie | 25 |
| 5.3.1.1 | <i>Grundprinzipien der Fluoreszenz</i> | 26 |
| 5.3.1.2 | <i>Technischer Aufbau</i> | 27 |
| 5.3.1.3 | <i>Aufbau und Leistung des Intravitalmikroskops</i> | 28 |
| 5.3.1.4 | <i>Mikrozirkulatorische Parameter</i> | 30 |
| 5.3.1.4.1 | <i>Sinusoidale Perfusion</i> | 30 |
| 5.3.1.4.2 | <i>Sinusoidale Leukozytenstase</i> | 30 |
| 5.3.1.4.3 | <i>Venuläres Leukozytenrolling und venuläre Leukozytenadhärenz</i> | 31 |
| 5.3.1.4.4 | <i>Hepatozelluläre Apoptose</i> | 32 |
| 5.3.2 | Blutbild und Laborchemie | 32 |
| 5.3.3 | Histologie und Immunhistochemie | 34 |
| 5.3.4 | Western Blot Protein Analyse | 35 |
| 5.3.5 | Analyse des metabolischen Energiestatus | 36 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.3.6 | Bestimmung von Malondialdehyd | 36 |
| 5.4 | Experimentelles Protokoll | 38 |
| 5.5 | Statistik | 38 |
| 6. | ERGEBNISSE | 40 |
| 6.1 | Hepatische Mikrozirkulation | 40 |
| 6.1.1 | Sinusoidale Perfusion | 40 |
| 6.1.2 | Leukozyten-Endothelzell-Interaktion | 41 |
| 6.1.3 | Hepatozelluläre Apoptose | 42 |
| 6.2 | Histologie und Immunhistochemie | 42 |
| 6.2.1 | Hämatoxylin & Eosin-Färbung | 42 |
| 6.2.2 | Cleaved Caspase-3-Färbung | 44 |
| 6.3 | Hepatozellulärer Energiestatus | 45 |
| 6.4 | Plasmakonzentration von IL-6 | 47 |
| 6.5 | Plasmakonzentration von Malondialdehyd | 48 |
| 6.6 | Plasmaaktivität leberspezifischer Enzyme | 49 |
| 6.7 | Western Blot Protein Analyse | 50 |
| 6.7.1 | Analyse von cleaved Caspase-3 | 50 |
| 6.7.2 | Analyse von Proliferating Cell Nuclear Antigen | 51 |
| 6.7.3 | Analyse von phosphorylierter endothelialer NO-Synthase | 52 |
| 6.8 | Blutbild | 53 |
| 6.9 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 54 |
| 7. | DISKUSSION | 55 |
| 7.1 | Diskussion von Material und Methoden | 55 |
| 7.1.1 | Versuchstiere und Tiermodell | 55 |
| 7.1.2 | Diskussion der Untersuchungstechniken | 57 |
| 7.2 | Diskussion der Ergebnisse | 61 |
| 7.2.1 | Der Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber | 61 |
| 7.2.2 | Mikrozirkulation | 61 |
| 7.2.3 | Hepatozelluläre Integrität | 62 |
| 7.2.4 | Hepatozellulärer Energiestatus | 64 |
| 7.2.5 | Die Rolle des mitochondrialen Proteins UCP2 beim Ischämie- /Reperfusionsschaden der Leber | 65 |
| 7.3 | Schlussfolgerungen | 70 |
| 7.4 | Perspektiven | 71 |
| 8. | LITERATURVERZEICHNIS | 72 |

ABKÜRZUNGEN

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| A. | Arteria |
| Abb. | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ALT | Alaninaminotransferase |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| ANOVA | Analysis of Variance |
| AST | Aspartataminotransferase |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BMCP 1 | Brain Mitochondrial Carrier Protein 1 |
| CCD | Charged-Coupled Device |
| D-GalN | D-Galaktosamin |
| DNA | Desoxribonukleinsäure |
| EZ | Endothelzelle |
| EDTA | Ethylendiamintetraazetat |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| eNOS | endotheliale NO-Synthase |
| GF | Gesichtsfeld |
| GLDH | Glutamatdehydrogenase |
| h | Stunde(n) |
| HCC | Hepatozelluläres Karzinom |
| H&E | Hämatoxylin & Eosin |
| ICAM | Interzelluläres Adhäsionsmolekül |
| IL | Interleukin |
| IFN | Interferon |
| i.p. | intraperitoneal |
| I/R | Ischämie/Reperfusion |
| IRS | Ischämie-/Reperfusionsschaden |
| i.v. | intravenös |
| IVM | Intravitalmikroskopie |
| KZ | Kupffer-Zelle |
| kDa | Kilodalton |
| KG | Körpergewicht |
| LDH | Laktatdehydrogenase |
| Lig. | Ligamentum |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MDA | Malondialdehyd |

| | |
|--------------|--|
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute(n) |
| MW | Mittelwert |
| NASH | Nichtalkoholische Steatohepatitis |
| NF-κB | Nuklear factor-kappa B |
| NMPI | N-Methyl-2-phenylindon |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PAF | Plättchenaktivierender Faktor |
| PCNA | Proliferating Cell Nuclear Antigen |
| PMN | Polymorphkernige neutrophile Granulozyten |
| ROS | Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species) |
| SD | Standardabweichung (standard deviation) |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean) |
| SEZ | Sinusendothelzelle |
| TG | Trockengewicht |
| TMPO | 1,1,3,3-Tetramethoxypropan |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor-α |
| UCP | Uncoupling Protein |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| V. | Vena |
| W | Watt |

1. ABSTRACT

Uncoupling protein 2 (UCP2) might play an important role in mediating ischemia/reperfusion (I/R) injury due to its function in the uncoupling of oxidative phosphorylation and in the proton leak-associated increase of reactive oxygen species production. The aim of this study was to elucidate the role of UCP2 in hepatic I/R injury.

UCP2 wild type and UCP2 deficient mice were subjected to I/R (30'/60') of the left liver lobe. Sham-operated animals without I/R served as controls. Intravital fluorescence microscopy was used for assessing postischemic microcirculatory dysfunction. Indicators of hepatic inflammatory response, oxidative stress and bioenergetic status as well as histomorphology were investigated.

Under sham conditions UCP2 $-/-$ mice presented slightly but not significantly higher levels of hepatic ATP than wild type mice. In addition, they exhibited higher systemic IL-6 levels and intrahepatic leukocyte adherence. After exposure to I/R, the extent of reperfusion injury did not differ between UCP2 $+/+$ and UCP2 $-/-$ mice, as indicated by a comparable loss of sinusoidal perfusion, hepatic ATP, as well as rise of transaminases and disintegration of liver structures. Intrahepatic leukocyte adherence and plasma IL-6 levels of postischemic UCP2 $-/-$ mice still exceeded those of UCP2 $+/+$ mice.

It is conceivable to state that UCP2 seems to be of minor relevance for the manifestation and extent of postischemic reperfusion injury in non-diseased livers with the better ATP availability most probably being counteracted by the higher pro-inflammatory IL-6 levels in UCP2 deficient mice.

2. ZUSAMMENFASSUNG

Organschädigungen, hervorgerufen durch Ischämie und Reperfusion, stellen im Rahmen von Leberresektionen und Lebertransplantationen nach wie vor eine große klinische Herausforderung dar. In den letzten Jahrzehnten konnten grundlegende Mechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens (IRS) geklärt werden. Die Rolle mitochondrialer Proteine ist dabei bislang nur wenig beleuchtet.

1976 wurde mit dem Uncoupling Protein 1 (UCP1) das erste von bisher fünf bekannten Entkopplerproteinen beschrieben. Für UCP2 konnte eine Funktion im oxidativen Stoffwechsel zur ATP-Gewinnung gezeigt werden. Dies führte uns zur Fragestellung der hier vorliegenden Arbeit, welche Bedeutung das mitochondriale Protein UCP2 im Rahmen des IRS der Leber hat. Die Beantwortung dieser Frage war Ziel dieser Arbeit.

Als Kontrolltiere dienten männliche C57BL/6J Mäuse (**UCP2 +/+ IRS**, n=7). Zur Analyse der Bedeutung des mitochondrialen UCP2-Gens nutzten wir männliche UCP2-defiziente Mäuse (**UCP2 -/- IRS**, n=7), welche neben dieser Mutation den gleichen genetischen Hintergrund wie die Wildtypmäuse besitzen. Nach intraperitonealer Injektion einer Ketamin/Xylazin-Narkose und entsprechender chirurgischer Präparation wurde die Ischämie am linken Leberlappen durch Okklusion des Lig. hepatoduodenale für 30 min induziert. Es folgten 60 min Reperfusion. Sham-operierte Tiere wurden ohne Induktion des IRS der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen (**UCP2 +/+ Sham**, n=7 bzw. **UCP2 -/- Sham**, n=7). Im Anschluß daran wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) der Leber durchgeführt. Durch Punktion der Vena cava inferior erfolgte danach die Entnahme von venösem Vollblut für laborchemische Analysen. Lebergewebe wurde für histologische, immunhistochemische, molekularbiologische und laborchemische Untersuchungen asserviert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

Unter sham-Bedingungen zeigten die UCP2 -/- Tiere, verglichen mit den Wildtyptieren, einen leicht, jedoch nicht signifikant höheren Gehalt an hepatischem ATP. Darüber hinaus wiesen die UCP2 -/- Tiere höhere systemische IL-6-Spiegel und eine erhöhte intrahepatische Leukozytenadhärenz auf. Nach Induktion von I/R unterschied sich das Ausmaß des IRS, gemessen an einem vergleichbaren sinusoidalen Perfusionsausfall, vergleichbarer hepatischer ATP-Reserve und einem ähnlichen Anstieg der Transaminasen sowie der Zerstörung des hepatischen Zellverbandes, zwischen UCP2 +/+ und UCP2 -/- Mäusen nicht.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen eine nahezu identische Antwort der Tiere beider genetischer Hintergründe auf I/R. Es kann gefolgert werden, dass UCP2 von

eher geringer Relevanz für die Manifestation und das Ausmaß des IRS in gesunden Lebern ist. Der höheren ATP-Reserve wirkt möglicherweise die höhere proinflammatorische Aktivität von IL-6 in UCP2 ^{-/-} Mäusen entgegen.

3. EINLEITUNG

3.1 Bedeutung von Ischämie/Reperfusion in der Leberchirurgie

Organschädigungen der Leber, hervorgerufen durch Ischämie und anschließende Reperfusion (I/R), stellen nach wie vor eine große Herausforderung in der Chirurgie dar. Die chirurgische Intervention gilt heute als eines der wichtigsten Behandlungskonzepte primärer und sekundärer Lebertumore. Beim hepatozellulären Karzinom ist beispielsweise die Resektion betroffener Parenchymanteile therapeutisches Mittel der Wahl. Weitere wichtige Indikationen leberchirurgischer Therapieintervention sind Lebermetastasen, Lebertraumata und Echinokokkuszysten (Huguet et al., 1992). Diese Interventionen können zu lokalen Störungen der Leberfunktion führen, aber auch eine systemisch wirksame Leberdysfunktion bedingen, wenn die Schädigung sehr stark ist (Jaeschke, 1998). Die Erklärung der pathophysiologischen Grundlagen des Ischämie-/Reperfusionsschadens (IRS) und die Ableitung präventiver und therapeutischer Strategien sind seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung (Vollmar und Menger, 2009).

Die meisten operativen Eingriffe an der Leber finden unter partieller reversibler Ischämie statt. Dabei verbleibt das Organ im Abdomen. Die nutritive Organperfusion der Leber wird nur vorübergehend durch Okklusion der zu- und abführenden Gefäße unterbunden. Dieses Verfahren wird als „warme“ Ischämie bezeichnet. Eine besondere Bedeutung kommt der I/R vor allem bei der Lebertransplantation zu. Nach Explantation des Spenderorgans muss dieses bis zur Implantation beim Empfänger in einer Konservierungslösung aufbewahrt werden. Da die Leber nach Durchtrennung aller zu- und abführenden Gefäße aus dem Abdomen entfernt und gekühlt zum Empfänger transportiert werden muß, spricht man von absoluter bzw. „kalter“ Ischämie. Im Jahr 2010 wurden in Deutschland 1049 Lebertransplantationen durchgeführt (Eurotransplant Annual Report 2010).

Neben der kurativen Intention soll im Rahmen leberchirurgischer Interventionen der Blutverlust so gering wie möglich gehalten werden. Große Blutverluste können zur Schädigung des Leberparenchyms mit daraus resultierender primärer Stoffwechselfunktion der Leber führen (Tucker et al., 2005). Auch kann es zu sekundären Folgen wie dem hepatorenalen oder dem hepatopulmonalen Syndrom kommen (Cardenas et al., 2005). Es entsteht ein *circulus vitiosus* bis zum kompletten Organausfall. Neben allgemeinen Maßnahmen zur Vermeidung von Blutungen (atraumatische Operationstechniken, Schaffung optimaler Zugangswege, Minimierung der venösen Gefäßfüllung) kann eine zeitlich begrenzte Unterbrechung der Blutzufuhr nötig sein (Bechstein et al., 2000). In Form des sog. Pringle Manövers wird die partielle, reversible Ischämie erreicht. Dabei wird das Lig. hepatoduodenale mit den darin verlaufenden Strukturen (Vena portae, Arteria hepatica propria, Ductus choledochus) temporär okkludiert (Pringle, 1908). Das Pringle Manöver stellt

heute das Standardverfahren bei Leberresektionen und bei nicht stillbaren, meist posttraumatischen Leberblutungen dar.

Die während der Ischämie und der anschließenden Reperfusion entstandenen morphologischen und funktionellen Veränderungen der Leber werden als hepatischer IRS bezeichnet. Diesem kommt ein hoher klinischer Stellenwert zu, da er entscheidenden Einfluss auf die Induktion und Ausprägung postoperativer Organinsuffizienz bzw. Transplantatdysfunktion hat. Außerdem ist die Ausprägung des IRS für zahlreiche postoperative Komplikationen (mit-) verantwortlich und bestimmt die Prognose des Patienten (Weiss et al., 2007; Heidenhain et al., 2006).

3.2 Entkopplerproteine (Uncoupling Proteins)

Die Uncoupling Proteins (UCP) 1-5 gehören zur Familie der mitochondrialen Anionentransporter, welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Zu dieser Gruppe zählen auch der ATP/ADP-Transporter, der Phosphat-, der Citrat- und der Oxalglutarat/Malat-Transporter (Boss et al., 1997). Sie fungieren als Transportsysteme für Ionen und Metabolite durch die innere Mitochondrienmembran. Zurzeit sind 5 UCPs in Säugetieren identifiziert und werden als UCP1 bis UCP5 bezeichnet. Diese Proteine haben im Mitochondrium die Fähigkeit, die Oxidation von der Phosphorylierung (ATP-Synthese) zu entkoppeln. Möglich wird das dadurch, dass der durch die Komplexe I, III und IV der Atmungskette aufgebaute Protonengradient ($\Delta\mu\text{H}^+ \uparrow$) über der inneren Mitochondrienmembran zusammenbricht ($\Delta\mu\text{H}^+ \downarrow$). Die Protonen gelangen nicht über den Komplex V (ATP-Synthase-Komplex) der Atmungskette zurück in die mitochondriale Matrix, sondern verlassen den Intermembranraum durch das UCP (Abb. 1).

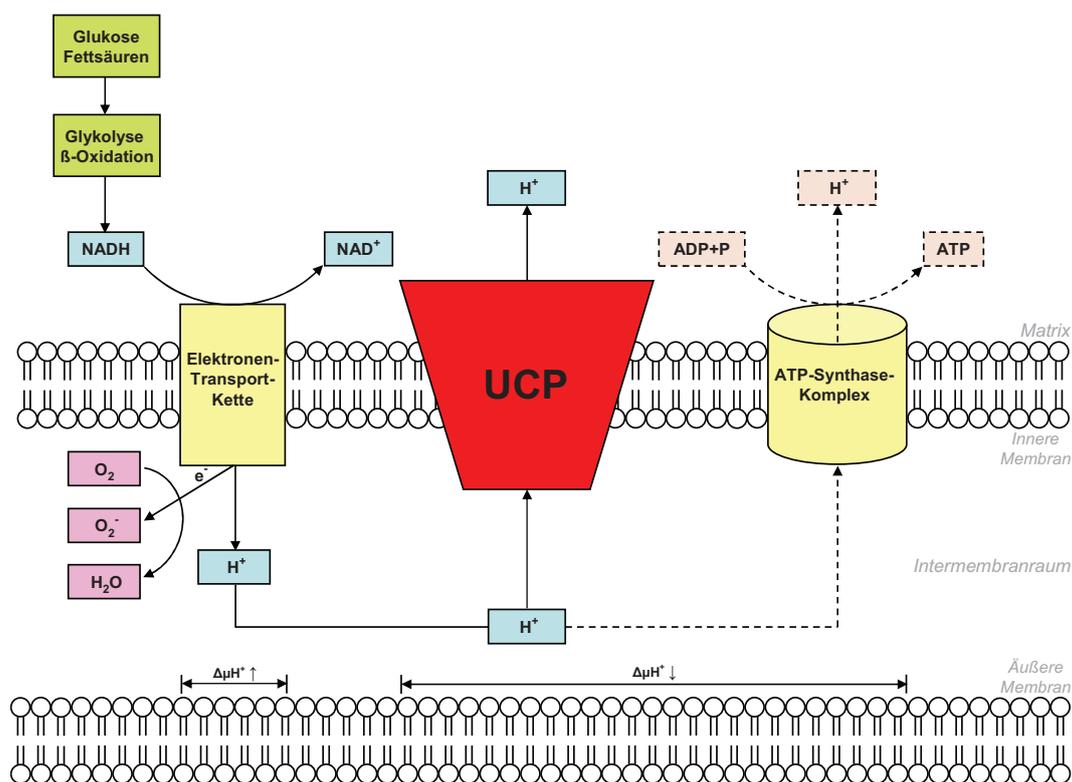


Abbildung 1. Schematische Darstellung der oxidativen Phosphorylierung und der Funktionsweise der UCPs über der inneren Mitochondrienmembran. $\Delta\mu\text{H}^+ \uparrow$ beschreibt den Aufbau eines mitochondrialen Potentials über der inneren Mitochondrienmembran durch Protonentransport und dessen Kopplung an die ATP-Synthase, $\Delta\mu\text{H}^+ \downarrow$ erklärt die entkoppelnde Funktion der UCPs mit konsekutivem Zusammenbruch des aufgebauten Potentials und herabgesetzter ATP-Synthese.

Infolge dessen kommt es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Protonengradienten mit konsekutiver Abnahme des mitochondrialen Potentials und zu einer Abnahme der ATP-Synthese-Rate. Die Arbeitsgruppe um Rousset und Mitarbeiter postuliert für UCP2 folgende physiologische Aufgabe: Durch das partielle Entkoppeln von Oxidation und Phosphorylierung wird eine übermäßige ATP-Produktion verhindert, welche ihrerseits sonst die Zellatmung behindern würde (Rousset et al., 2004).

Die mitochondrialen Transportproteine besitzen einige strukturelle Gemeinsamkeiten: Meist haben sie eine Länge von ungefähr 300 Aminosäuren und das Molekulargewicht beträgt ca. 30 kDa. Dabei stellen diese Proteine eine dimere Struktur aus zwei identischen Untereinheiten dar (Klingenberg et al., 1989a). Jede der Untereinheiten besteht aus sechs hydrophilen Helices, welche die innere Mitochondrienmembran durchspannen, wobei die C- und N-Termini in den Intermembranraum hineinragen (Klingenberg et al., 1989b; Miroux et al., 1993; Rousset et al., 2004) (Abb. 2).

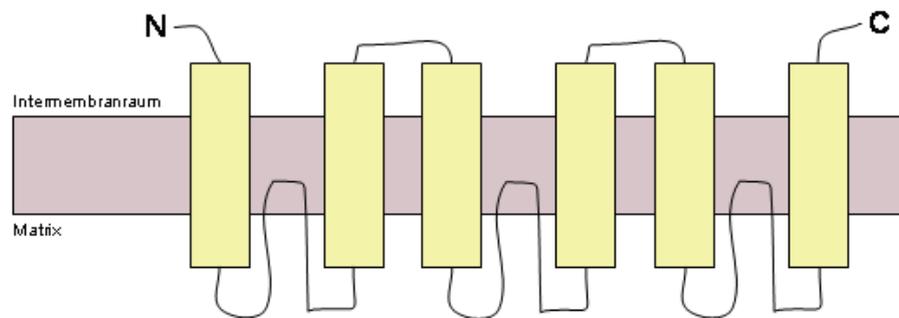


Abbildung 2. Schematische Darstellung der UCPs in der inneren Mitochondrienmembran. Die UCPs setzen sich aus 6 transmembranös verlaufenden, hydrophilen α -Helices zusammen. Die C- und N-Termini ragen in den Intermembranraum hinein (Abbildung basierend auf Rousset et al., 2004).

3.2.1 Die verschiedenen Entkopplerproteine und deren Funktion

Die Beschreibung der UCPs erfolgte erstmals 1976 durch die Arbeitsgruppe um Ricquier und Kader (Ricquier et al., 1976). Lange Zeit war nur UCP1 bekannt, was vermutlich im Zuge der Evolution für die Thermogenese von Neugeborenen, Winterschläfern und Nagetieren entstanden war (Klingenberg, 1989a). In den Jahren darauf konnten weitere UCPs charakterisiert werden: UCP2 (Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997), UCP3 (Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997), UCP4 und UCP5, welches auch als *Brain Mitochondrial Carrier Protein 1* (BMCP1) bezeichnet wird (Mao et al., 1999; Sanchis et al., 1998), (Tab. 1).

| Uncoupling Protein | Lokalisationen | Hauptfunktionen |
|--------------------|--|--|
| UCP1 | braunes Fettgewebe | Thermogenese (Neugeborene und Nagetiere) |
| UCP2 | ubiquitär | Entkopplung der Atmungskette Insulinsekretion ↓ |
| UCP3 | Skelettmuskel braunes Fettgewebe Myokard | Transport von Fettsäuren aus dem Mitochondrium |
| UCP4 | Nervensystem | Calciumhomöostase, antiapoptotisch |
| UCP5 (BMCP 1) | Nervensystem | Vermutlich: Rolle im Fett- und Energistoffwechsel |

Tabelle 1. Überblick über die verschiedenen UCPs und deren physiologische Funktionen.

Weitere UCPs konnten in Protozoen (Jarmuszkiewicz et al., 1999), in Fischen (Stuart et al., 1999), in Hefen (Jarmuszkiewicz et al., 2000) und in Vögeln (Raimbault et al., 2001) nachgewiesen werden. Nach Sluse et al. (2002) sind die UCPs multizellulär vorkommend und wahrscheinlich während der Phylogenese entstanden.

3.2.1.1 *Uncoupling Protein 1*

Die Erstbeschreibung von UCP1 erfolgte 1976 durch die Arbeitsgruppe um Ricquier und Kader (1976). Es gilt heute als das am besten charakterisierte UCP und trug ursprünglich den Namen Thermogenin.

UCP1 wird ausschließlich im braunen Fettgewebe exprimiert. Nur Neugeborene, Winterschläfer und kälteangepasste Tiere besitzen braunes Fettgewebe und nutzen dies für die zitterfreie Thermogenese. UCP1 gilt als Schlüsselenzym dieser Art von Wärmebildung (Enerbäck et al., 1997). Charakteristisch für das braune Fettgewebe ist die Vielzahl an Mitochondrien. Als gemeinsame Endstrecke des Intermediärstoffwechsels ist die oxidative Phosphorylierung anzusehen, welche mit ihren fünf Transportkomplexen in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und für die oxidative Phosphorylierung von ADP zu ATP verantwortlich ist.

Erfolgt bei Kälte eine durch hypothalamische Kontrolle gesteuerte Aktivierung des vegetativen Nervensystems, so wird Noradrenalin freigesetzt, welches über β_3 -adrenerge Rezeptoren des braunen Fettgewebes intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt. Daraus resultiert eine erhöhte Lipolyserate mit nachfolgend erhöhter Konzentration freier Fettsäuren. Diese aktivieren UCP1. Ebenso wird dessen Transkription gesteigert (Himms-Hagen, 1989).

Bei Anwesenheit von UCP1 erfolgt der Protonenrückstrom in die Mitochondrienmatrix nicht über Komplex V der Atmungskette, sondern über dieses Protein (Abb. 1).

Durch Heaton (1978) und Nicholls (1979) wurden die Thesen von Ricquier und Kader wieder aufgenommen, und sie konnten zeigen, dass für diesen veränderten Protonenrückstrom ein 33,2 kDa großes Protein der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist. 1989 wurde UCP1 durch die Arbeitsgruppe um Klingenberg isoliert und als Dimer charakterisiert (Klingenberg et al., 1989a). Die Funktion von UCP1 besteht also in einem „Kurzschließen“ des Protonenflusses, sodass die frei werdende Energie in Form von Wärme abgegeben werden kann. Das heißt, dass bei Anwesenheit und Aktivität von UCP1 Wärme statt Energie gebildet wird. Da UCP1 spezifisch im braunen Fettgewebe zu finden ist, scheint seine Verbreitung sich vermutlich auf Säugetiere zu beschränken.

3.2.1.2 *Uncoupling Protein 2 und Uncoupling Protein 3*

1997 wurden UCP2 (Fleury et al., 1997; Gimeno et al., 1997) und UCP3 (Boss et al., 1997; Vidal-Puig et al., 1997) entdeckt. In der Strukturanalyse konnte festgestellt werden, dass zu 59% (UCP2) bzw. zu 57% (UCP3) mit UCP1 Aminosäurehomologie besteht (Krauss et al., 2005). Für UCP2 und UCP3 beträgt die Ähnlichkeit sogar rund 73% (Boss et al., 1997; Ricquier et al., 2000), weshalb auch eine Protonentransportfunktion für diese beiden Proteine angenommen wird. Bei UCP3 geht man davon aus, dass es aus einer Genduplikation von UCP2 hervorgegangen ist, da UCP2 und UCP3 sich direkt nebeneinander auf einem Chromosom befinden (Ledesma et al., 2002), bei der Maus auf Chromosom 7, beim Menschen auf Chromosom 11q13 (Fleury et al., 1997). Die Expression von UCP2 und UCP3 ist nicht wie bei UCP1 auf das braune Fettgewebe beschränkt. UCP3 findet sich überwiegend im braunen Fettgewebe und im Skelettmuskel (Boss et al., 1997). UCP2 ist ubiquitär verbreitet, wie z. B. in Leber, Muskel, Nieren, Milz, Makrophagen des Immunsystems (Ricquier und Bouillaud, 2000) und Inselzellen des Pankreas (Rousset et al., 2004). Durch das Vorkommen von UCP3 im braunen Fettgewebe wurde zunächst angenommen, dass auch UCP3 eine Rolle in der zitterfreien Thermogenese spielt. *In vivo* Studien an UCP3 *knock out* Mäusen zeigten jedoch keine Beeinträchtigung der zitterfreien Thermogenese-Kapazität (Gong et al., 2000; Vidal-Puig et al., 2000).

Auch für UCP2 wurde aufgrund der Ähnlichkeit zu UCP1 hypothetisiert, dass es eine Rolle in der kälteinduzierten Thermogenese spielt. Untersuchungen an UCP2 kompetenten und UCP2 *knock out* Mäusen zeigten, dass Körpertemperatur und Körpergewicht in beiden Gruppen identisch waren und UCP2 somit keinen Einfluss auf beide Parameter hat (Zhang et al., 2001). Andere Studien zeigten jedoch die Entkopplerfunktion der Atmungskette durch UCP2 (Echtay et al., 2001; Fleury et al., 1997; Jaburek et al., 1999; Rial et al., 1999). Von Rousset et al. wurde 2004 abgeleitet, dass UCP2 durch seine Entkopplerfunktion zwischen Oxidation und Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran den oxidativen Stress reduziert und dem Protein somit eine protektive Funktion zukommt (Rousset et al., 2004). Diese These ist jedoch nicht unumstritten. Die Arbeitsgruppe um Zhang (2001) isolierte Inselzellen des Pankreas aus UCP2 *+/+* und UCP2 *-/-* Mäusen. *In vitro* wie auch *in vivo* konnte so gezeigt werden, dass unter UCP2 *knock out* der ATP-Gehalt der β -Zellen signifikant erhöht war. ATP gilt als intrazellulärer Stimulus für die Insulinsekretion der β -Zellen des Pankreas. Unter UCP2-Defizienz zeigte sich konsekutiv eine höhere Insulinausschüttung. Es entstand die Hypothese, dass unter Anwesenheit von UCP2 und dem daraus resultierenden niedrigeren ATP-Gehalt die Fähigkeit der β -Zellen, adäquat zur Blutglukose Insulin zu sezernieren, herabgesetzt wird. Vieles deutet also darauf hin, dass dieses mitochondriale Protein einen Einfluß auf die Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 hat (Zhang et al., 2001).

Ähnlich wie bei Diabetes mellitus Typ 2 ist auch die Klärung der Frage nach der Bedeutung von UCP2 im Rahmen des hepatischen IRS u. a. bei Fettlebern Gegenstand vieler aktueller Studien. Von der Arbeitsgruppe um Wan und Mitarbeiter konnte gezeigt werden, dass der *knock out* von UCP2 den I/R-assoziierten Schaden der Fettleber lindert (Wan et al., 2008). *Vice versa* zeigten Serviddio und Mitarbeiter, dass UCP2 die Anfälligkeit gegen den hepatischen IRS bei Vorliegen einer NASH erhöht (Serviddio et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Vollmar und Mitarbeiter untersuchte die Bedeutung von UCP2 beim D-Galaktosamin/Lipopolysaccharid-(D-GalN/LPS)-induzierten septischen Leberschaden (Le Minh et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass der hepatozelluläre ATP-Gehalt unter UCP2 *knock out* deutlich erhöht war. Demzufolge fand sich eine signifikant höhere Rate an ATP-abhängiger hepatozellulärer Apoptose, eine jedoch geringere Ausprägung des nekrotischen Zellschadens und reduzierte Transaminasenaktivität im Blut. Insgesamt konnte eine Protektion gegenüber dem endotoxämisch bedingten Leberschaden durch UCP2 *knock out* beobachtet werden.

3.2.1.3 *Uncoupling Protein 4 und Uncoupling Protein 5*

Wenige Jahre nach der Charakterisierung von UCP2 und UCP3 erfolgte die Beschreibung von zwei weiteren Vertretern dieser mitochondrialen Transporterproteine. UCP4 und UCP5, letzteres auch als BMCP1 bekannt, finden sich vorwiegend in neuronalem Gewebe (Sanchis et al., 1998; Mao et al., 1999). Die Ähnlichkeit beider zu den bisher bekannten UCPs ist mit 34-39% sehr gering. Es handelt sich bei UCP4 und UCP5 somit nur um entfernte Mitglieder der Proteinfamilie.

3.3 **Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber**

3.3.1 **Definition**

Beim IRS handelt es sich um das Gesamtbild der morphologischen und funktionellen Veränderungen der Leber in Antwort auf Ischämie und Reperfusion. Bereits 1975 wurde von der Arbeitsgruppe um Toledo-Pereyra der IRS im Rahmen experimenteller Lebertransplantationsstudien als klinisch sehr bedeutend beschrieben (Toledo-Pereyra et al., 1975). Während der Ischämie kommt es vorwiegend zu hypoxisch bedingten Zellschäden. Die Reperfusion führt zu weiteren, vor allem durch oxidativen Stress hervorgerufenen Schäden (Teoh et al., 2003; Jaeschke et al., 2003). Der Reperfusionsschaden entwickelt sich auf der Grundlage der ischämiebedingten Schädigung (Flaherty JL, 1988). Aufgrund der klinischen Bedeutsamkeit des IRS ist die Aufdeckung der pathophysiologischen Grundlagen seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung

(Jaeschke, 1996b; Bilzer et al., 2000; Kim, 2003; Teoh et al., 2003; Arie et al., 2003; Schemmer et al., 2004; Hirsch et al., 2006).

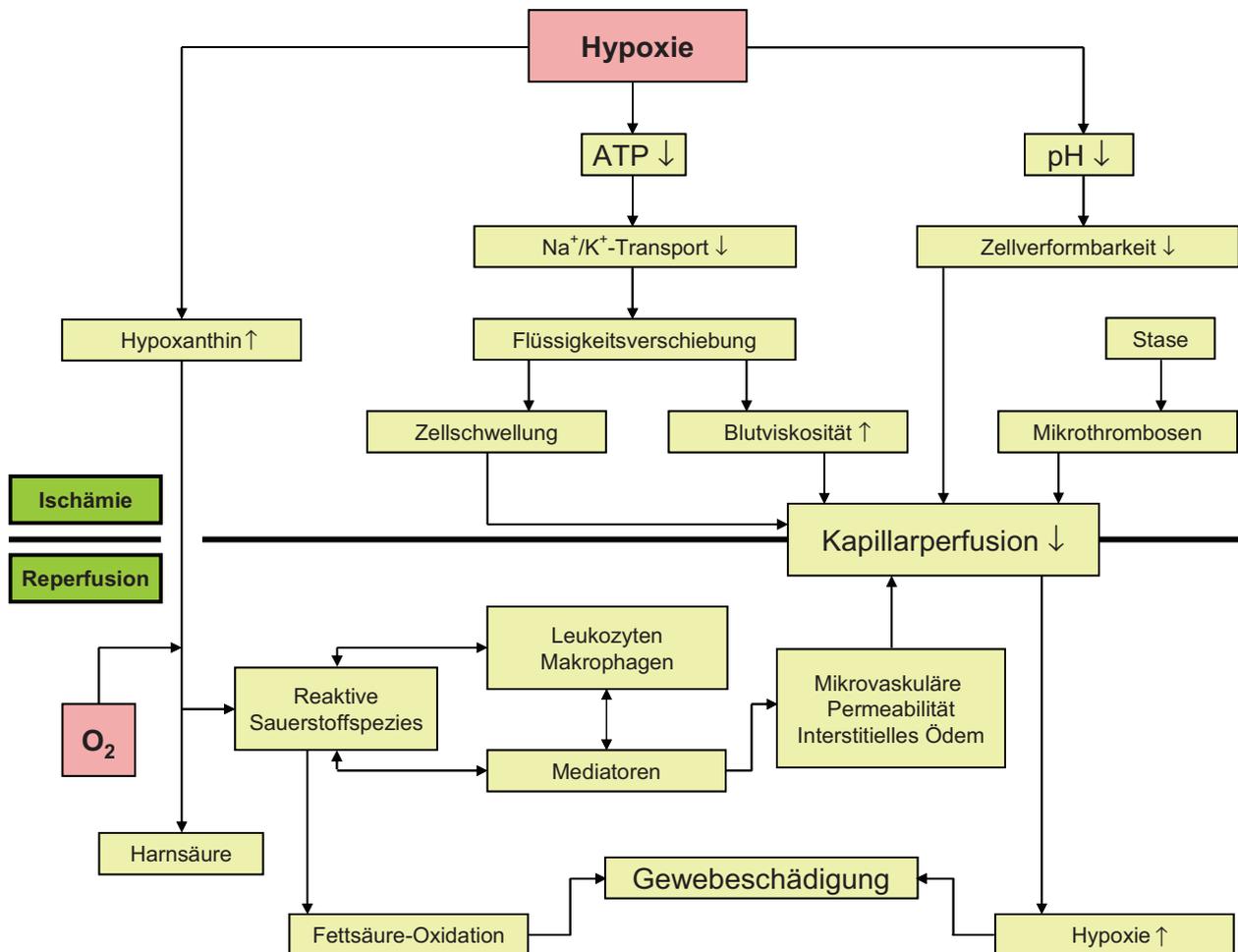


Abbildung 3. Schematische Darstellung der pathophysiologischen Grundlagen des IRS der Leber. Abbildung modifiziert nach Menger et al. *Liver Microcirculation and Hepatobiliary Function* 1993 (Editoren: Messmer K, Menger MD).

3.3.2 Ischämieschaden der Leber

Die Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr der Leber führt im Organ zur Gewebshypoxie. Da Sauerstoff für aerobe Stoffwechselforgänge nötig ist, stellt sich der Organismus auf anaerobe Metabolisierungswege, wie z. B. auf die anaerobe Glykolyse um: Dabei können nur noch zwei Mol ATP aus einem Mol Glukose gewonnen werden. Saure Valenzen, z. B. Laktat, häufen sich an, der pH-Wert sinkt, und es resultiert eine intrazelluläre Azidose. Zum Vergleich: Unter aeroben Bedingungen beträgt die Ausschöpfung an ATP aus einem Mol Glukose 36 Mol ATP. Im sauren Milieu ist die suffiziente oxidative Phosphorylierung zur Gewinnung von ATP nicht mehr gewährleistet. Die daraus

resultierende ATP-Depletierung (Menger et al., 2007) mündet in einem Zusammenbruch energieabhängiger Transportsysteme. Vor allem ist die Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPase durch den ATP-Verlust vermindert. Dies führt zu einer konsekutiven Membrandepolarisation, wodurch spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle geöffnet werden. Es kommt zur Störung der Ionenhomöostase. Daraus resultiert infolge eines Anstiegs der intrazellulären Na⁺- und Ca²⁺-Konzentration (Häussinger D, 1996) und einer konsekutiven Aktivierung hydrolytischer Enzyme (Massip-Salcedo et al., 2007) eine Schwellung von Sinusendothelzellen (SEZ) (Vollmar et al., 1994d; Menger et al., 2007) und Kupfferzellen (KZ). Diese osmotische Zellschwellung bewirkt eine Zellschädigung (Marubayashi 1980, Teoh 2003, Arai 2003). Ödem-assoziiert erhöht sich der interstitielle Druck und das kapilläre Stromgebiet wird eingeengt.

Die Entstehung der Mikrozirkulationsstörung wird außerdem durch ein lokales Missverhältnis zwischen dem vasodilatativen Stickstoffmonoxid (NO) und dem vasokonstriktiv wirkenden Endothelin gefördert (Massip-Salcedo et al., 2007; Menger et al., 2000; Marzi et al., 1994). Auch die Viskosität des Blutes steigt aufgrund der Flüssigkeitsverschiebungen an. Mikrothrombosen resultieren aus Stase und Viskositätsanstieg des Blutes. All diese Faktoren, die untereinander in kausalem Zusammenhang stehen, münden in einer massiven Störung der nutritiven Kapillarperfusion und einer starken Zellschädigung der Leber.

Zur Erzeugung der reversiblen partiellen Ischämie der Leber wird z. B. im Rahmen der Leberresektion das Lig. hepatoduodenale mit den darin verlaufenden arteriellen, portalvenösen und biliären Strukturen für eine definierte Zeit okkludiert (Pringle Manöver). Die Schwere des Leberzellschadens hängt dabei wesentlich von der Dauer der Ischämiezeit ab (Gonzales-Flecha et al., 1993). Eine „warme“ Ischämiezeit von 30-60 min bewirkt einen reversiblen Zellschaden, welcher bei suffizienter Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung rückläufig ist (Blumhardt et al., 1986; González-Flecha et al., 1993; Bismuth et al., 1989). Kommt es erst nach längerer „warmer“ Ischämie von 120-180 min zur Reperfusion, so resultiert daraus eine irreversible Schädigung des Leberzellverbandes (Massip-Salcedo et al., 2007). Diese Beschreibungen decken sich auch mit älteren Berichten anderer Arbeitsgruppen, dass bei 90 min Ischämie der Rattenleber ein sog. *point of no return* des Hepatozyten erreicht ist (Chien et al., 1977).

3.3.3 Reperfusionsschaden der Leber

Lange wurde die Ansicht vertreten, dass nur eine zügig eingeleitete Reperfusion ein zuvor ischämisch geschädigtes Areal vor Folgeschäden schützen kann. In den letzten Jahren konnte jedoch wiederholt gezeigt werden, dass es während der Ischämie zur hypoxiebedingten Schädigung des Hepatozyten kommt, ein signifikanter Anteil der

Schädigung aber auf die Reperfusion zurückzuführen ist (Flaherty JL, 1988, Menger et al., 1992b; Kerrigan et al., 1993).

Der in der Ischämiephase entstandene Gewebeschaden lässt sich mit Zellschwellung, Einschränkung der nutritiven Kapillarperfusion und Entstehung von Mikrothrombosen zusammenfassen. Das Ausmaß des sinusoidalen Perfusionsversagens ist abhängig von der Dauer der Ischämie und führt unter prolongierten hypoxischen Bedingungen zu einem zunehmenden Verlust der hepatozellulären Integrität, womit auch ein zellulärer Funktionsausfall verbunden ist (Menger et al., 1999). So kann es im Verlauf der postischämischen Reperfusionstphase trotzdem zum Sistieren des Blutflusses in einzelnen Sinusoiden kommen. Verantwortlich für dieses sog. *no-reflow*-Phänomen sind unterschiedliche Mechanismen: Sinusoidale Endothelzellschwellung (Menger et al., 1993), intravaskuläre Hämokonzentration (Menger et al., 1988), Imbalance zwischen vasokonstriktorisch (z. B. Endothelin) und vasodilatatorisch (z. B. NO) wirkenden Gefäßmediatoren, die aus verschiedenen Zellverbänden unter Ischämie- und Reperfusionbedingungen freigesetzt werden (Nakamura et al., 1995; Clemens et al., 1997). Nach Beendigung der temporären Gefäßokklusion kommt es nicht zum Wiederereinsetzen der sinusoidalen Perfusion. Die Sauerstoffversorgung bleibt aus und die Hypoxie besteht fort. Der Ischämieschaden wird weiter aggraviert (Menger et al., 1988; Menger et al., 1989; Menger et al., 1992).

Das zweite Phänomen, welches sich während der Reperfusion intravitalmikroskopisch beobachten lässt, ist das sog. *reflow-paradox* (Menger, 1991). Dabei entstehen in zuvor ischämischen Gewebsarealen im Zuge der Reperfusion und damit der Reoxygenierung zusätzliche Schäden. In ihrer Gesamtheit bezeichnet man dies als IRS (Menger, 1999).

Jaeschke und Mitarbeiter teilten den postischämischen Reperfusionsschaden der Leber in zwei zeitlich aufeinander folgende und pathophysiologisch bedeutsame Phasen ein (Jaeschke et al., 1988; Jaeschke et al., 1991a; Jaeschke, 1991b; Jaeschke et al., 1991c): Die frühen und die späten Reperfusionsschäden. Frühe Reperfusionsschäden entstehen in den ersten sechs Stunden nach Reperfusionbeginn und sind von der Aktivierung der KZ geprägt. Die KZ mit ihrer durch I/R induzierte membranständige NADPH-Oxidase gelten als kritische Quelle für reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Jaeschke et al., 1991a). Aber auch andere Enzym- und Zellsysteme werden als Quelle von ROS diskutiert, so z. B. die NADPH-Oxidase der aktivierten polymorphkernigen Granulozyten (PMN) (Metzger et al., 1988; Rymsa et al., 1991), die intrazellulär vorkommende Xanthinoxidase (Adkinson et al., 1986; Marzi et al., 1989) oder die Mitochondrien (Jaeschke et al., 1989; Gonzales-Flecha et al., 1993). Jedoch steht in Studien die pathophysiologisch bedeutende Rolle der KZ für den vaskulären oxidativen Stress während der Reperfusion im Vordergrund (Jaeschke H, 1991a; Liu et al., 1995). Entsprechend bewirkt die Depletion der KZ durch Gabe von

Gadoliniumchlorid und Methylpalmitat eine Protektion gegenüber dem postischämischen Reperfusionsschaden.

Die im oxidativen Stoffwechsel gehäuft frei werdenden ROS haben eine toxische Wirkung. Beispielsweise werden Membranstrukturen durch Lipidperoxidation (LPO) angegriffen und dadurch Gewebeschäden induziert (McCord et al., 1985; Jaeschke et al. 2006). Zu den zentralen Effekten von ROS gehören die Schädigung von Biomolekülen (Proteine, Lipide) und die Aktivierung von NF- κ B. Wird dieser als Transkriptionsfaktor in den Zellkern transloziert, bewirkt er eine Transkriptionssteigerung, v. a. für proinflammatorische Zytokine (z.B. PAF, TNF- α), CXC-Chemokine (z. B. IL-8) und Adhäsionsmoleküle (Jaeschke et al., 1995; Jaeschke et al., 2006). Dabei kommt den KZ wieder eine zentrale Bedeutung zu, denn sie bilden während der initialen Reperusionsphase außerdem proteolytische Enzyme und verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie z. B. TNF- α , IL-1, IL-6 und PAF.

Des Weiteren kommt es in der frühen Schadensphase zu einer Leukozytenaktivierung (Jaeschke H et al., 1990), welche u. a. auf die Zytokine zurückgeführt werden kann. TNF- α , IL-1, Komplementfaktoren (C_{5a}) und PAF sind potente Mediatoren der Neutrophileninvasion in die Leber (Schlayer et al., 1988; Bautista et al., 1992; Jaeschke et al., 1996; Essani et al., 1995). TNF- α und C_{5a} bewirken ebenfalls eine Hochregulation des Adhäsionsmoleküls Mac-1 (CD11b/CD18). TNF- α und IL-1 sind des Weiteren starke Aktivatoren von Transkriptionsfaktoren und einer großen Anzahl proinflammatorischer Gene für z. B. Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Zu diesen „Lockstoffen“, den sog. CXC-Chemokinen, gehört u. a. das IL-8 (Luster AD, 1998). In der initialen Phase der Reperfusion kommt es zur massiven Rekrutierung von Leukozyten in die Leber, die dann das Ausmaß der späteren Reperusionsphase maßgeblich bestimmen.

Nach der initialen, durch KZ dominierten, postischämischen Reperusionsphase beginnt erst einige Stunden später die durch PMN bedingte Schädigung der Leber. Jaeschke und Mitarbeiter beschrieben diese zweite Schädigungsphase nach über sechs Stunden (Jaeschke H, 1998).

Die Adhärenz der Leukozyten am hepatischen Endothel wurde in zahlreichen intravitalmikroskopischen Studien untersucht. Die initial lockere Endothelzell-Leukozyten-Interaktion wird als *rolling* bezeichnet und ist definiert als Margination, Endothelkontakt und verminderte Fließgeschwindigkeit der Leukozyten gegenüber dem Blutstrom (Menger et al., 1992b). Vermittelt wird dieser erste Schritt über Selektine (L-Selektin auf den Leukozyten, P-Selektin auf den Endothelzellen; Granger et al., 1994). Die darauf folgende festere Bindung zwischen hepatischem Endothel und Leukozyten wird als *sticking*, der fest am Endothel haftende Leukozyt als *adhärent* bezeichnet (Menger et al., 1992b).

Zusätzlich spielen auch andere Mechanismen für die Leukozytenadhärenz eine Rolle, wie Zellschwellung (Vollmar et al., 1995), inflammatorische Prozesse in den postsinusoidalen

Gefäßen (McCuskey et al., 1996), Bildung vasokonstriktorisch wirkender Substanzen (Bauer et al., 1994) und verringerte Verformbarkeit der Neutrophilen unter dem Einfluß von proinflammatorischen Mediatoren (Worthen et al., 1989). Den Abschluss der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion stellt die Emigration der Leukozyten ins perivaskuläre Gewebe dar. Die Leukozyten benötigen vor allem β_2 -Integrin für die Interaktion mit dem Interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) (Essani et al., 1995; Vollmar et al., 1995; Jaeschke et al., 1996a; Jaeschke et al., 1997) und das Zelladhäsionsmolekül VCAM-1 zusammen mit β_1 -Integrin (Essani et al., 1997; Jaeschke et al., 1997). ICAM-1 ist dabei jeweils auf SEZ und KZ exprimiert, jedoch nicht auf Hepatozyten. ICAM-1 kann aber auf allen Leberzelltypen hochreguliert werden. Als potenteste Stimuli gelten dafür die Zytokine TNF- α , IL-1 und IFN- γ (Jaeschke H, 1997). Dagegen ist VCAM-1 nicht auf Leberzellen exprimiert, kann transkriptionell aber auf SEZ und KZ hochreguliert werden (Essani et al., 1997).

Zur Migration der Neutrophilen ist ein chemotaktischer Gradient, gebildet durch die oben beschriebenen CXC-Chemokine, notwendig. Hepatozyten können von diesen sog. Lockstoffen große Mengen bilden und somit eigenständig einen chemotaktischen Gradienten für die Leukozytentransmigration aufbauen. Auch kommt es durch Lipidperoxidation mit Angriff hepatozellulärer Membranstrukturen zur Ausbildung eines chemotaktischen Gradienten. Dieser entsteht jedoch erst wenn proinflammatorische Mediatoren bereits abgebaut sind (Liu et al., 1994). Die adhärenenten Leukozyten verlassen unter Ausbildung von Pseudopodien und unter Umorganisation ihres Zytoskeletts sowie ihrer Membranfluidität das Gefäßbett und gelangen so in das perivaskuläre Gewebe. Dabei kommt es zur Freisetzung von ROS und Proteasen (z. B. Elastase, Kollagenase, Kathepsin G) durch die Leukozyten. Daraus folgt eine konsekutive Schädigung der Hepatozyten (Mavier et al., 1988). Die freigesetzten ROS dienen unter anderem zur Inaktivierung von Anti-Proteasen im Plasma (Mavier et al., 1988).

4. ZIELSETZUNG

Ziel der hier vorliegenden experimentellen Studie war die Klärung der Frage, ob und in welchem Ausmaß das mitochondriale Protein UCP2 Einfluß auf die Entwicklung des IRS der Leber nimmt.

Die hepatische Mikrozirkulation wurde *in vivo* mittels Intravitalmikroskopie (IVM) untersucht. Komplottiert wurde die Studie durch laborchemische, histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Analysen.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Ist die UCP2-Defizienz hinsichtlich der mikrozirkulatorischen Veränderungen nach I/R von Bedeutung?
2. Hat die UCP2-Defizienz einen erkennbaren Einfluß auf die hepatozelluläre Apoptose und Nekrose? Es konnte bisher gezeigt werden, dass sowohl der apoptotische als auch der nekrotische Zelltod bei hepatischer I/R eine Rolle spielt.
3. Nimmt UCP2 Einfluß auf den hepatozellulären Energiemetabolismus? Wenn ja, was bedeutet das für die Entwicklung und die Ausprägung des IRS?
4. Spielt das mitochondriale Protein UCP2 eine Rolle für den oxidativen Stress? Ein grundlegender Pathomechanismus des IRS beruht auf der Bildung toxischer Sauerstoffradikale.
5. Wirkt sich die UCP2-Defizienz auf die Ausprägung des hepatischen IRS aus?

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Versuchstiere

Als Kontrolltiere dienten männliche C57BL/6J Mäuse (Wildtyp, UCP2 +/+) mit einem Alter von 8-12 Wochen und einem Gewicht von 25-30 g (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland). Zur Analyse der Bedeutung des mitochondrialen UCP2-Gens wurden männliche UCP2-defiziente Mäuse (UCP2 -/-) im Alter von 8-16 Wochen und einem Gewicht von 25-35 g (Institut für Experimentelle Chirurgie, Zentrale Versuchstierhaltung, Universität Rostock) verwendet, die neben dieser Mutation den gleichen genetischen Hintergrund wie die Wildtypmäuse besitzen. Beide Mausarten wurden in einem 12 Stunden dauerndem Hell-Dunkel-Zyklus und unter Bereitstellung von Standardfutter für Nager (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser *ad libitum* gehalten. Sämtliche Tierversuche wurden nach Genehmigung durch die Tierschutzbehörde entsprechend dem Tierschutzgesetz und der Nutzerordnung für die Zentrale Versuchstierhaltung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock durchgeführt.

5.2 Modell

5.2.1 Narkose

Die Versuchstiere wurden mittels i. p. Injektion von 90 mg/kg KG Ketamin[®] (Ketamin, Betapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland) und 25 mg/kg KG Xylazin (Rompus[®], Bayer Vital GmbH, Bayer Health Care, Deutschland) narkotisiert. Nach Entfernung der Haare der Hals- und Abdominalregion durch Elektrorasur (AESLAP[®] Favorita II, Aesculap AG & Co. KG, Tuffingen, Deutschland) wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch mit integrierter Heizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing, Deutschland) positioniert, um eine konstante Körpertemperatur von 36-37°C über den gesamten Versuchszeitraum zu gewährleisten.

5.2.2 Chirurgische Präparation

Als erster Schritt erfolgte die chirurgische Präparation der rechten V. jugularis externa unter einem Stereomikroskop (Leica M651/M655, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Schweiz). Nach paratrachealer Längsinzision und Lösung des subkutanen Fettgewebes wurde die V. jugularis externa freigelegt. Der Polyethylenkatheter (PE 50, 0,28 mm Innendurchmesser, 0,61 mm Außendurchmesser, Smiths Medical International Ltd., Kent, UK) wurde nach Gefäßinzision in die V. jugularis externa eingeführt, etwa 0,5 cm nach kaudal vorgeschoben und mittels vorher gelegter Ligatur am Gefäß fixiert. Der Katheter

wurde später zur i. v. Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen, zur Steuerung der Anästhesie und zur Volumensubstitution genutzt.

Nach medianer Laparotomie erfolgte beidseitig je ein Flankenschnitt auf Höhe des Rippenbogens, um einen idealen Zugang zur Leber zu schaffen. Der obere Teil der Bauchhaut wurde in kraniale Richtung durch zwei Hacken gehoben. Der linke Leberlappen wurde vorsichtig von seinen Haltebändern zum Zwerchfell, zum Magen und zum Retroperitoneum gelöst, sodass der Hilus mit linker Leberarterie, Gallengang und Portalvene sichtbar wurde. Zur Induktion der Ischämie des linken Leberlappens wurden diese Gefäße am Hilus mit einem Gefäßclip (Mikroclip) für 30 min vollständig okkludiert. Die offene Bauchhöhle wurde während dieser Zeit mit warmer physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten und mit Kompressen abgedeckt.

Nach 30 min Ischämie wurde mit Hilfe eines Cliphalters vorsichtig der Mikroclip von den Gefäßen am Hilus des linken Leberlappens gelöst. Es schlossen sich 60 min Reperfusion an.

Im Anschluss an die Reperfusionszeit wurde der linke Leberlappen zur IVM vorbereitet. Dafür wurde die Unterseite des linken Leberlappens im Uhrzeigersinn nach oben gedreht und auf einer löffelförmigen Knethalterung positioniert. Die anatomische Unterseite (nun Oberseite) wurde mit einem Deckglas (Durchmesser 12 mm) für die IVM abgedeckt. Die Oberfläche der restlichen Leber wurde mit warmer physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet und mit einer sauerstoffimpermeablen Folie abgedeckt, um sie vor Austrocknung und der Exposition gegenüber atmosphärischem Sauerstoff zu schützen. Die anderen offen liegenden Abdominalorgane wurden ebenfalls mit in Kochsalzlösung getränkten Kompressen abgedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Im Anschluß daran erfolgte die IVM.

Scheinoperierte Tiere (Sham) wurden nach gleichem Protokoll identisch operiert, d. h. venöse Gefäßkanülierung, mediane Laparotomie, beidseitiger Flankenschnitt und kurze Manipulation an den Gefäßen des Hilus des linken Leberlappens, ohne jedoch I/R zu induzieren. Es schloss sich ebenfalls die IVM an.

5.3 Methoden

5.3.1 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie

Störungen der Mikrozirkulation spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und der Manifestation des postischämischen Reperfusionsschadens der Leber. Die direkte Beobachtung der hepatischen Mikrozirkulation ermöglicht es, die verantwortlichen Mechanismen des IRS zu erforschen und zu verstehen. Die Technik der Epi-Illumination, mit der alle intravitalemikroskopischen Analysen dieser Studie durchgeführt wurden, ist heutzutage die Methode der Wahl, das hepatische Gefäßsystem und die Mikrozirkulation

sichtbar zu machen. Neben der mikrovaskulären Perfusion lassen sich ebenso Leukozytenakkumulation, Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, morphologische Veränderungen der Hepatozyten und viele andere dynamische Parameter visualisieren (Menger et al., 1991; Vollmar und Menger, 1998; Menger et al., 1999; Vollmar und Menger, 2009).

5.3.1.1 Grundprinzipien der Fluoreszenz

Der Name Fluoreszenz ist von dem fluoreszierenden Mineral Fluorit (Calciumfluorid, CaF_2) abgeleitet und wurde 1852 erstmals von George Gabriel Stokes beschrieben. Unter Fluoreszenz versteht man im Allgemeinen die kurzzeitige Lichtemission durch Atome oder Moleküle, die durch Absorption energiereicher Strahlen angeregt wurden. Bei der Absorption von Licht einer bestimmten Wellenlänge (=Anregungslicht) ist bei verschiedenen Molekülen eine gleichzeitige Emission von Licht mit höherer Wellenlänge beobachtbar. Dieses Verhalten (Absorption von kurzwelligem Licht, Emission von längerwelligem Licht) wird als Fluoreszenz bezeichnet. Fluorophore sind fluoreszierende Stoffe. Absorbieren diese in ihrem Grundzustand (S_0) Licht einer bestimmten Wellenlänge, so gehen sie in einen aktivierten Zustand (S_1) über, gelangen also auf ein höheres Energieniveau. Der angeregte Fluorophor verweilt nach der Absorption eine bestimmte Zeit im angeregten Zustand. Diese Zeit wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und beträgt zwischen 0,5 und 20 Nanosekunden. Bei der Rückkehr in den Grundzustand wird die aufgenommene Anregungsenergie wieder freigesetzt. Einerseits kann dies in Form von Wärme oder Schwingungsrelaxation geschehen, andererseits kann sie auch durch Emission von Fluoreszenzlicht abgegeben werden. Einfach dargestellt heißt dies:



hv steht dabei für die Anregungsenergie, h für das Plancksche Wirkungsquantum und v für die Frequenz einer elektromagnetischen Strahlung.

5.3.1.2 Technischer Aufbau

Bei der IVM wird die Aufsichtfluoreszenzmikroskopie (Epi-Illumination) von der Durchlichtfluoreszenzmikroskopie (Trans-Illumination) unterschieden. Die Epi-Illumination weist im Vergleich zur Trans-Illumination eine höhere Sensitivität auf (Zacharakis et al., 2005).

Das über die Lichtquelle und den Anregungsfilter einfallende Licht trifft auf den dichromatischen Strahlteiler. Dieser bewirkt die exakte Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht. Das Anregungslicht reflektiert an der Oberfläche des dichromatischen Strahlteilers in Richtung Objektiv, wohingegen das Fluoreszenzlicht durch den dichromatischen Strahlteiler zum Okular bzw. zum Videoaufzeichnungssystem gelangt (Abb. 4).

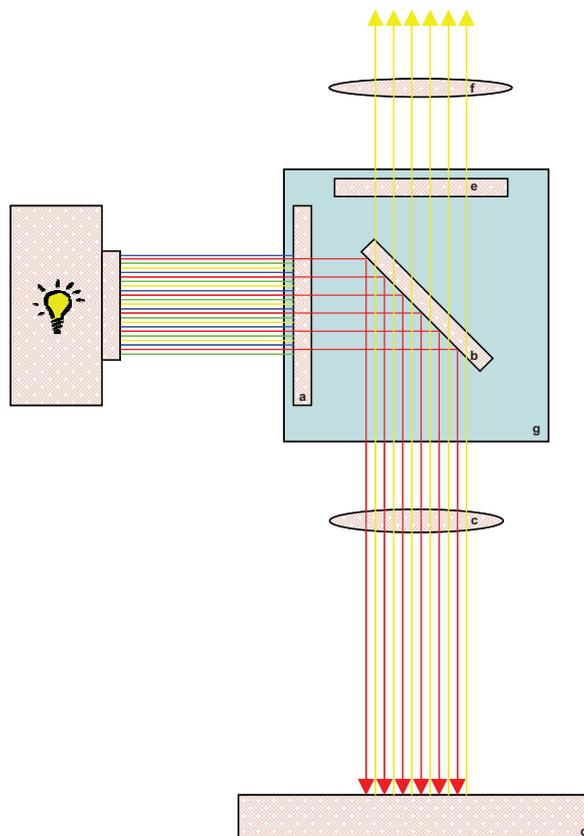


Abbildung 4. Schematischer Aufbau der Aufsichtfluoreszenzmikroskopie. **a** Anregungsfilter, **b** Dichromatischer Strahlteiler, **c** Objektiv, **d** Präparat, **e** Sperrfilter, **f** Okular, **g** Filterblock

Neben dem Anregungsfilter und dem dichromatischen Strahlteiler ist der Sperrfilter der dritte Bestandteil des Filterblocks, durch welchen nur Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs durchtreten soll.

In der hier vorliegenden Studie wurden drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe für die Darstellung der hepatischen Mikrozirkulation verwendet: Natriumfluoreszein, Rhodamin 6G und Bisbenzimid.

Natriumfluoreszein ($C_{20}H_{12}Na_2O_2$; MG 376 g/mol) wird von den Hepatozyten aufgenommen und akkumuliert im Zytoplasma. Wird diese Region mit blauem Licht der Wellenlänge 450-490 nm angeregt, so fluoresziert das Natriumfluoreszein mit einer Wellenlänge von 530-540 nm. Die dadurch erreichte Kontrastverstärkung zwischen den Lebersinusoiden (dunkel) und den Hepatozyten (hell) ermöglicht die *in vivo* Untersuchung der Perfusion innerhalb der hepatischen Sinusoide (Vollmar et al., 1994a, Vollmar et al., 2002)

Rhodamin 6G ($C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$; MG 479 g/mol) wird zur *in vivo* Kontrastierung der Leukozyten angewandt. Rhodamin 6G akkumuliert in Abhängigkeit zum Membranpotential in den Mitochondrien der Leukozyten. Erfolgt die Anregung nun mit Licht einer Wellenlänge zwischen 530 und 560 nm, so fluoresziert Rhodamin 6G mit einer Wellenlänge von 580 nm. Dadurch lassen sich die Leukozyten visualisieren und es ist möglich, ihr Fließverhalten in den Sinusoiden und in den postsinusoidalen Venolen zu analysieren (Vollmar et al., 1994c).

Bisbenzimid H 33258 ($C_{25}H_{24}N_6O \cdot 3HCl$; MG 534 g/mol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach Aufnahme durch die Hepatozyten in den DNA-Doppelstrang integriert wird. Bei einer Stimulation mit Anregungslicht einer Wellenlänge von 330-380 nm fluoresziert Bisbenzimid mit einer Wellenlänge über 414 nm.

5.3.1.3 *Aufbau und Leistung des Intravitalmikroskops*

Für die intravitalmikroskopische Untersuchung des linken Leberlappens wurde ein Zeiss-Fluoreszenzmikroskop mit einer 100 W Quecksilberdampflampe als Lichtquelle verwendet. Es standen verschiedene Filter für blaues, grünes und UV-Licht (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Deutschland) zur Verfügung. Alle Untersuchungen wurden in Epi-Illuminationstechnik durchgeführt. Die mikroskopische Darstellung der sinusoidalen Perfusion (x20/0,50W, Zeiss), der Leukozyten-Endothellzell-Interaktion (x20/0,50W, Zeiss) und der hepatozellulären Apoptose (x40/0,8W, Zeiss) erfolgte mit einem Wasserimmersionsobjektiv.

Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mittels einer *charge-coupled device* (CCD)-Videokamera (FK 6990/AIQ, Pieper, Berlin, Deutschland) digital konvertiert und durch einen VHS-Videorekorder (Fuji magnetic GmbH, Kleve, Deutschland) aufgezeichnet, um die Daten zu einem späteren Zeitpunkt auszuwerten (Eipel et al., 2004; Eipel et al., 2005). Der Untersuchungszeitpunkt wurde durch Zwischenschaltung eines Videotimers (Fora video timer, Modell VTG33, Fora company limited, Japan) dokumentiert (Abb. 5).

Den ersten Schritt der IVM stellte stets die Untersuchung der sinusoidalen Perfusion dar. Nach i.v. Applikation von Natriumfluoreszein ($2 \mu\text{mol/kg KG}$; Merck, Darmstadt, Deutschland) erfolgte die Mikroskopie unter blauem Licht (Epi-Illumination; $450\text{-}490/\text{>}520 \text{ nm}$ Wellenlänge Anregungslicht/Fluoreszenzlicht) (Eipel et al., 2004). Bei jedem Tier wurden zehn randomisiert ausgewählte Leberazini aufgesucht und für jeweils 20 Sekunden aufgezeichnet. Im zweiten Schritt der IVM wurden die Leukozyten *in vivo* mittels Rhodamin 6G ($1 \mu\text{mol/kg KG}$; Merck) und grünem Licht (Epi-Illumination, $530\text{-}560/580 \text{ nm}$) untersucht. Wieder wurden zehn Leberazini mit gut sichtbaren postsinusoidalen Venolen aufgezeichnet (Eipel et al., 2004). Abschließend erfolgte die Beobachtung der hepatozellulären Apoptose nach intravenöser Applikation von Bisbenzimid ($2 \mu\text{mol/kg KG}$, Sigma-Aldrich) und UV-Licht. Es erfolgte erneut die Videoaufzeichnung von zehn randomisierten Leberazini für 20 Sekunden.

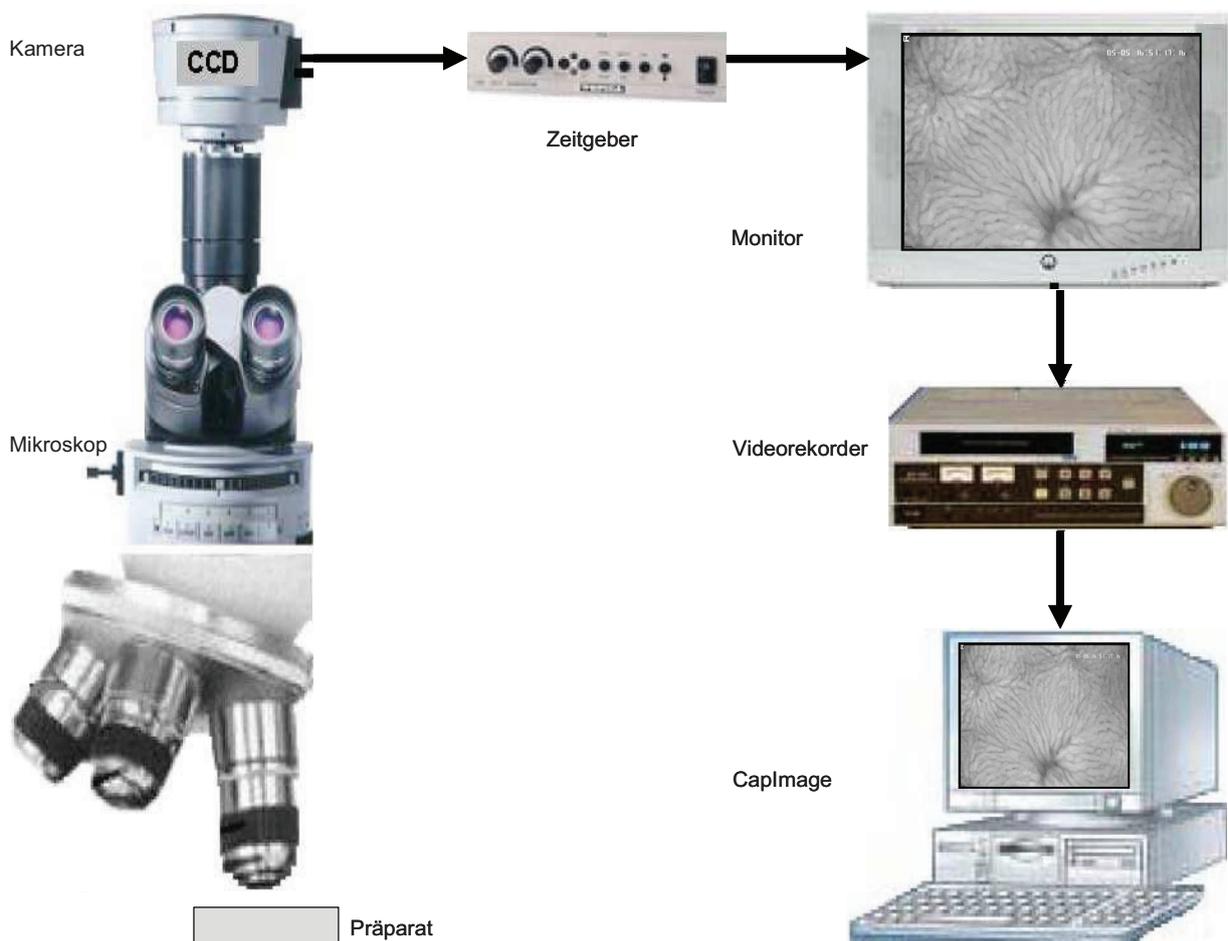


Abbildung 5. Schematischer Versuchsaufbau der IVM. Die hepatische Mikrozirkulation (*in vivo*-Aufnahme in Form des Präparates) wurde mit Hilfe einer CCD-Videokamera auf einem Monitor visualisiert und gleichzeitig auf Videoband aufgezeichnet. Der eingblendete Zeitgeber ermöglichte die exakte Analyse der Daten mit einem digitalen Bildanalysestems (CapImage) zu einem späteren Zeitpunkt.

5.3.1.4 Mikrozirkulatorische Parameter

Die während der IVM aufgezeichneten Videobänder wurden später *off-line* mit Hilfe eines *Computer Assisted Analyse Microcirculation System*[®] an einem 19" Monitor ausgewertet (CapImage; Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Die Analyse erfolgte entweder bei einer 424-fachen Vergrößerung (sinusoidale Perfusion und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion) oder bei einer 823-fachen Vergrößerung (hepatozelluläre Apoptose).

5.3.1.4.1 Sinusoidale Perfusion

Die sinusoidale Perfusion wurde gemäß der zonalen Gliederung der Leber analysiert. Dabei wurde eine 200 µm lange Linie rechtwinklig midzonal über die Sinusoide gelegt und die Anzahl der nichtperfundierten Gefäße gezählt. Die nichtperfundierten Sinusoide eines jeden einzelnen Gesichtsfeldes wurden prozentual ins Verhältnis zu allen sichtbaren Sinusoiden gesetzt. Daraus ergibt sich die nutritive Perfusion der Leber (Abb. 6 A).

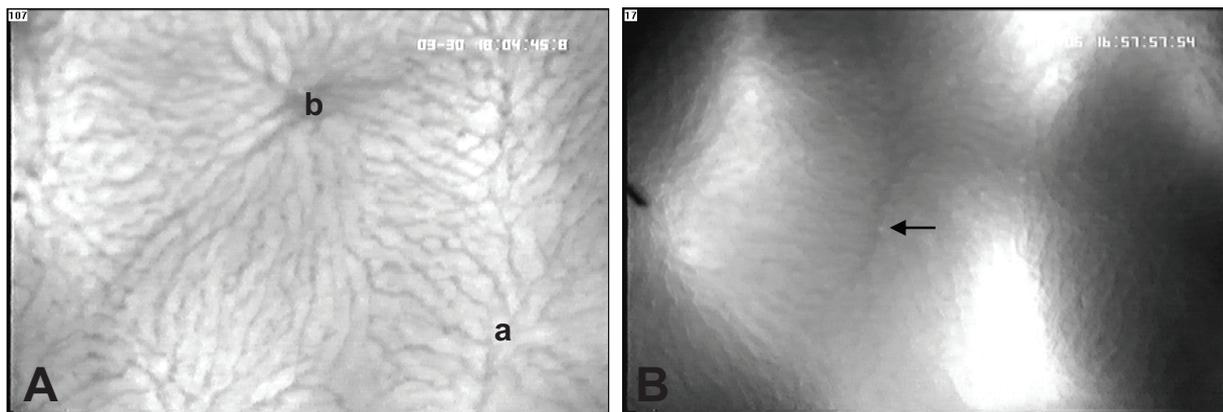


Abbildung 6. Repräsentative Aufnahmen der hepatischen Mikrozirkulation. Abb. 6 A zeigt die sinusoidale Perfusion der Leber unter Epi-Illumination mit blauem Licht und Gabe von Natriumfluoreszein (a: Periportalfeld; b: Perizentralfeld). Abb. 6 B zeigt die sinusoidale Leukozytenstase der Leber unter Epi-Illumination mit grünem Licht und Gabe von Rhodamin 6G (Pfeil). Originalvergrößerung x424.

5.3.1.4.2 Sinusoidale Leukozytenstase

Die Visualisierung der Leukozyten erfolgte mit Hilfe deren Färbung mit Rhodamin 6G. Für 20 Sekunden wurden die sinusoidal stagnierenden Leukozyten eines Leberazinus gezählt (Abb. 6 B) und als Zellen/Gesichtsfeld (n/mm^2) definiert.

5.3.1.4.3 Venuläres Leukozytenrolling und venuläre Leukozytenadhärenz

Um den Durchmesser (d , μm) und die Länge (l , μm) der postsinusoidalen Venolen exakt bestimmen zu können, wurden diese zuerst unter Epi-Illumination mit Blaulicht und Natriumfluoreszein-Färbung aufgenommen (Abb. 7 A) und danach unter Epi-Illumination mit grünem Licht und Gabe von Rhodamin 6G analysiert. Unter der Annahme, dass die betrachtete endotheliale Fläche (A) geometrisch einem Zylinder entspricht, errechnet sich diese nach folgender Formel:

$$A = d \cdot l \cdot \pi / 10^6 \text{ (mm}^2\text{)}$$

Leukozyten, die sich über einen Zeitraum von ≥ 20 Sekunden nicht bewegten, wurden als adhärenz definiert und als adhärenz Leukozyten pro Gefäßendothelfläche (n/mm^2) angegeben (Abb. 7 B).

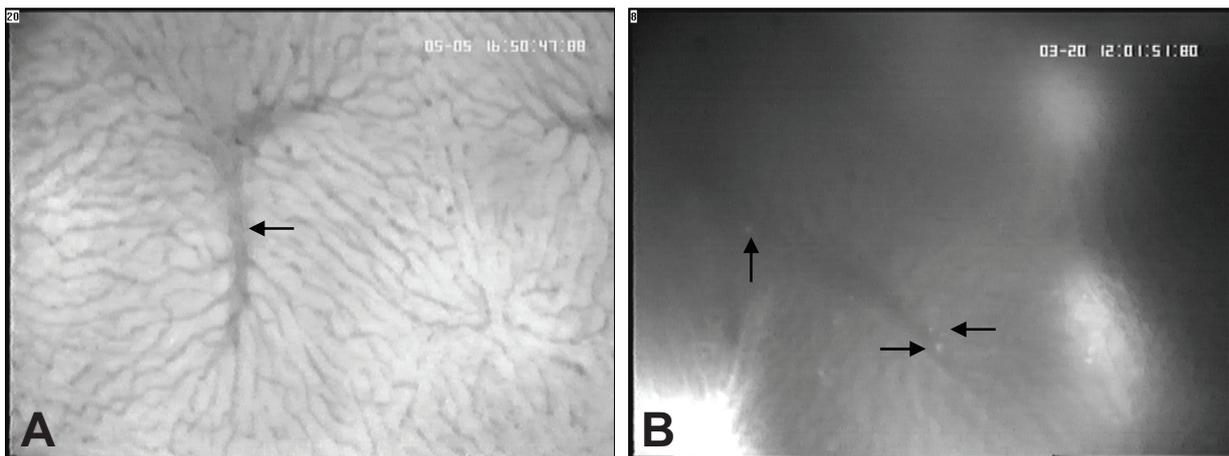


Abbildung 7. Repräsentative Aufnahmen der hepatischen Mikrozirkulation. Abb. 7 A zeigt eine postsinusoidale Venole (Pfeil) der Leber unter Epi-Illumination mit blauem Licht und Gabe von Natriumfluoreszein. Abb. 7 B zeigt einige in der postsinusoidalen Venole der Leber adhärenz Leukozyten (Pfeile) unter Epi-Illumination mit grünem Licht und Gabe von Rhodamin 6G. Originalvergrößerung x424.

Leukozyten, die sich in postsinusoidalen Venolen mit einer Geschwindigkeit von weniger als zwei Fünftel der Zentralstromgeschwindigkeit am Endothel entlang bewegten, wurden als rollende Zellen definiert (Vollmar et al., 2002). Die Gesamtzahl der durch die postsinusoidalen Venolen fließenden Leukozyten und die Anzahl der rollenden Zellen wurden über 15 Sekunden gezählt. Der Anteil der rollenden an allen sich bewegenden Leukozyten wurde in Prozent angegeben.

5.3.1.4.4 Hepatozelluläre Apoptose

Nach i. v. Applikation von Bisbenzimid und unter UV-Epi-Illumination konnten die Zellkerne der Hepatozyten visualisiert werden. Die apoptotischen Kerne waren dabei deutlich heller und zeigten die typischen morphologischen Veränderungen der Apoptose (Kondensation, Fragmentation und Randständigkeit des nukleären Chromatins) oder die Ausbildung von Apoptose-Körperchen (Abb. 8 B). Die apoptotischen Hepatozyten wurden gezählt und als Anzahl pro Fläche wiedergegeben (n/mm^2).

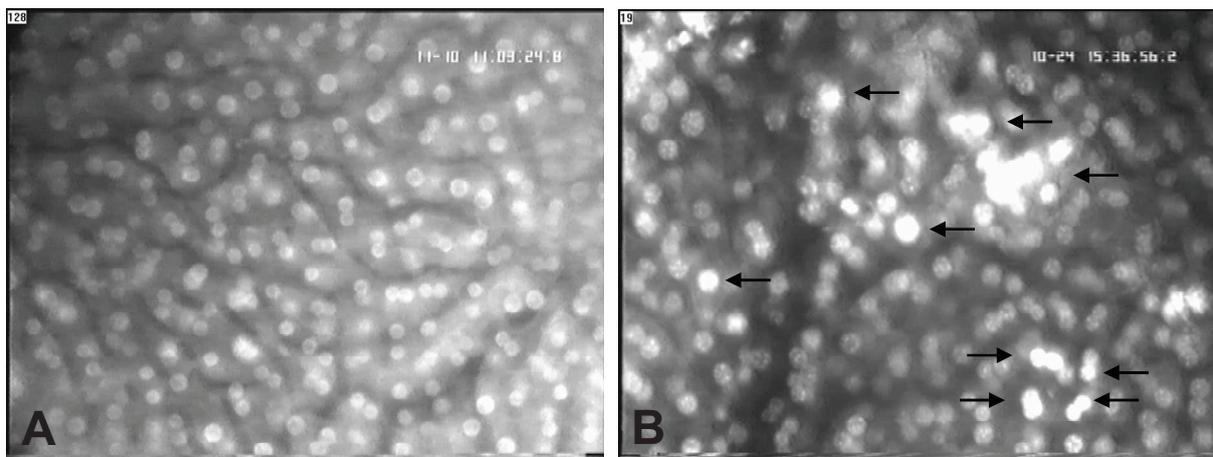


Abbildung 8. Repräsentative Aufnahmen von Leberparenchym unter UV-Epi-Illumination und Gabe von Bisbenzimid. Abb. 8 A zeigt Hepatozyten mit regulärer Kernmorphologie. Abb. 8 B zeigt Leberparenchym nach I/R mit der Ausbildung apoptotischer Hepatozyten (Pfeile). Originalvergrößerung x823.

5.3.2 Blutbild und Laborchemie

Im Anschluss an die IVM wurde bei allen Versuchstieren durch Punktion der V. cava inferior ca. 1 ml Vollblut entnommen und in EDTA-beschichteten Probengefäßen gesammelt. Nach quantitativer Blutzellanalyse erfolgte die Zentrifugation des Blutes bei 3800 U/min über 10 min in einer GS15-Zentrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und bei -20°C für spätere laborchemische Analysen asserviert. Die Leber wurde *en bloc* entfernt, gewogen, geteilt und ein Teil in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für spätere molekularbiologische Verfahren bei -80°C aufbewahrt. Der andere Teil wurde für zwei bis drei Tage in 4% Formalin für anschließende histologische bzw. immunhistochemische Verfahren fixiert.

Das Blutbild wurde durch den automatischen Blutbildanalysator Sysmex KX21 (Sysmex Corporation, Japan) ermittelt. Es beinhaltete die quantitative Bestimmung von Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozyten-Gesamtzahl, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten. Alle Werte sind gemäß dem SI-System in Internationalen Einheiten angegeben.

Die Aktivität der leberspezifischen Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT/GPT) und Aspartat-Aminotransferase (AST/GOT) im Plasma diente als Indikator für den hepatozellulären Schaden. Zusätzlich wurde die Enzymaktivität der Glutamatdehydrogenase (GLDH) spektrophotometrisch ermittelt (Hitachi 704, Boehringer, Mannheim, Deutschland) und den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie in U/L angegeben. Alle benötigten Reagenzien stammten vom gleichen Hersteller (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland).

Zur Messung der plasmatischen Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 wurden kommerziell erhältliche *enzyme-linked immunosorbent assay kits* (ELISA) gemäß den Herstellerangaben (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) verwendet.

5.3.3 Histologie und Immunhistochemie

Das gewonnene Lebergewebe wurde zunächst für zwei bis drei Tage in 4% Formalin fixiert. Nach der Paraffineinbettung wurden mittels eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte gefertigt. Es folgte die Färbung mit Hämatoxylin & Eosin (H&E) und die lichtmikroskopische Analyse der Präparate. Als morphologische Korrelate des nekrotischen Zellschadens im histologischen Bild galten Vakuolisierung und Zellschwellung der Hepatozyten mit Membranruptur und Karyolyse. Abbildung 9 zeigt die Gegenüberstellung der physiologischen Balkenstruktur der Leber (A) und der nekrotischen Areale (B). Betrachtet wurden pro Präparat 50 fortlaufende Gesichtsfelder. Die Anzahl der mikroskopischen Gesichtsfelder (Objektiv x40/ numerische Apertur 0,65) mit mindestens einem nekrotischen Areal wurden ins Verhältnis zu 50 Gesichtsfeldern gesetzt und als Nekrose-positive Gesichtsfelder/50 Gesichtsfelder angegeben.

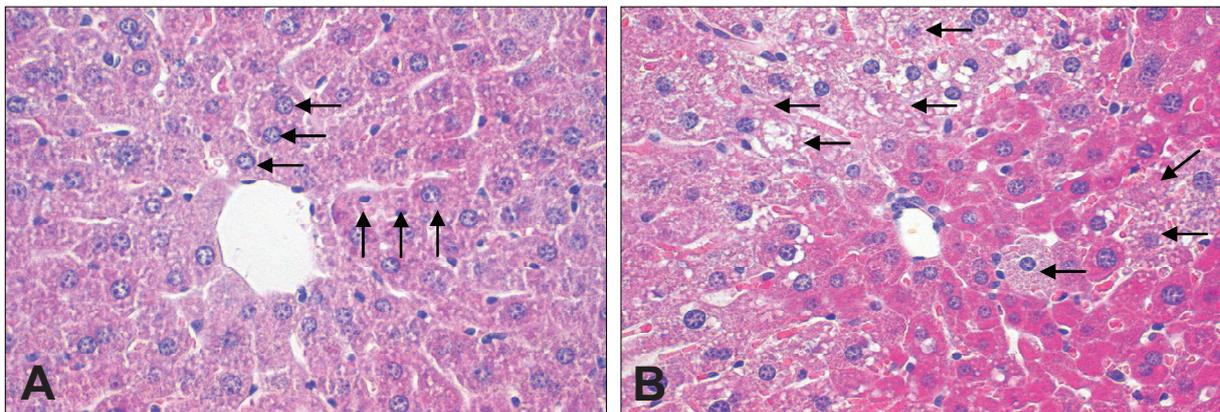


Abbildung 9. Repräsentative Abbildungen von Leberparenchym. Abb. 9 A zeigt die physiologische Balkenstruktur der Hepatozyten (Pfeile). Abb. 9 B zeigt Leberparenchym nach I/R mit nekrotischen Hepatozyten (Pfeile). Originalvergrößerung x400.

Die angefertigten Schnitte wurden zusätzlich für die Untersuchung der cleaved Caspase-3, einer Effektorcaspase im Signalweg der Apoptose, immunhistochemisch aufgearbeitet. Diese Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit einem polyklonalen cleaved Caspase-3-Antikörper (rabbit polyclonal cleaved caspase-3 antibody, 1:500; 9661 Lot 15; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Dieser Antikörper ist in der Lage, das große Fragment der aktivierten Caspase-3 (17/19 kD), nicht aber die Caspase-3 in voller Länge zu detektieren (Bordel et al., 2006). Als Sekundärantikörper wurde anschließend ein Peroxidase-konjugierter Antikörper (1:20; HRP; P 0448; DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) verwendet. Als Chromogen zum Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion diente 3,3' Diaminobenzidin (S 3000; DakoCytomation). Die Gegenfärbung erfolgte mit

Hämalaun. Cleaved Caspase-3-positive Hepatozyten wurden mit dem x40 Objektiv gezählt und als apoptotische Zellen pro Gesichtsfeld (n/GF) angegeben (Abb. 10 B).

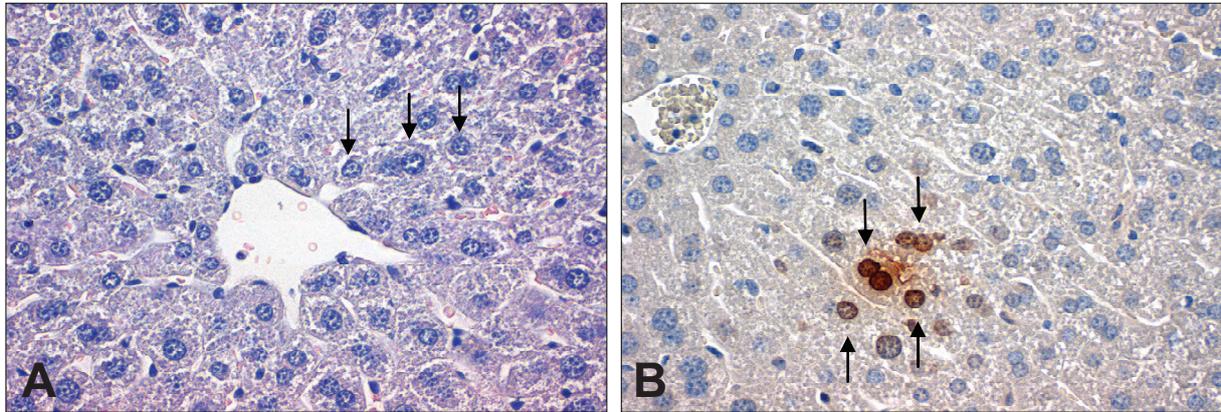


Abbildung 10. Repräsentative Abbildung von Leberparenchym nach Immunhistochemie für cleaved Caspase-3. Abb. 10 A zeigt die physiologische Balkenstruktur der Hepatozyten mit Fehlen apoptotischer Zellen (Pfeile). Abb 10 B zeigt Leberparenchym nach I/R mit einzelnen cleaved Caspase-3-positiven Hepatozyten (Pfeile). Originalvergrößerung x400.

5.3.4 Western Blot Protein Analyse

Mittels Western Blot wurde die Proteinexpression der cleaved Caspase-3, der phosphorylierten endothelialen NO-Synthase (phospho-eNOS) und des *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) im Lebergewebe bestimmt. Dazu wurde Lebergewebe in einem Lysepuffer (10 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 0,02% NaN₃; 0,2 mM PMFS) mit vorher zugeführtem Proteaseinhibitorcocktail (1:100 v/v; Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 15 Minuten bei 10000 U/min zentrifugiert. Nachfolgend wurde der Überstand gewonnen. Hieraus wurde unter Verwendung des Bicinchoninic Säure Protein Assay (bicinchoninic acid BCA; Sigma Aldrich) und Rinderserumalbumin als Standard die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt. Darauffolgend wurden auf einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gel (12 %) jeweils 60 µg Protein pro Spur (cleaved Caspase-3 und eNOS) bzw. 20µg Protein pro Spur (PCNA) elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und danach auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Immobilon-P, Millipore, Esschborn, Deutschland) übertragen. Nach Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurden die Membranen für 120 min bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Als Primärantikörper für die Bestimmung von cleaved Caspase-3 (rabbit polyclonal anti cleaved Caspase-3, 1:1000, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland), von PCNA (rabbit polyclonal anti

PCNA, 1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) und von eNOS (rabbit polyclonal anti eNOS (1:500; Cell Signaling Technology) dienten Antikörper aus dem Kaninchen. Anschließend wurden die Membranen für 90 min bei Raumtemperatur mit den Sekundarantikörpern (peroxidase-conjugated goat anti rabbit antibodies, cleaved Caspase-3: 1:2000, PCNA 1:8000 und eNOS 1:2500, Cell Signaling Technology; Sigma Aldrich) inkubiert. Die Proteinexpression wurde mittels Chemilumineszenzmethode (ECL plus, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und Autoradiographie auf einem blaulichtempfindlichem Röntgenfilm (Kodak BioMax Light Film, Kodak-Industrie, Chalon-sur-Saone, Frankreich) sichtbar gemacht. Die Auswertung der Signale erfolgte densitometrisch (Quantity One, Gel Doc XR, Bio- Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) und wurde gegenüber den β -Aktin Signalen normiert (monoklonale Maus anti β -Aktin Antikörper, 1:20000, Sigma Aldrich).

5.3.5 Analyse des metabolischen Energiestatus

Zur Analyse des hepatozellulären ATP-Gehaltes wurde Lebergewebe bei -80°C in flüssigem Stickstoff asserviert. Die Proben wurden dann gewogen und für mindestens fünf Tage in einem Vakuumfroster (-45°C , $<0,001$ atm) lyophilisiert. Nachdem das Gewebswasser durch die Gefriertrocknung entzogen war, wurden die Proben zur Bestimmung des Trockengewichts (TG) erneut gewogen. Anschließend wurde das Lebergewebe mit Perchlorsäure (HClO_4 , 0,33 M) unter Verwendung eines Ultra-Turrax (Jahnke&Kunkel KG, Staufen i.Br., Deutschland) in Kälte homogenisiert und deproteinisiert. Nach Zentrifugation und Neutralisation des proteinfreien Überstandes wurde der Gehalt an energiereichen Phosphaten mittels eines standardisierten enzymatischen Tests und Nutzung der Hexokinase- und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Reaktionen bestimmt (Minor et al., 2001). Der ermittelte AMP-, ADP- sowie ATP-Gehalt wurde unter Berücksichtigung der Verhältnisse von Trocken- und Feuchtgewicht der Proben korrigiert und die Ergebnisse in $\mu\text{mol/g}$ TG angegeben.

5.3.6 Bestimmung von Malondialdehyd

Wenn freie Radikale die körpereigenen Schutzmechanismen überwinden und mit ungesättigten Fettsäuren reagieren, kommt es zur Lipidperoxidation. Im Rahmen von oxidativem Stress entsteht u. a. Malondialdehyd (MDA) (Knight et al., 1988). Die Messung von MDA wurde mit dem Bioxytech MDA-586-Assay (Spectrophotometric Assay for Malondialdehyde, Oxis Research) als Marker für den oxidativen Stress durchgeführt. Diese Methode (MDA-586) basiert auf der Reaktion des chromogenen Reagenz N-Methyl-2-phenylindon (R1, NMPI) mit MDA bei 45°C . Ein Molekül MDA reagiert mit 2 Molekülen NMPI

und bildet einen stabilen Carbocyaninfarbkomplex mit einer maximalen Absorption bei 586 nm (Abb. 11).

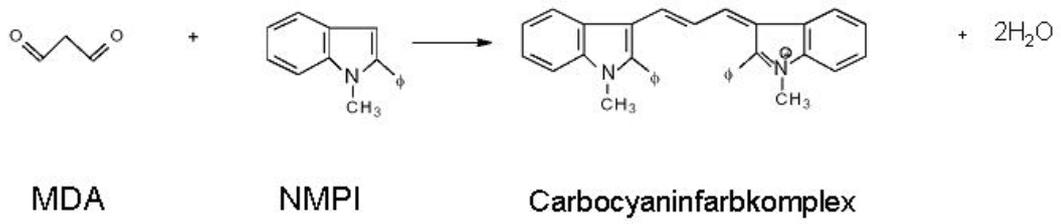


Abbildung 11. Reaktionsgleichung von MDA mit NMPI

5.4. Experimentelles Protokoll

Gegenstand der hier vorgelegten Studie war es, die Rolle des mitochondrialen Proteins UCP2 im Rahmen des hepatischen IRS zu charakterisieren. Zur systematischen Analyse wurden 28 männliche Versuchstiere in folgende Gruppen (n=7) geteilt:

| | |
|----------------------|--|
| UCP2 +/+ Sham | (Wildtypmäuse ohne Induktion von I/R der Leber) |
| UCP2 +/+ IRS | (Wildtypmäuse mit Induktion von I/R der Leber) |
| UCP2 -/- Sham | (UCP2-defiziente Mäuse ohne Induktion von I/R der Leber) |
| UCP2 -/- IRS | (UCP2-defiziente Mäuse mit Induktion von I/R der Leber) |

Nach Narkotisierung und Rasur wurden alle 28 Tiere nach bereits beschriebenem Schema behandelt (siehe Punkt 5.2.2) und zur IVM vorbereitet. Während der Operation und der IVM wurden kontinuierlich Schmerz und Körpertemperatur überwacht. Mit der IVM wurden folgende Parameter untersucht (siehe Punkt 5.3.1.4):

1. sinusoidale Perfusion
2. sinusoidale Leukozytenstase
3. rollende Leukozyten in postsinusoidalen Venolen
4. adhärenente Leukozyten in postsinusoidalen Venolen
5. hepatozelluläre Apoptose

Nach der IVM wurde durch Punktion der V. cava inferior Blut entnommen. Nach der Blutbildanalyse erfolgte die Blutzentrifugation bei 3800 U/min für 10 min, um Plasma zu gewinnen und für spätere laborchemische Analysen zu asservieren. Die Leber wurde aus dem Abdomen entfernt, gewogen und für spätere histologische, immunhistochemische, molekularbiologische und laborchemische Untersuchungen asserviert (siehe Punkt 5.3.2).

Die Versuchstiere verstarben meist während der Blutentnahme, andernfalls wurden sie durch eine intrakardiale Applikation einer Überdosis Ketamin getötet.

5.5 Statistik

Die aus den einzelnen intravitalmikroskopischen, laborchemischen, histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Analysen erhobenen Daten wurden zuerst mit dem Programm Microsoft Excel bearbeitet. Alle Daten werden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) angegeben. Die Mittelwerte berechneten sich aus den Einzelwerten des untersuchten Parameters pro Tier und Gruppe.

Die gesamte statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software SigmaStat 3.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Bei normalverteilten Werten erfolgte der Vergleich der einzelnen Gruppen mittels *one way analysis of variance* (ANOVA) und dem post-hoc-Pärchenvergleich nach Holm-Sidak und Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni.

Bei Nicht-Normalverteilung der Werte erfolgte der Gruppenvergleich durch ANOVA on ranks nach Kruskal Wallis. In diesem Fall wurde der post-hoc-Paarvergleich mehrerer Gruppen mittels Dunn-Methode durchgeführt, welcher ebenfalls die Korrektur des alpha-Fehlers nach Bonferroni beinhaltet.

Für die grafische Darstellung wurden das Programm SigmaPlot 9.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) genutzt.

6. ERGEBNISSE

6.1 Hepatische Mikrozirkulation

6.1.1 Sinusoidale Perfusion

Die Induktion von I/R erzeugte eine signifikante Schädigung des sinusoidalen Stromgebietes der Leber. Die Perfusionsrate lag unter Sham-Bedingungen zwischen 96% (UCP2 -/- Sham) und 98% (UCP2 +/+ Sham) und nach Induktion von I/R bei 87% (UCP2 -/- IRS) bzw. bei 89% (UCP2 +/+ IRS). Der sinusoidale Perfusionsausfall zeigte in den Gruppen UCP2 -/- IRS und UCP2 +/+ IRS keinen wesentlichen Unterschied (Abb. 12).

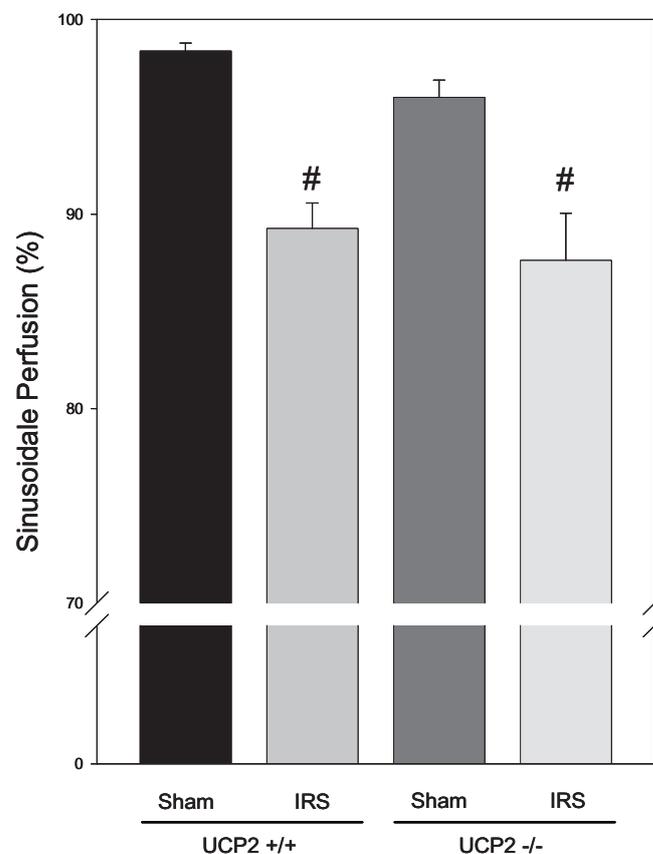


Abbildung 12. Quantitative fluoreszenzmikroskopische Analyse der sinusoidalen Perfusion der Leber. Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur; # $p < 0.05$ vs. Sham innerhalb des jeweiligen genetischen Hintergrundes.

6.1.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Intravenös appliziertes Rhodamin 6G diente der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Leukozyten und deren Fließverhalten in den Sinusoiden und in den postsinusoidalen Venolen der Leber.

Bei scheinoperierten Tieren interagierten nur wenige Leukozyten mit dem hepatischen Endothel der Sinusoide und postsinusoidalen Venolen. Außerdem zeigte sich in den scheinoperierten Tieren ein Verhältnis rollender zu freien Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen zwischen 0,5% (UCP2 ^{-/-} Sham) und 0,8% (UCP2 ^{+/+} Sham) welches nach Induktion von I/R auf 6% (UCP2 ^{-/-} IRS) bzw. 3,5% (UCP2 ^{+/+} IRS) stieg.

Des Weiteren gilt die Anzahl der am Endothel adhärenenten Leukozyten als Marker der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Nach Induktion von I/R zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (UCP2 ^{-/-} IRS 242/mm²; UCP2 ^{+/+} IRS 124/mm²) (Abb. 13).

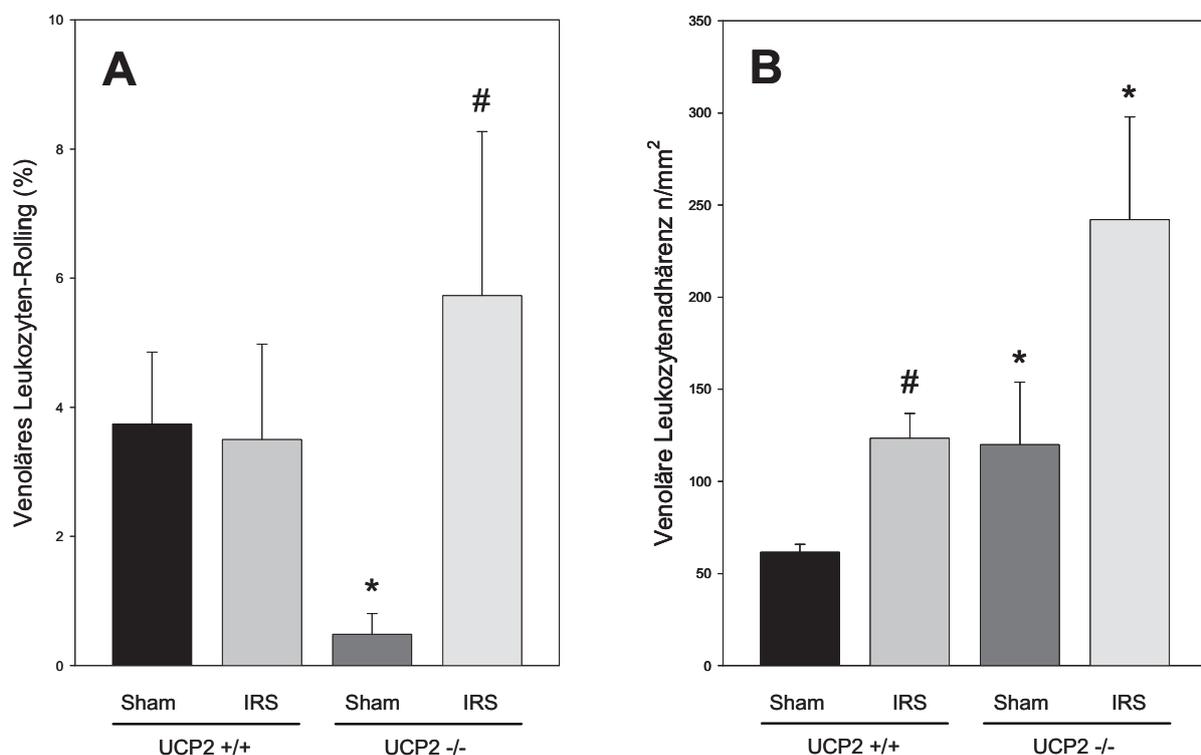


Abbildung 13. Quantitative fluoreszenzmikroskopische Analyse des Leukozyten-Rollings (Abb. 13 A) und der Leukozytenadhärenz in postsinusoidalen Venolen (Abb. 13 B). Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als MW±SEM angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur; # $p < 0.05$ vs. Sham innerhalb des gleichen genetischen Hintergrundes; * $p < 0.05$ vs. UCP2 ^{+/+} innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe.

6.1.3 Hepatozelluläre Apoptose

Zur Differenzierung von normalen und apoptotischen Zellen wurden Hepatozyten mit i. v. appliziertem Bisbenzimid angefärbt und als n/mm² angegeben. In der Gruppe UCP2 -/- IRS konnte ein deutlich größerer Anstieg der Zahl apoptotischer Hepatozyten ($\pm 26/\text{mm}^2$) im Vergleich zur Gruppe UCP2 +/+ IRS ($\pm 8/\text{mm}^2$) beobachtet werden (Abb. 14).

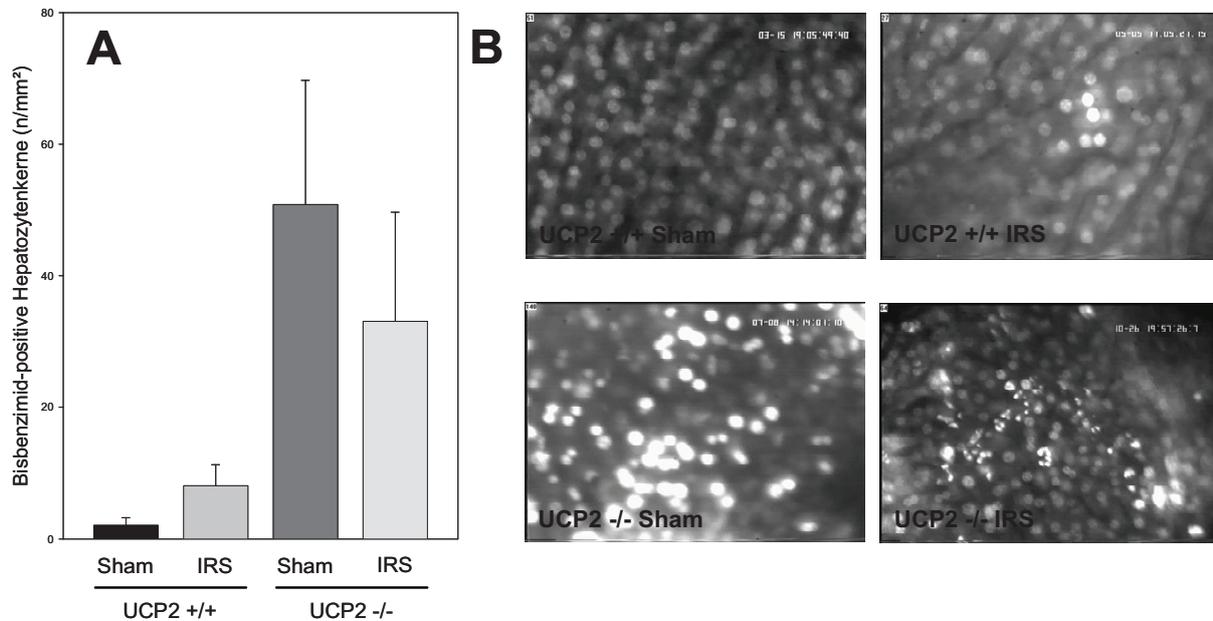


Abbildung 14. Quantitative Analyse der apoptotischen Hepatozyten unter Gabe von Bisbenzimid und UV-Epi-Illumination (Abb. 14 A). Abb. 14 B zeigt repräsentative Abbildungen der dazugehörigen IVM. Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als MW \pm SEM angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur. Originalvergrößerung x823

6.2 Histologie und Immunhistochemie

Zusätzlich zu den intravitalmikroskopisch durchgeführten funktionellen Studien erfolgten lichtmikroskopische Analysen zu morphologischen Veränderungen der Leber nach Induktion von I/R.

6.2.1 Hämatoxylin & Eosin-Färbung

Nach Hämatoxylin & Eosin-Färbung (H&E) von Gewebe des linken Leberlappens erfolgte die lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate. Die Abgrenzung der nekrotischen Areale zur physiologischen Balkenstruktur der Leber erfolgte anhand der bereits beschriebenen Merkmale (siehe 5.3.3).

In der UCP2 $+/+$ IRS Gruppe zeigte sich eine Rate von 0,1 Nekrose-positiven Gesichtsfeldern/50 Gesichtsfelder. Es konnte kein Unterschied zu den Tieren der UCP2 $-/-$ IRS Gruppe (0,1 Nekrose-positive Gesichtsfelder/50 Gesichtsfelder) beobachtet werden (Abb. 15).

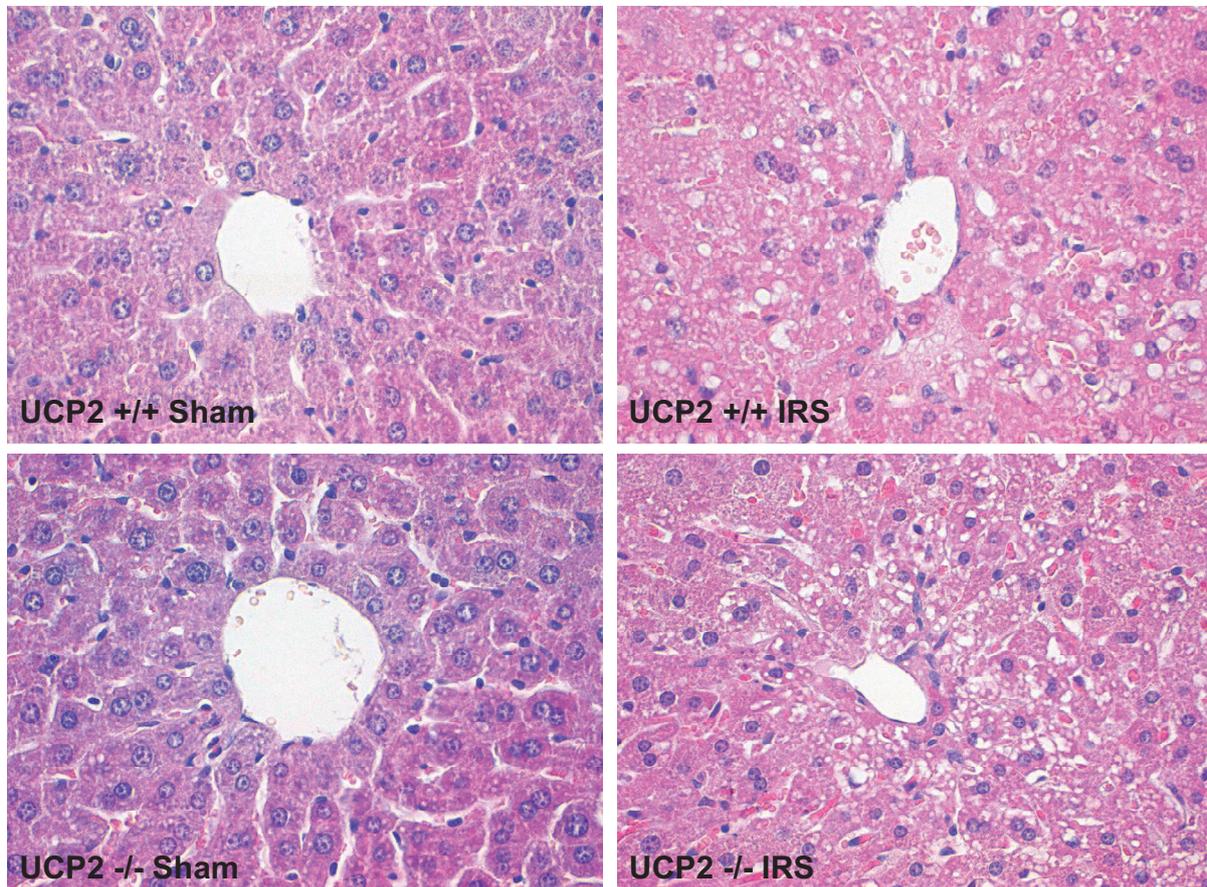


Abbildung 15. Repräsentative Ausschnitte des Leberparenchyms im H&E-Bild. Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Die Aufnahme der Bilder erfolgte bei 400-facher Vergrößerung.

6.2.2 Cleaved Caspase-3-Färbung

Zur Analyse der hepatozellulären Apoptose wurde außerdem eine immunhistochemische Darstellung der cleaved Caspase-3 des Lebergewebes durchgeführt. Es zeigten sich in der UCP2 $-/-$ IRS Gruppe 1,9 cleaved Caspase-3-positive Hepatozyten/GF. In der UCP2 $+/+$ IRS Gruppe wurde mit 1,4 cleaved Caspase-3-positiven Hepatozyten/GF eine etwas geringere Zahl beobachtet. Unter Sham-Bedingungen zeigte sich in der UCP2 $+/+$ Sham Gruppe eine deutlich höhere Zahl apoptotischer Hepatozyten als in der Gruppe UCP2 $-/-$ Sham (1,1 versus 0,3 cleaved Caspase-3-positive Hepatozyten/GF, Abb. 16).

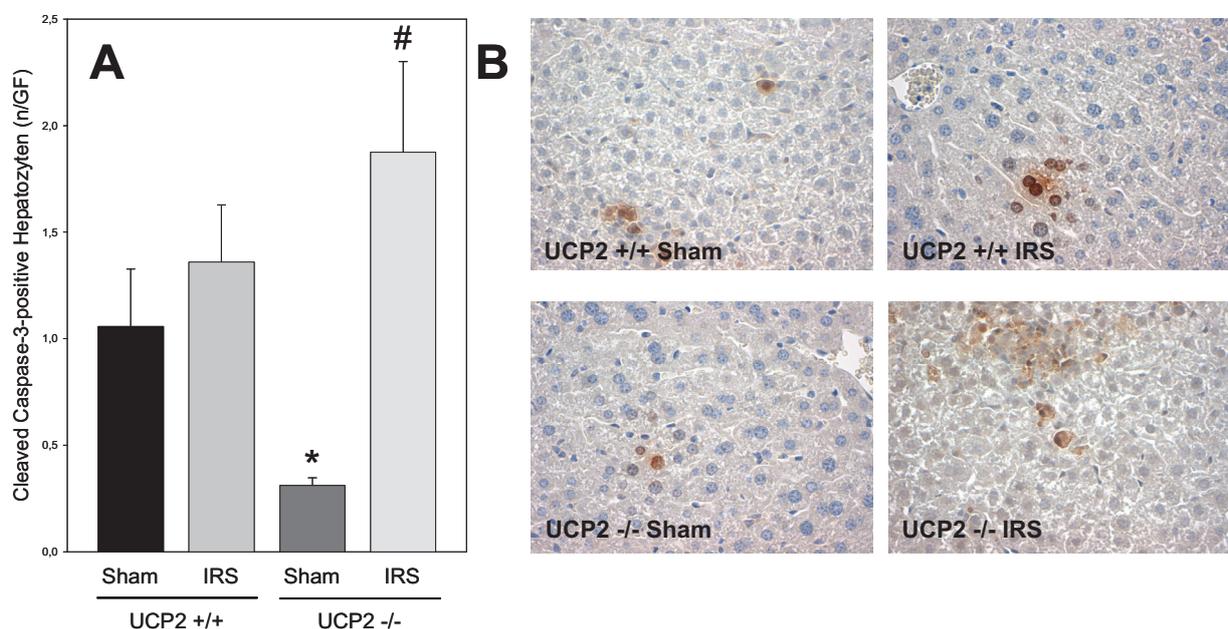


Abbildung 16. Quantitative Analyse der cleaved Caspase-3-positiven Hepatozyten durch immunhistochemische Färbung des Lebergewebes (Abb. 16 **A**) und repräsentative Ausschnitte des Leberparenchyms im immunhistochemischen Bild (Abb. 16 **B**). Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur; # $p < 0.05$ vs. Sham innerhalb des gleichen genetischen Hintergrundes; * $p < 0.05$ vs. UCP2 $+/+$ innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe. Die Aufnahme der Bilder erfolgte bei 400-facher Vergrößerung.

6.3 Hepatozellulärer Energiestatus

Zur Analyse des hepatozellulären Energiestatus wurde der ATP-Gehalt gemessen. Bereits in der UCP2 $-/-$ Sham Gruppe (4,7 $\mu\text{mol/g}$ TG) zeigte sich ein signifikant höherer hepatozellulärer ATP-Gehalt im Vergleich zur UCP2 $+/+$ Sham Gruppe (2,4 $\mu\text{mol/g}$ TG). Nach Induktion von I/R kam es in beiden Gruppen zu einem deutlichen Abfall des hepatozellulären ATP-Gehaltes (UCP2 $+/+$ IRS 1,4 $\mu\text{mol/g}$ TG versus UCP2 $-/-$ IRS 1,0 $\mu\text{mol/g}$ TG) (Abb. 17 A).

Des Weiteren zeigte sich nach Induktion von I/R im Vergleich zur jeweiligen Sham-Gruppe ein signifikanter Abfall der ADP-Konzentration sowohl in der UCP2 $+/+$ IRS Gruppe als auch in der UCP2 $-/-$ IRS Gruppe (Abb. 17 B).

Der Anstieg des AMP fiel nach Induktion von I/R in der UCP2 $-/-$ Gruppe gering aus. Wider Erwartens zeigte sich nach Induktion von I/R in der UCP2 $+/+$ Gruppe sogar ein Abfall der AMP-Konzentration (Abb. 17 C).

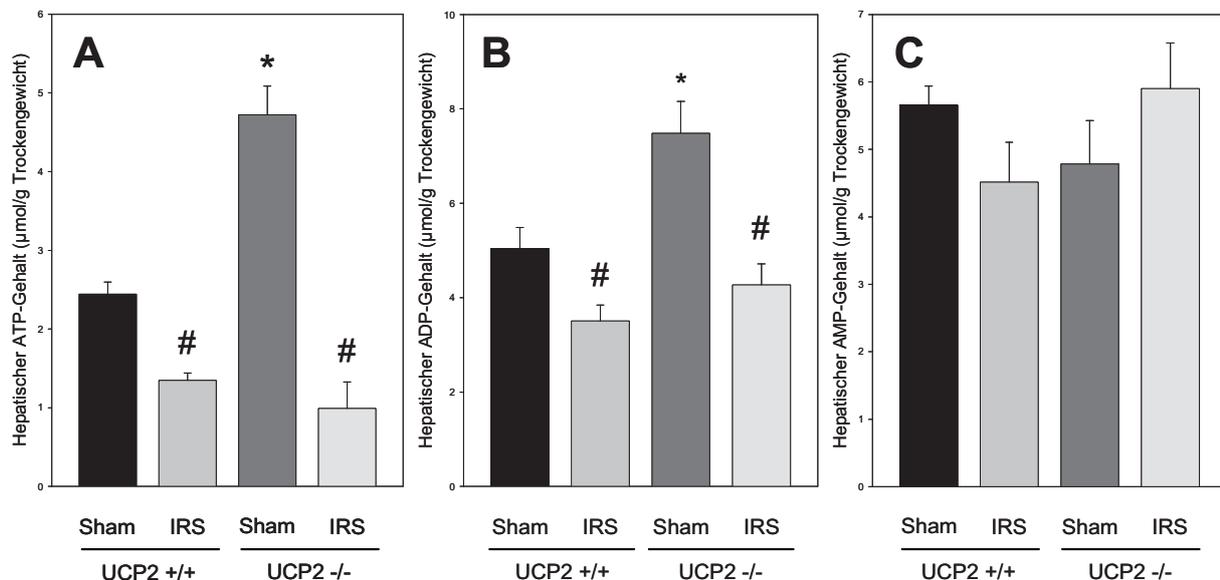


Abbildung 17. Quantitative Analyse des hepatischen Gehalts an ATP (Abb. 17 A), ADP (Abb. 17 B) und AMP (Abb. 17 C). Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur; # $p < 0.05$ vs. Sham innerhalb des gleichen genetischen Hintergrundes; * $p < 0.05$ vs. UCP2 $+/+$ innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe.

Ein weiterer Indikator zur Bestimmung des hepatozellulären Energiestatus ist das ATP/ADP-Verhältnis (Brealey et al., 2004; Crumm et al., 2008). In dieser Studie zeigten die Tiere beider genetischer Hintergründe einen signifikanten Abfall des ATP/ADP-Verhältnisses nach Induktion von I/R, wobei dieser bei den UCP2^{-/-} Tieren stärker ausgeprägt war (Abb. 18).

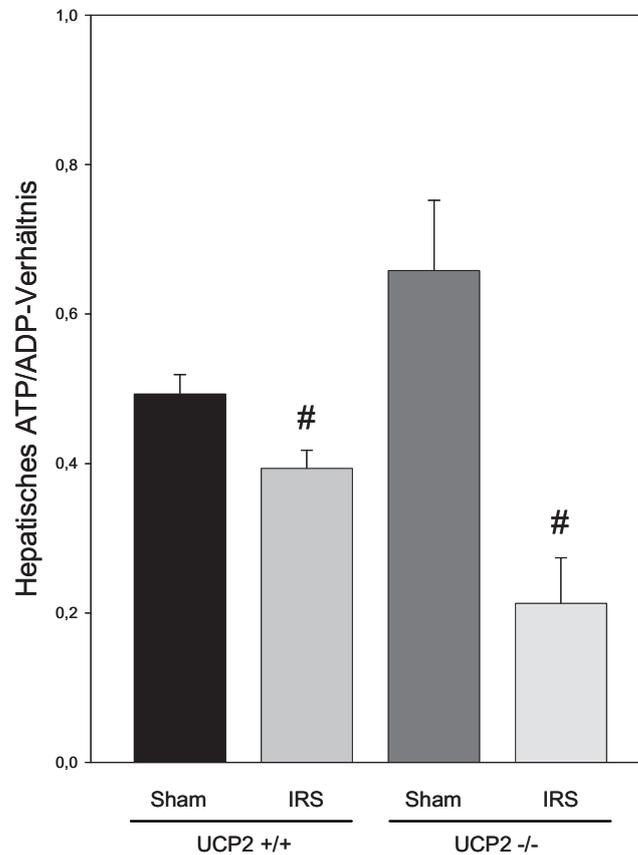


Abbildung 18. Quantitative Analyse des hepatischen ATP/ADP-Verhältnisses. Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als MW ± SEM angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur; # $p < 0.05$ vs. Sham innerhalb des gleichen genetischen Hintergrundes.

6.4 Plasmakonzentration von IL-6

Zur Untersuchung der inflammatorischen Antwort infolge von I/R wurde die Plasmakonzentration des Zytokins IL-6 bestimmt. Die IL-6-Plasmakonzentration betrug nach Induktion von I/R in der UCP2 +/+ IRS Gruppe 462 pg/ml und in der UCP2 -/- IRS Gruppe 631 pg/ml. Verglichen mit den Werten der jeweils Sham-operierten Tiere fand sich ein Anstieg der plasmatischen IL-6-Konzentration in der UCP2 +/+ IRS um etwa 70% und in der UCP2 -/- IRS Gruppe um etwa 40% (Abb. 19).

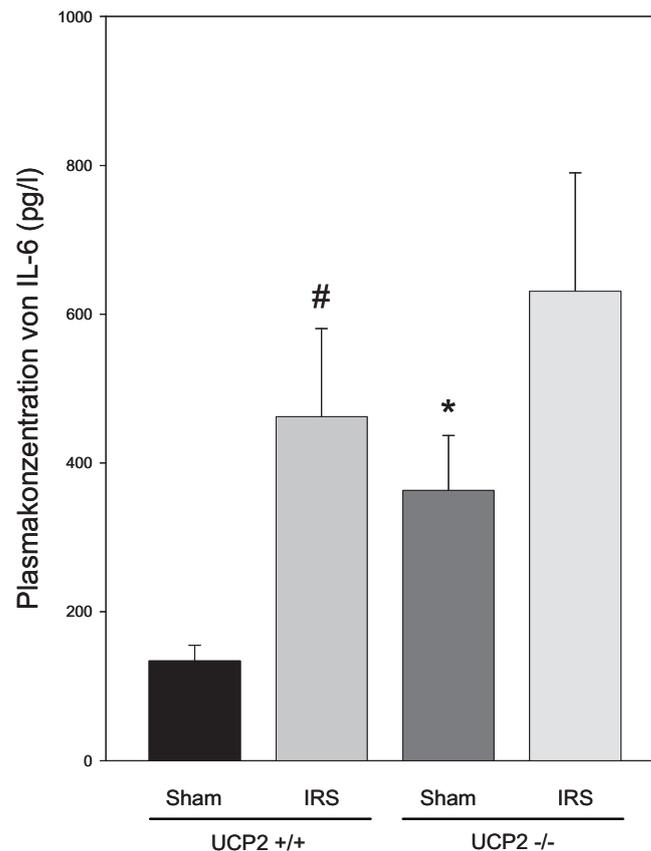


Abbildung 19. Quantitative Analyse der Plasmakonzentration von IL-6. Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur; # $p < 0.05$ vs. Sham innerhalb des gleichen genetischen Hintergrundes; * $p < 0.05$ vs. UCP2 +/+ innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe.

6.5 Plasmakonzentration von Malondialdehyd

Die Bestimmung der MDA-Plasmakonzentration diene als Marker für die Lipidoxidation bei oxidativem Stress. Bei scheinoperierten Tieren der UCP2 +/+ Gruppe konnte eine MDA-Plasmakonzentration von 0,9 $\mu\text{mol/ml}$ und bei denen der UCP2 -/- Gruppe von 0,4 $\mu\text{mol/ml}$ festgestellt werden. Nach Induktion von I/R erfolgte ein Anstieg auf 1,2 $\mu\text{mol/ml}$ in der UCP2 +/+ IRS Gruppe und ein deutlicherer Anstieg auf 2,1 $\mu\text{mol/ml}$ in der UCP2 -/- IRS Gruppe (Abb. 20).

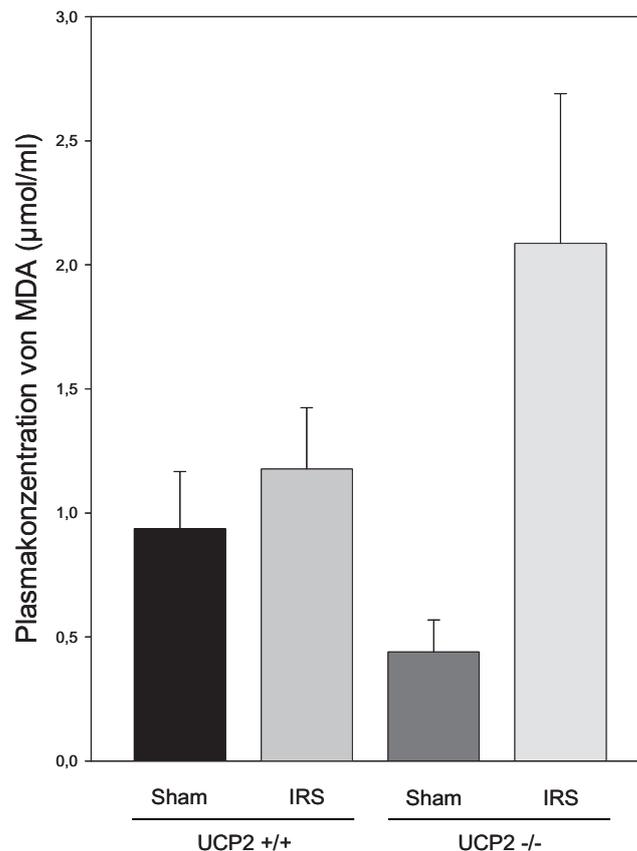


Abbildung 20. Quantitative Analyse der Plasmakonzentration von MDA. Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur.

6.6 Plasmaaktivität leberspezifischer Enzyme

Mittels der spektrophotometrischen Bestimmung der Plasmaaktivität der leberspezifischen Transaminasen (ALT, AST) und des mitochondrialen Enzyms GLDH lassen sich weitere Rückschlüsse auf die Integrität des Leberzellverbandes nach Induktion von I/R ziehen (Abb. 21).

Nach Induktion von I/R stieg die plasmatische Aktivität von ALT auf 226 U/L (UCP2 +/+ IRS) bzw. 192 U/L (UCP2 -/- IRS) an (Abb. 21 A). Bereits unter Sham-Bedingungen konnte eine signifikant höhere Plasmaaktivität von ALT in der UCP2 -/- Sham Gruppe im Vergleich zur UCP2 +/+ Sham Gruppe beobachtet werden.

Für AST zeigte sich ein deutlicherer Unterschied nach Induktion von I/R (1102 U/L in der UCP2 +/+ Gruppe und 319 U/L in der UCP2 -/- IRS Gruppe) (Abb. 21 B).

Auch für die Aktivität der GLDH ließ sich ein deutlicher Anstieg nach Induktion von I/R verzeichnen. Der Unterschied zwischen UCP2 +/+ IRS Gruppe (53 U/L) und UCP2 -/- IRS Gruppe (41 U/L) fiel nur sehr gering aus (Abb. 21 C).

Die Unterschiede hinsichtlich der plasmatischen Aktivität für ALT und GLDH bei den scheinoperierten Tieren der verschiedenen Gruppen waren minimal (Abb. 21).

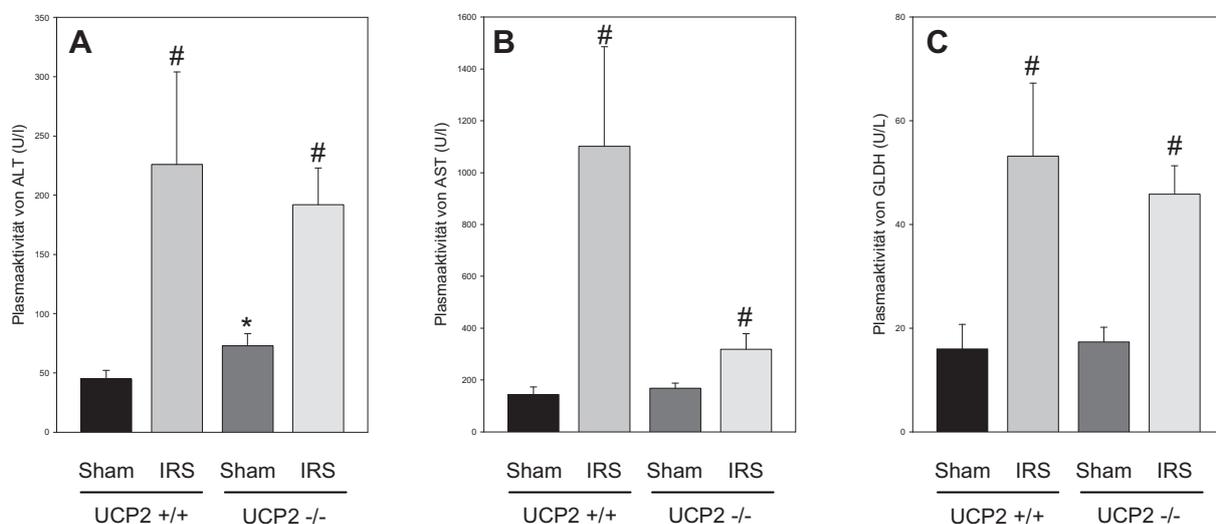


Abbildung 21. Quantitative Analyse der Plasmaaktivität der ALT (Abb. 21 A), AST (Abb. 21 B) und GLDH (Abb. 21 C). Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur; # $p < 0.05$ vs. Sham innerhalb des gleichen genetischen Hintergrundes; * $p < 0.05$ vs. UCP2 +/+ innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe.

6.7 Western Blot Protein Analyse

6.7.1 Analyse von cleaved Caspase-3

Die Ergebnisse der *in vivo* Analyse und der immunhistochemischen Untersuchungen zum hepatozellulären apoptotischen Zelltod nach I/R der Leber veranlassten uns zur molekularbiologischen Untersuchung des cleaved Caspase-3-Proteins. In beiden Gruppen (UCP2 +/+ IRS und UCP2 -/- IRS) zeigte sich ein deutlicher Anstieg des aktivierten Caspase-3-Proteins nach Induktion von I/R (Abb. 22 A). Die immunhistochemisch bei den UCP2 -/- Sham-Tieren im Vergleich zu den UCP2 +/+ Sham Tieren gezeigte signifikant niedrigere Konzentration an cleaved Caspase-3-positiven Hepatozyten/GF bestätigte sich im Western Blot für cleaved Caspase-3 jedoch nicht (Abb. 22).

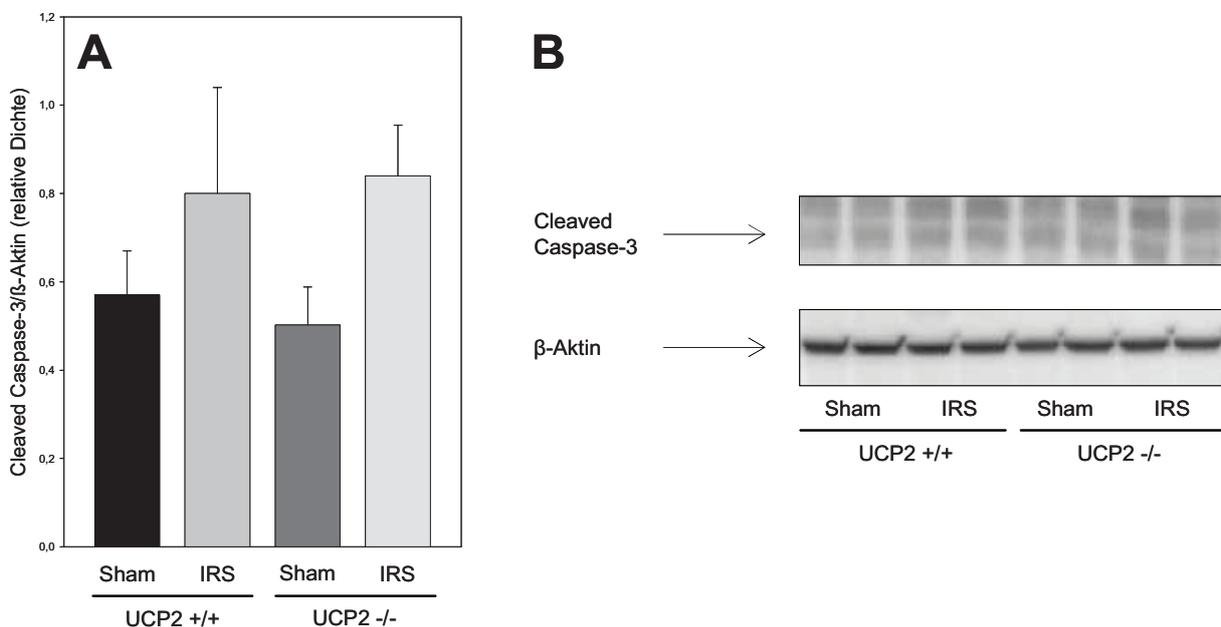


Abbildung 22. Quantitative densitometrische Analyse von cleaved Caspase-3 (Abb. 22 A) sowie repräsentative Bilder der Western Blot Protein Analyse (Abb. 22 B). Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur.

6.7.2 Analyse von Proliferating Cell Nuclear Antigen

Zur weiteren Charakterisierung der Rolle von UCP2 bei hepatischer I/R untersuchten wir die Expression des *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), welches wichtige Funktionen bei der DNA-Synthese und DNA-Reparatur hat.

In allen vier Gruppen konnte das PCNA-Protein nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen fanden sich jedoch nicht (Abb. 23).

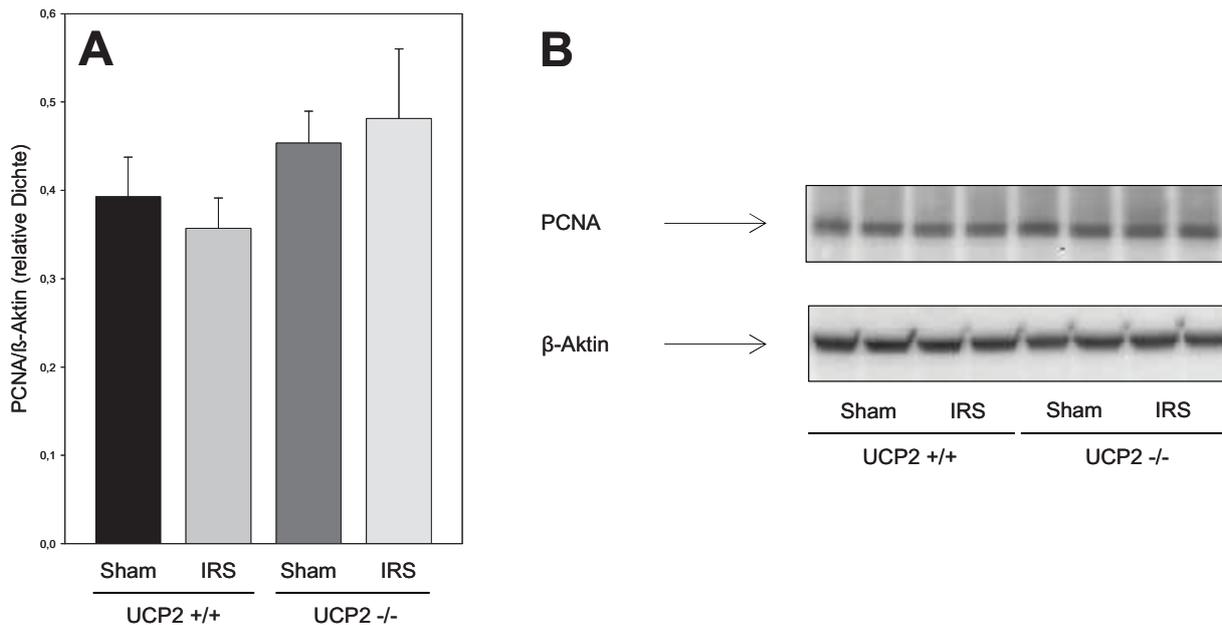


Abbildung 23. Quantitative densitometrische Analyse des PCNA (Abb. 23 A) sowie repräsentative Bilder der Western Blot Protein Analyse (Abb. 23 B). Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur.

6.7.3 Analyse von phosphorylierter endothelialer NO-Synthase

Ein protektiver Mediator der hepatischen Mikrozirkulation nach I/R ist die Freisetzung von NO durch die phosphorylierte endotheliale NO-Synthase (phospho-eNOS).

Wie in Abb. 24 gezeigt, konnten keine Unterschiede hinsichtlich der phosphorylierten Form von eNOS zwischen den Gruppen festgestellt werden.

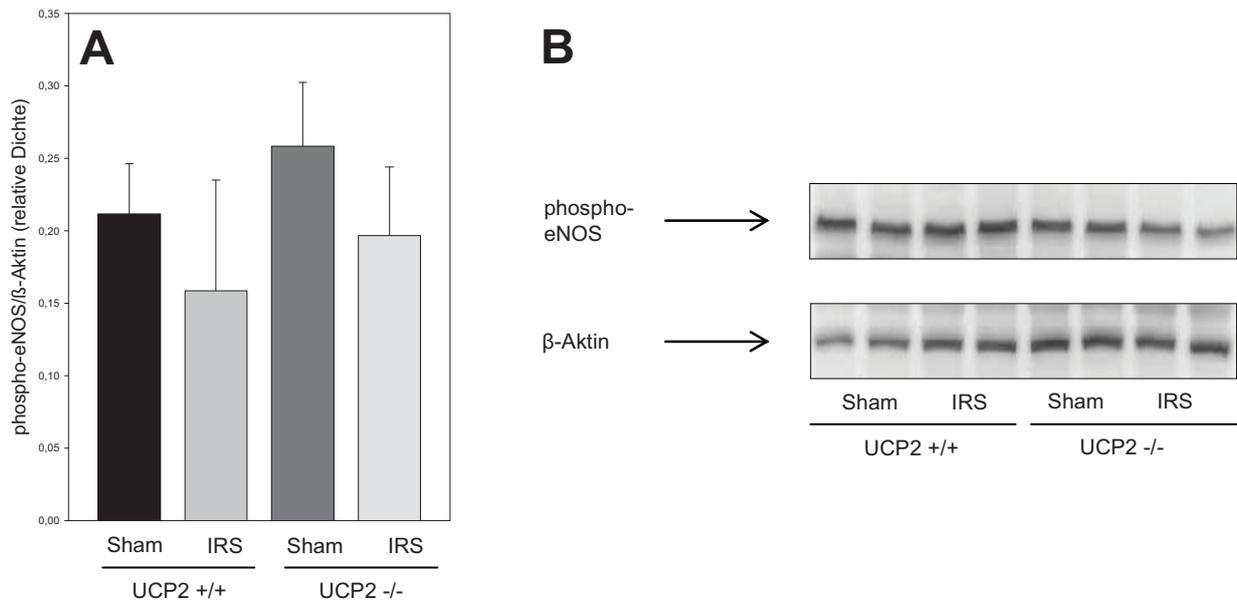


Abbildung 24. Quantitative densitometrische Analyse der phospho-eNOS (Abb. 24 **A**) sowie repräsentative Bilder der Western Blot Protein Analyse (Abb. 24 **B**). Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur.

6.8 Blutbild

Im Anschluss an die IVM wurde allen Versuchstieren ca. 1 ml Vollblut zur quantitativen Blutzellanalyse entnommen. Die quantitative Bestimmung der Leukozytengesamtzahl und der Anzahl der neutrophilen Granulozyten diente der Einschätzung der inflammatorischen Antwort nach Induktion von I/R.

Die Werte für Erythrozyten, Hämoglobin und Hämatokrit zeigten zwischen den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. In der UCP2 ^{-/-} IRS Gruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Leukozytengesamtzahl im Vergleich zu den UCP2 ^{-/-} Sham Tieren. Ebenso kam es nach Induktion von I/R zu einem signifikanten Anstieg der Thrombozyten in der UCP2 ^{-/-} IRS Gruppe (Tab. 3).

| Gruppe | Erythrozyten (x 10 ¹² /L) | Hämoglobin (mmol/L) | Hämatokrit (L/L) | Leukozyten (x 10 ⁹ /L) | Neutrophile (x 10 ⁹ /L) | Thrombozyten (x 10 ⁹ /L) |
|-----------------------------|---|------------------------|---------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| UCP2 ^{+/+} Sham | 8,5 ± 0,2 | 7,3 ± 0,7 | 0,48 ± 0,04 | 5,6 ± 0,8 | 0,3 ± 0,1 | 793,1 ± 148,5 |
| UCP2 ^{+/+} IRS | 8,4 ± 0,4 | 7,8 ± 0,3 | 0,46 ± 0,06 | 6,5 ± 0,8 | 0,3 ± 0,1 | 708,3 ± 131,1 |
| UCP2 ^{-/-} Sham | 8,5 ± 0,2 | 8,1 ± 0,2 | 0,46 ± 0,03 | 4,2 ± 0,4 | 0,4 ± 0,3 | 1082,1 ± 81,5 |
| UCP2 ^{-/-} IRS | 8,8 ± 0,2 | 8,2 ± 0,2 | 0,48 ± 0,03 | 7,3 ± 1,0 [#] | 0,2 ± 0,1 | 1127,3 ± 95,5 [*] |

Tabelle 3. Quantitative Blutbildanalyse im zentralvenösen Vollblut. Für die Induktion von I/R wurde die nutritive Perfusion des linken Leberlappens für 30 min abgeklemmt. Es folgten daraufhin 60 min Reperfusion. Die Untersuchung wurde 90 min nach Induktion von I/R durchgeführt. Sham-operierte Tiere wurden der gleichen chirurgischen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Induktion von I/R und dienten als Kontrolle. Alle Werte sind als MW±SEM angegeben. ANOVA und nachfolgender Paarvergleich mit Bonferroni-Korrektur; # p<0.05 vs. Sham innerhalb des gleichen genetischen Hintergrundes; * p<0.05 vs. UCP2 ^{+/+} innerhalb der gleichen Behandlungsgruppe.

6.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die hier vorliegende experimentelle Studie untersuchte mittels IVM die mikrozirkulatorischen Parameter nach Induktion von I/R des linken Leberlappens sowie den Einfluss des mitochondrialen Gens UCP2 auf diese pathophysiologischen Prozesse. Um die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente zu stützen, wurden biochemische, histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Induktion von I/R des linken Leberlappens bewirkte eine deutliche Schädigung des Leberparenchyms, welche sich durch einen sinusoidalen Perfusionsausfall, eine gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, eine systemische Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und eine Bildung von MDA als Marker für oxidativen Stress zeigte. Dies führte zu einer deutlichen Störung der hepatischen Gewebsintegrität, welche mit einer erhöhten Freisetzung leberspezifischer Enzyme assoziiert war.
2. Die Abwesenheit des UCP2-Gens beeinflusste den hepatozellulären Energiehaushalt mit einem signifikant höheren ATP-Gehalt und einem größeren ATP/ADP-Verhältnis. Nach Induktion von I/R konnte ein deutlicher Abfall des hepatozellulären Energiestatus in beiden Gruppen beobachtet werden.
3. Das mitochondriale Gen UCP2 hatte keinen Einfluß auf die Ausprägung der hepatozellulären Nekrose nach Induktion von I/R.
4. Die Gesamtausprägung des Leberparenchymschadens nach Induktion von I/R erwies sich als unabhängig von der UCP2-Genexpression.

7. DISKUSSION

Trotz aller Fortschritte in der heutigen Medizin stellen auch zu Beginn des 21. Jahrhunderts I/R-assoziierte Organschädigungen, vor allem der Leber, ein großes klinisches Problem dar und sind Inhalt intensiver Forschung.

Der „kalten“ Ischämie kommt im Rahmen der Lebertransplantation eine herausragende Stellung zu. Die „warme“ Ischämie zur Vermeidung größerer Blutverluste bei leberchirurgischen Resektionsverfahren hat in Form des sog. Pringle Manövers eine ebenso hohe klinische Bedeutung.

Es ist bekannt, dass nicht nur die Ischämie, sondern auch die Reperfusion einen signifikanten Anteil an der Schädigung der Hepatozyten hat (Flaherty JL, 1988, Menger et al., 1992b; Kerrigan et al., 1993). Dementsprechend werden die morphologischen und funktionellen Organveränderungen in ihrer Gesamtheit als IRS bezeichnet.

Unter Nutzung von unterschiedlichen Modellen wird der Einfluss des mitochondrialen Proteins UCP2 dabei kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage geprüft, welche Rolle UCP2 im Rahmen des hepatischen IRS in gesunden Lebern spielt.

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Versuchstiere und Tiermodell

In der hier vorliegenden Studie wurde der Einfluss des mitochondrialen Proteins UCP2 auf die Ausprägung pathophysiologischer Vorgänge im Rahmen des IRS der Leber untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Analyse mikrozirkulatorischer, plasmatischer und zellulärer Veränderungen infolge von I/R bedingten und deren Ausmaß in Abhängigkeit der Genexpression von UCP2. Zur *in vivo* Darstellung der I/R-assoziierten Organschädigungen diente ein etabliertes Mausmodell. Für alle Experimente wurden Mäuse des Stammes C57BL/6J genutzt. Aufgrund anatomischer Gegebenheiten (Lebergröße und Dicke der Leberkapsel) ist die IVM nur am Kleintiermodell, insbesondere an der Ratte und der Maus möglich, da bei diesen Tieren die pathophysiologisch relevanten Strukturen (Lebersinusoide und postsinusoidale Venolen) bis an die Leberoberfläche treten und sich somit gut darstellen lassen. Mäuse des C57BL/6J-Stammes wurden für experimentelle Studien in der Hämatologie/Onkologie (Arnold et al., 1997; Myung et al., 2006), der Neurologie (Cservenka et al., 2010), der Endokrinologie (Sutton et al., 2006), der Infektiologie und der Immunologie (Mutaomba et al., 1999) sowie zur Entwicklung von Impfungen (Vladoianu und Dubino, 1975) verwendet. C57BL/6J-Mäuse werden als Versuchstiere im Modell des IRS (Tamura et al., 1995; Contreras et al., 2004; Eipel et al., 2009) und des akuten Leberversagens häufig genutzt (Endo et al., 1999; Le Minh et al.,

2007; Eipel et al., 2007). Außerdem ist das hier gewählte Modell der reversiblen lobären I/R an der Maus ein in der Literatur mehrfach beschriebenes und etabliertes Modell zur Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation (Brown et al., 1997; Biberthaler et al., 2001; Khandoga et al., 2002).

Frühere Studien zeigten, dass bereits die Anästhesie mittels Ketamin/Xylazin-Gemisch Einfluss auf die Hämodynamik und Leberintegrität nimmt (Thompson et al., 2002). Da durch die operative Prozedur ebenso unvermeidliche Effekte auf den Gesamtorganismus der Versuchstiere auftreten können, wurden alle Tiere strikt auf die gleiche Art und Weise chirurgisch präpariert, um eine Standardisierung und damit eine Minimierung von außen zugefügter Unterschiede zu erreichen.

Die Einleitung der Narkose erfolgte mittels Applikation eines definierten Gemisches aus Ketamin, Xylazin und physiologischer Kochsalzlösung i. p., womit die Sedierung, Analgesie und Muskelrelaxation der Versuchstiere erreicht wird. Beide Stoffe werden hepatisch metabolisiert und renal eliminiert. Eine pharmakologisch induzierte Leberschädigung oder Arzneimittelkummulation im Zuge des IRS kann somit ausgeschlossen werden. Zur schnellen Induktion der Anästhesie und zur Vermeidung von unnötigem Stress für die Versuchstiere wurde die Applikation i. p. gewählt.

Zur Erzeugung einer reversiblen Ischämie des linken Leberlappens wurden die Gefäße im Hilusbereich des linken Leberlappens mit einem Mikroclip für 30 min okkludiert. Nach dieser Zeit wurde der Clip gelöst und die 60-minütige Reperfusion eingeleitet.

Eine Ischämiezeit von 30-90 min ist als klinisch relevant anzusehen. Eine über 90 min dauernde Ischämie stellt einen *point of no return* der Perfusionsstörung des linken Leberlappens dar (Chien et al., 1977; Yaddav et al., 1999; Khandoga et al., 2002; Khandoga et al., 2003; Khandoga et al., 2003b). Es konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass es bedeutende Unterschiede bezüglich der Vulnerabilität der einzelnen Leberzelltypen besonders gegenüber der „kalten“ Ischämie gibt (McKeown et al., 1988; Ikeda et al., 1992). So blieben nach Lagerung in kalter Euro-Collins-Lösung >90% der Parenchymzellen lebensfähig, wohingegen bei den Nichtparenchymzellen nur eine Rate von 40% überlebender Zellen beobachtet wurde (Marzi et al., 1989b; Caldwell-Kenkel et al., 1989). Während die Vulnerabilität der Parenchymzellen gegenüber „kalter“ Ischämie gering ist, sind diese vor allem gegenüber „warmer“ Ischämie suszeptibel.

Um die pathophysiologischen Veränderungen nach I/R analysieren zu können, entschieden wir uns für eine kurze „warme“ Ischämiezeit von 30 min. Studien haben gezeigt, dass diese Zeit, ausgeweitet bis maximal 60 min, bei suffizienter Wiederherstellung der Sauerstoffversorgung zu einem reversiblen Leberzellschaden führt (Blumhardt et al., 1986; González-Flecha et al., 1993; Bismuth et al., 1989).

7.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

Im Rahmen dieser Studie wurde die IVM zur Erfassung und Visualisierung pathophysiologischer Veränderungen im mikrovaskulären Strombett der Leber genutzt. Mittels fluoreszierender Farbstoffe können zelluläre und vaskuläre Strukturen selektiv angefärbt werden (Menger et al., 1991; Vollmar und Menger, 2009).

Die erste Erwähnung der IVM geht auf das Jahr 1839 zurück. Die IVM konnte sich als wissenschaftliche Methode weltweit jedoch erst in den letzten 20 bis 30 Jahren etablieren (Vollmar und Menger, 1998). In der Vergangenheit erfolgten die Studien der hepatischen Mikrozirkulation durch indirekte Verfahren, wie z. B. mittels der Autoradiographie (Grisham, 1962), der ^{133}Xe - (Bolmsjo et al., 1983) und der H_2 -Auswaschung (Koeppel et al., 1997), der Thermodiffusion nach Lebertransplantation (Klar et al., 1996), der Blutflussmessung mittels Laser-Doppler-Verfahren (Vollmar et al., 1994a) oder der Sauerstoffpartialdruckmessung im Lebergewebe (Vollmar et al., 1992). Mit diesen Techniken konnten jedoch die mikrozirkulatorischen Veränderungen in den einzelnen Strukturen des hepatischen Strombettes nicht getrennt betrachtet oder zelluläre Interaktionen z. B. zwischen Leukozyten und Endothelzellen nicht beobachtet werden (Menger und Vollmar, 1994). Die IVM bietet den entscheidenden Vorteil der direkten und getrennten Visualisierung der einzelnen anatomischen Strukturen auf mikrozirkulatorischer Ebene im lebenden Organismus (Menger et al., 1991). Außerdem ermöglicht sie eine quantitative Bestimmung mikrohämodynamischer Parameter, wie z. B. der mittleren Gefäßweite nach Gabe von Natriumfluoreszein. Auch die zellulären Interaktionen, wie z. B. die Leukozytenadhärenz am Endothel nach Applikation von Rhodamin 6G (Menger et al., 1993b; Vollmar et al., 1995), Thrombozyteninteraktionen mit Leukozyten und Endothelzellen (Lehr et al., 1999), aber auch die Beobachtung der phagozytotischen Aktivität der ortsständigen Makrophagen in der Leber (KZ) nach Gabe fluoreszierender Latexpartikel (Vollmar et al., 1994b) gehören zu den Möglichkeiten der IVM.

Die IVM findet eine breite Anwendung in der Wissenschaft. Hervorzuheben ist dabei besonders ihr Einsatz im Rahmen von I/R der Leber (Marzi et al., 1990; Menger et al., 1991; Vollmar et al., 1996; Khandoga et al., 2003; Hanschen et al., 2008; Eipel et al., 2009). Des Weiteren wird die IVM zur Analyse der pathophysiologischen Vorgänge in anderen Organen angewendet, so z. B. zum Studium des Darms (Shigematsu et al., 2002), der Haut (Lindenblatt et al., 2007; Sorg et al., 2007), des Skelettmuskels (Chappell et al., 2006), der Lunge (St Croix et al., 2006), des Pankreas (Sorg et al., 2008) und der Blutgefäße (Massberg et al., 2003). Andere Arbeitsgruppen benutzten die IVM zur Analyse der

Angiogenese (Menger et al., 1990), der Arteriosklerose (Rotzius et al., 2009), des Diabetes mellitus (Lindenblatt et al., 2006) und der Karzinogenese (Tozer et al. 2001).

Hinsichtlich der technischen Möglichkeiten der IVM unterscheidet man zwei Methoden: Die Trans-Illumination und die in dieser Studie verwendete Epi-Illumination. Die Epi-Illumination weist eine höhere Sensitivität gegenüber der Trans-Illumination auf (Zacharakis et al., 2005). Bei der Trans-Illumination ist eine sehr dünne Gewebedicke des zu untersuchenden Präparates erforderlich. So könnte nur der Leberrand mikroskopisch untersucht werden, da nur dort die Gewebdicke ausreichend gering ist. Die Untersuchung des Leberrandes würde die Anzahl der zur Untersuchung verfügbaren Leberazini pro Versuchstier jedoch stark minimieren. Der Leberrand weist ohnehin bereits eine physiologisch geringere Perfusionsrate auf, was die Aussagekraft des Studiums der nutritiven Perfusion an dieser Stelle beschränkt (Eguchi et al., 1991).

Die IVM beinhaltet systemimmanente Nachteile, wie z. B. die Phototoxizität der Fluoreszenzfarbstoffe. In experimentellen Studien und Zellkulturen führte der Fluoreszenzfarbstoff Acridin Orange zu strukturellen Veränderungen bis hin zum Zelltod (Olsson et al., 1989; Zdolsek et al., 1990; Zdolsek, 1993). *In vivo* Experimente an Goldhamstern zeigten, dass die Lichtquelle der CCD-Kamera nach Applikation von Rhodamin 6G und Acridin Orange temporäre und permanente Leukozyten-Adhärenz am Endothel der postkapillären Venolen und Arteriolen induzieren kann (Saetzler et al., 1997). Für Acridin Orange wurde weiterhin beschrieben, dass der Farbstoff einen Vasospasmus in Arteriolen induzieren kann (Saetzler et al., 1997). Für Natriumfluoreszein wird die Entwicklung eines Endothelzellschadens mit konsekutiver Thrombozytenaggregation bei gleichzeitiger Exposition mit hochenergetischem Licht einer Quecksilberlampe beschrieben (Povlishock et al., 1983). Andere Arbeitsgruppen berichten hingegen, dass die Verwendung von Rhodamin 6G, Acridin Orange und FITC-Dextran als Fluoreszenzfarbstoffe keinen Einfluss auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion oder den Gefäßdurchmesser hat und phototoxische Effekte erst durch hohe Lichtenergiedosen hervorgerufen werden (Steinbauer et al., 2000; Harris et al., 2002). Um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieser phototoxischen Schäden der Fluoreszenzfarbstoffe so gering wie möglich zu halten, wurden in unseren Versuchen konsequent kurze, bei jedem Tier gleich lange Beobachtungszeiträume während der IVM eingehalten.

Intravitalmikroskopisch wurde im Rahmen dieser Studie außerdem das Verhalten der Leukozyten in Antwort auf I/R beobachtet. In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Rekrutierung und der Aktivierung von Leukozyten im Rahmen von hepatischer I/R eine entscheidende Rolle zukommt und diese Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ein

Parameter für Inflammation bei I/R der Leber *in vivo* ist (Jaeschke et al., 1991a; Jaeschke et al., 1991c; Vollmar et al., 1994c; Vollmar et al., 1995; Vollmar et al., 1996b; Jaeschke und Smith, 1997; Eipel et al., 2009).

Neben der Leukozytenakkumulation ist auch der sinusoidale Perfusionsausfall in der postischämischen hepatischen Mikrozirkulation ein Parameter zur *in vivo*-Darstellung des IRS der Leber (Kondo et al., 1998; Menger et al., 1999). Als hinreichend belegt gilt, dass der sinusoidale Perfusionsausfall einen Schlüsselmechanismus in der Pathogenese des IRS darstellt (Menger et al., 1992b; Vollmar et al., 1994a; Eipel et al., 2009). In der hier vorliegenden Arbeit wurde der sinusoidale Perfusionsausfall der Leber nach i. v.-Applikation von Natriumfluoreszein untersucht. Dabei bilden die ungefärbten Erythrozyten im mikrovaskulären Strombett der Leber den Gegenkontrast zu dem im hepatozellulären Zytoplasma akkumulierten Fluoreszenzfarbstoff (Vollmar et al., 1994a).

Die Pathophysiologie des IRS ist sehr vielfältig. Verschiedene Mechanismen tragen zur direkten Schädigung der Hepatozyten bei und resultieren in hepatozellulärer Apoptose und Nekrose (Takahashi et al., 2002). Neben der Apoptose, dem programmierten Zelltod, trägt die postischämische Nekrose zur Organdysfunktion bei. Die Grenze zwischen Nekrose und Apoptose ist nicht eindeutig (Columbano, 1995; Clavien et al., 2001) und beide Formen des Zelltodes scheinen beim IRS eine Rolle zu spielen. Auch werden gemeinsame Signalkaskaden diskutiert (Jaeschke et al., 2004). Darüber hinaus wurde berichtet, dass unter bestimmten Umständen sowohl Nekrose als auch Apoptose in einer Zelle im Rahmen einer Leberschädigung auftreten können (Ghavami et al., 2005).

Die Untersuchung der hepatozellulären Apoptose erfolgte zum einen lichtmikroskopisch nach immunhistochemischer Färbung für cleaved Caspase-3, zum anderen intravitalmikroskopisch nach i. v. Applikation von Bisbenzimid. Dieser Fluoreszenzfarbstoff kann schnell aufgenommen werden und färbt nach Einbau den DNA-Doppelstrang. Die Arbeitsgruppe um Vollmar und Mitarbeiter präsentierte 1996 zum ersten Mal die Applikation von Bisbenzimid H33342 für die quantitative Analyse der hepatischen sinusoidalen Perfusion mittels IVM (Vollmar et al., 1996). Studien zeigten aber auch, dass Bisbenzimid gut zur quantitativen *in vivo*-Beurteilung (Eipel et al., 2004; Slotta et al., 2006), aber auch zur *ex vivo*-Beurteilung (Haidara et al., 2002) der Apoptose von Hepatozyten genutzt werden kann.

Für die Untersuchung der hepatozellulären Nekrose wählten wir die H&E-Färbung des nach I/R asservierten Lebergewebes. Es gilt als allgemein akzeptiert, dass Vakuolisierung, Zellschwellung, Zellmembranruptur und Lyse des Zellkerns im histologischen Bild als morphologische Korrelate des nekrotischen Zelltodes gelten (Jaeschke, 2006). Zusätzlich wurden die Plasmaaktivitäten der ausschließlich zytosolisch vorkommenden ALT und der sowohl zytosolisch als auch mitochondrial vorkommenden AST bestimmt. Bei einer Leberzellschädigung sind die Aktivitäten der leberspezifischen Transaminasen erhöht, wobei

die Höhe des Enzymanstiegs meist mit dem Ausmaß der Leberzellschädigung korreliert. Ein plasmatischer Anstieg der ALT zeigt eine akute Schädigung der Hepatozyten an. Kommt es im Rahmen schwerer Schädigung mit Nekrose zusätzlich zur mitochondrialen Beteiligung, wird dies durch einen Anstieg der AST angezeigt. Frühere Studien um Vollmar und Mitarbeiter zeigten auch, dass ein Anstieg der Plasmaaktivität der ALT signifikant mit einer Abnahme des hepatischen Blutflusses korreliert (Vollmar et al., 1994a).

Ebenso wurde die plasmatische Aktivität der in Hepatozyten ausschließlich mitochondrial vorkommende GLDH untersucht. Ein Plasmaanstieg der GLDH zeigt ähnlich wie bei der AST eine schwere Leberzellschädigung mit Leberzelluntergang an. GLDH fungiert dabei als spezieller Marker für einen mitochondrialen Schaden (Minor et al., 2000). In Zusammenschau der histologischen und der laborchemischen Daten konnte im Rahmen dieser Studie ein aussagekräftiges Bild des Ausmaßes der Störung der hepatozellulären Integrität im Rahmen des IRS der Leber aufgezeigt werden.

Es gilt als hinreichend erwiesen, dass es im Rahmen von Leberschädigungen zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 oder TNF- α , in die Blutbahn kommt. Es wird aber auch vermutet, dass diese Zytokine in der hepatischen Antwort auf applizierte körperfremde Stoffe, wie Fluoreszenzfarbstoffe, eine Rolle spielen (Lacour et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass hepatische I/R die Freisetzung von IL-6 provoziert (Martin et al., 2011). Zur Untersuchung der Inflammation nach hepatischer I/R wurde in der hier vorliegenden Arbeit die plasmatische Konzentration des proinflammatorischen Zytokins IL-6 bestimmt. Dieses Zytokin ist ein etablierter und in der experimentellen sowie klinischen Forschung weit verbreiteter Parameter zur Messung proinflammatorischer Reaktionen (Ulich et al., 1989).

Außerdem ist bekannt, dass es im Rahmen von Leberschädigungen, z. B. beim D-GalN/LPS-induzierten septischen Leberschaden (Le Minh et al., 2009), aber auch bei I/R (Menger et al., 2007) zu einer Einschränkung der oxidativen Phosphorylierung im Mitochondrium mit nachfolgender ATP-Depletierung kommt. Die Analyse des hepatischen Energiestatus war daher auch in dieser Arbeit von großem Interesse. Zur Beurteilung dessen wurde das Lebergewebe der einzelnen Versuchstiere asserviert und der Gehalt der verschiedenen energiereichen Phosphate mittels etablierter ATP-Assays bestimmt (Minor et al., 2001).

Die ROS-Entstehung ist eng mit der oxidativen Phosphorylierung verknüpft. Um das Ausmaß des oxidativen Stresses einschätzen zu können, wurde der plasmatische Gehalt an MDA gemessen. MDA entsteht beim Angriff freier Radikale auf ungesättigte Fettsäuren in Biomembranen (Knight et al., 1988) und gilt als ein allgemein akzeptierter Marker für

oxidative Schäden (Janero, 1990; Esterbauer et al., 1990; Thérond et al., 2000; Wu et al., 2010).

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Der Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber

Die Induktion von Leberischämie weist eine Vielzahl an medizinischen Indikationen auf. Wie bereits unter Punkt 3.1 beschrieben, bewirken die verschiedenen Verfahren eine „warme“ bzw. eine „kalte“ Ischämie des Organs.

Im Rahmen des Pringle Manövers kommt es durch Okklusion des Lig. hepatoduodenale zur hepatozellulären Ischämie mit konsekutiver Hypoxie im Leberparenchym. Die Schwere des Leberzellschadens ist abhängig von der Ischämiezeit (Gonzales-Flecha et al., 1993).

Im Rahmen der Reperfusion beobachtet man zwei Mechanismen: einerseits das sog. *no-reflow*-Phänomen, andererseits das sog. *reflow paradox* (Menger, 1991; Menger et al., 1992b). Durch Leukozytenaktivierung mit nachfolgender Transmigration, Zytokinausschüttung und ROS-Produktion entsteht ein weiterer negativer Einfluss auf Kapillarperfusion, Sauerstoffangebot und Energiestoffwechsel (Jaeschke et al., 1996). All dies zusammen führt zu einer konsekutiven Schädigung des Hepatozyten (Mavier et al., 1988).

7.2.2 Mikrozirkulation

Das sinusoidale Perfusionsversagen ist als Schlüsselmechanismus in der Pathogenese der I/R-assoziierten Leberschadens (Vollmar et al., 1994a; Jaeschke et al., 1996c) und des akuten septischen Leberversagens (Eipel et al., 2007; Le Minh et al., 2007) hinreichend bekannt. Verschiedene Mechanismen wurden identifiziert, welche in Antwort auf I/R zum sinusoidalen Perfusionsversagen führen. Dazu zählen Schwellung der SEZ (Vollmar et al., 1994d; Menger et al., 2007) und der KZ, Erhöhung des Gefäßwiderstandes (Braide et al., 1984), Erhöhung der Blutviskosität und Entstehung von Mikrothrombosen (Chien et al., 1985; Menger et al., 1999), Sternzellen-vermittelte Vasokonstriktion (Bauer et al., 1994) und insbesondere die Aktivierung von Leukozyten (Vollmar et al., 1994; Vollmar et al., 1995; Vollmar et al., 1996b).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte nach Induktion von I/R in allen Tieren ein signifikanter sinusoidaler Perfusionsausfall beobachtet werden. Bei den Sham-operierten Tieren zeigten sich physiologische Werte der sinusoidalen Perfusion.

Die Leukozytenstase, für die ein Beitrag zum Perfusionsversagen in den hepatischen Sinusoiden postuliert wird, scheint in erster Linie stark von mechanischen Faktoren, wie SEZ- und KZ-Schwellung, Vasokonstriktion und eingeschränkter Verformbarkeit der

Leukozyten abhängig zu sein (Jaeschke et al., 1997; Jaeschke et al., 2006). Es konnte aber auch gezeigt werden, dass eine sinusoidale Leukozytenstase zwar zu einem erhöhten hämodynamischen Widerstand führt, jedoch nicht signifikant zum Perfusionsversagen beiträgt: In nicht-ischämischen und auch ischämischen Rattenlebern mit nachgewiesener Leukozytenstase war die Mehrzahl der Sinusoide perfundiert ($97\pm 1\%$ vs. $73\pm 5\%$). Hingegen zeigten nur $3\pm 1\%$ bzw. $27\pm 5\%$ der Sinusoide mit Leukozytenstase auch gleichzeitig keine Perfusion (Vollmar et al., 1996b). Das Leukozytenrolling und die Leukozytenadhäsion sind stark von spezifischen Adhäsionsmolekülen abhängig, welche durch proinflammatorische Zytokine induziert werden (Mackey et al., 1993).

Die zentrale Stellung der Leukozyten bei hepatischer I/R ist hinreichend belegt. Von Jaeschke und Mitarbeitern wurde somit postuliert, dass therapeutische Strategien zur Minderung der Leukozytenaktivierung einen idealen Ansatzpunkt in der Prävention und im Management der leukozyteninduzierten Leberschädigung bilden (Jaeschke et al., 2006).

Durch die Induktion von I/R kam es bei den Versuchstieren in der hier vorliegenden Arbeit zu einem deutlichen Anstieg der am Gefäßendothel adhärenenten Leukozyten. Nach Induktion von I/R waren die Leukozytenzahlen bei den UCP2 -/- Mäusen signifikant höher als bei den Wildtyptieren. Ebenso konnte in der hier vorliegenden Studie in beiden Gruppen nach Induktion von I/R ein deutlicher Anstieg der Plasmakonzentration von IL-6 nachgewiesen werden, was die Existenz der I/R-assoziierten Entzündungsantwort belegt.

Heutzutage gilt als akzeptiert, dass Störungen der Mikrozirkulation zu einem unzureichenden Energieangebot mit konsekutiver Beeinträchtigung der Gewebsoxygenierung (Goto et al., 1992) und verminderter ATP-Bildung (Marubayashi et al., 1980) führen. Demzufolge zeigten Studien einen signifikanten Zusammenhang zwischen Mikrozirkulationsstörung, Abnahme der hepatozellulären Integrität, Leberdysfunktion (Vollmar et al., 1994a, Vollmar et al., 1996c) und serologischem Transaminasenanstieg (Goto et al., 1992). Das unterstreicht die Wichtigkeit einer intakten Mikrozirkulation für die adäquate Organintegrität und Organfunktion (Menger et al., 1999). Entsprechend zeigte eine Reihe von Studien einen zytoprotektiven Effekt durch Maßnahmen, welche die Mikrozirkulation verbessern. Beispiele dafür sind die Hämodilution sowie die Gabe von vasoaktiven, antioxidativen oder immunmodulatorischen Substanzen (Teoh et al., 2003; Zhong et al., 1996, Lawlor et al., 1999).

7.2.3 Hepatozelluläre Integrität

Die Frage, welche Form des Zelltodes während „warmer“ I/R vorherrschend ist, konnte bisher nur unzureichend geklärt werden. Beleuchtet man als Entität ausschließlich die hepatische I/R, so ist der Schweregrad entscheidend: Studien zeigten, dass eine lang

anhaltende Organischämie zum konsekutiven ATP-Abbau und zur perizentralen Nekrose führt, wohingegen die Wiederherstellung der Sauerstoff- und ATP-Versorgung bei kürzeren Ischämiezeiten eine perizentrale Apoptose induziert (Paxian et al., 2003). Auch wurde demonstriert, dass in Schweinelebern, welche 180 min „warmer“ Ischämie und 24 h Reperfusion ausgesetzt waren, nur 2,6% der Zellen Zeichen des apoptotischen Zelltodes, jedoch 37% der Zellen Zeichen des nekrotischen Zelltodes aufwiesen (Meguro et al., 2003). Dies steht im Einklang mit Berichten anderer Arbeitsgruppen, die nach 60-120 min „warmer“ Ischämie und 24 h Reperfusion in Rattenlebern bei <1% der Hepatozyten apoptotische, jedoch bei bis zu 57% der Hepatozyten nekrotische Zelltodkriterien feststellen konnten (Gujral et al., 2001). Andererseits existieren auch Studien, welche von 40-50% apoptotischer Hepatozyten nach 60 min Ischämie und 24 h Reperfusion in Rattenlebern berichten (Kohli et al., 1999). Noch komplexer werden die Kontroversen bezüglich Apoptose und Nekrose, wenn man „kalte“ mit „warmer“ Ischämie vergleicht und hierbei die Suszeptibilität von normalen (gesunden) und steatotisch veränderten Lebern untersucht.

Auch werden in der Literatur Mischformen des Zelltodes beschrieben: Die Nekrapoptose (Lemasters et al., 2002) und die Aponekrose (Formigli et al., 2000). Als Ursache für diese Mischformen des Zelltodes werden morphologische Gemeinsamkeiten und gleiche Signalwege diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Jaeschke und Mitarbeiter postulierte diese für Apoptose und Nekrose gemeinsamen Signalkaskaden beim I/R-assoziierten Leberschaden (Jaeschke et al., 2004). Generell gilt, dass die zelluläre ATP-Konzentration für die Entstehung von Apoptose und Nekrose eine wichtige Rolle spielt und die Begriffe Apoptose und Nekrose eher als Extreme anzusehen sind (Vollmar und Menger, 2009).

Zur Untersuchung der Rolle des apoptotischen Zelltodes im Rahmen von „warmer“ hepatischer I/R wurde in dieser Studie die IVM, der immunhistochemische Nachweis der cleaved Caspase-3 und deren molekularbiologische Detektion mittels Western Blot Protein Analyse angewendet. Die cleaved Caspase-3 ist eine Effektorcaspase und dient in der experimentellen Forschung als Marker für den apoptotischen Zelltod. In der IVM konnte einerseits eine höhere Zahl apoptotischer Hepatozyten bei den UCP2 -/- Tieren bereits unter Sham-Bedingungen gezeigt werden. Andererseits zeigte die Immunhistochemie für cleaved Caspase-3 unter Sham-Bedingungen eine signifikant niedrigere Rate an cleaved Caspase-3-positiven Hepatozyten bei den UCP2 -/- Tieren. Äquivalent zeigten jedoch beide Untersuchungstechniken den höheren Grad an apoptotischen Hepatozyten nach Induktion von I/R in der UCP2 -/- Gruppe. Auf molekularer Ebene ließ sich dies jedoch nur in der Tendenz belegen. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich vermuten, dass mit einer 30-minütigen Ischämie und 60-minütigen Reperfusion das Zeitfenster für eine deutliche Steigerung der Genexpression für proapoptische Enzymsysteme zu klein ist.

Als Marker der hepatozellulären Integrität wurde die plasmatischen Aktivitäten der ALT, AST und der GLDH untersucht, wobei ein Plasmaanstieg der AST und der GLDH einen sehr schweren Leberzellschaden anzeigt (Minor et al., 2000) und ein plasmatischer Anstieg der ALT auf eine Abnahme des hepatischen Blutflusses hindeutet (Vollmar et al., 1994a). Für ALT und GLDH konnten nach Induktion von I/R signifikante Anstiege gegenüber den jeweils Sham-operierten Tieren der einzelnen Gruppen nachgewiesen werden. In der lichtmikroskopischen Analyse nach H&E-Färbung des Lebergewebes zeigten sich nach Induktion von I/R in den Gruppen beider genetischer Hintergründe Anzeichen der Nekrose. Dem liegt die Annahme zugrunde, dass eine geschwollene Zelle mit Vakuolisierung des Zytoplasmas, Karyolyse und Karyorrhexis nekrotisch untergeht.

Die laborchemischen Daten zeigen zusammen mit den Ergebnissen der intravitalmikroskopischen, histologischen, immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen in der hier vorliegenden Studie übereinstimmend mit der genannten Literatur die Existenz beider Zelltodarten nach „warmer“ hepatischer I/R.

7.2.4 Hepatozellulärer Energiestatus

Die Elektronentransportkette befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und ist an den ATPase-Komplex gekoppelt. Mit dem Ziel der oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Gewinnung konnten die Mitochondrien einerseits als Hauptentstehungsort von ROS, andererseits aber auch als Angriffspunkt für ROS identifiziert werden (Paraidathathu et al., 1992; Zhang et al., 2007). Die dabei auftretende Schädigung von mitochondrialen Proteinen führt zur einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit des Mitochondriums (Kroemer et al., 2007). Studien belegen, dass eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion mit einer konsekutiven Abnahme des hepatischen Energiestatus und nachfolgend mit einer Aggravierung der Schädigung durch I/R einhergeht (Evans et al., 2009). Eine Vielzahl an Untersuchungen zeigte eine Beeinträchtigung der ATP-Regeneration beim postischämischen Reperfusionsschaden der Leber (Jaeschke et al., 1990; Vollmar et al., 1994a; Rolo et al., 2009). In einer Reihe von Studien konnte der Einfluss des mitochondrialen Proteins UCP2 auf den Ablauf und das Ausmaß der oxidativen Phosphorylierung bei der ATP-Gewinnung gezeigt werden. So erbrachten Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Zhang und Mitarbeiter, dass die Hochregulation von UCP2 und die konsekutive Zytotoxizität u. a. durch ROS vermittelt werden (Zhang et al., 2007). Die Arbeitsgruppe von Chavin und Mitarbeitern belegten mit ihren Analysen, dass Adipositas einerseits die UCP2-Expression in Hepatozyten steigert, andererseits den Abbau von ATP fördert und damit die Rate hepatozellulärer Nekrose während hepatischer Ischämie ansteigt (Chavin et al., 1999). Studien an verschiedenen Fettleber-Modellen zeigten, dass durch Hochregulation von UCP2

die Effektivität der ATP-Synthese sinkt und damit die Anfälligkeit der Hepatozyten gegenüber der Nekrose steigt (Rashid et al., 1999).

Auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Induktion von I/R zu einer signifikanten Abnahme der ATP-Konzentration in der UCP2 +/+ Gruppe als auch in der UCP2 -/- Gruppe führt. Darüber hinaus ergaben die Untersuchungen dieser Studie eine höhere ATP-Konzentration der Lebern der UCP2 -/- Sham Tiere im Vergleich zu denen der UCP2 +/+ Sham Gruppe. Dieser Unterschied ließ sich bereits in vorherigen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe im Rahmen des septischen Leberversagens beobachten (Le Minh et al., 2009) und ist konkordant mit den Funktionen von UCP2.

7.2.5 Die Rolle des mitochondrialen Proteins UCP2 beim Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber

Die Erstbeschreibung der UCPs begann bereits vor über 30 Jahren mit der Charakterisierung des mitochondrialen Proteins UCP1 (Ricquier und Kader, 1976). Bis 1999 konnten weitere vier Entkopplerproteine durch andere Studien beschrieben werden. 1997 erfolgte die Beschreibung von UCP2 auf Chromosom 7 der Maus und auf Chromosom 11 des Menschen (Fleury et al., 1997). Die Expression von UCP1, UCP3, UCP4 und UCP5 ist auf wenige Organe beschränkt (siehe 3.2.1). UCP2 hingegen lässt sich ubiquitär nachweisen (Ricquier und Bouillaud, 2000). Die vermuteten Funktionen von UCP2 waren Inhalt vieler unterschiedlicher Studien in den letzten Jahren.

Aufgrund der Lokalisation von UCP2 auf Chromosom 7 der Maus, fest verknüpft mit den sog. *tubby mutations*, wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen UCP2-Expression, Adipositas und Hyperinsulinämie gezeigt (Fleury et al., 1997). Das TUB-Gen kodiert für die *tubby proteins*. Der Name leitet sich von deren Rolle als Transkriptionsfaktoren im Metabolismus ab: Mäuse mit einer Mutation im *tubby gene* entwickeln Adipositas, Retinadegeneration und Hörverluste (Boggon et al., 1999). β -Zellen des Pankreas bewirken über ihren Glukosemetabolismus eine Erhöhung des ATP/ADP-Verhältnisses mit anschließender Insulinsekretion (Ashcroft and Gribble, 1999; Matschinsky et al., 1998). Wie bereits beschrieben, bewirkt UCP2 eine Entkopplung der Atmungskette mit nachfolgender Abnahme der ATP-Produktion (Rousset et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass UCP2 -/- Mäuse höhere ATP-Levels in den β -Zellen und somit eine erhöhte Glukose-stimulierte Insulinsekretion aufweisen. Dies führte zu der Annahme, dass UCP2 die Insulinsekretion negativ reguliert und als Schlüsselmechanismus bei der Blutglukosewahrnehmung der pankreatischen β -Zellen fungiert. Ein kritischer Zusammenhang zwischen Adipositas, β -Zelldysfunktion und Diabetes mellitus Typ 2 wurde postuliert (Zhang et al, 2001). In Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe konnte eine Protektion durch den *knock out* von UCP2

im Rahmen des septischen Leberschadens aufgrund der höheren hepatozellulären Rate an ATP festgestellt werden (Le Minh et al., 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass UCP2 -/-

Mäuse resistent gegen eine Infektion mit *Toxoplasma gondii* sind. Verantwortlich dafür wird eine erhöhte UCP2 -/- Makrophagenaktivität mit nachfolgend erhöhter ROS-Produktion und erhöhter Eliminationsrate von *Toxoplasma gondii* gemacht (Arsenijevic et al., 2000). Weiterhin wurde eine Funktion von UCP2 in der Genese von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen postuliert. Studien zur Multiplen Sklerose zeigten, dass der *knock out* von UCP2 bei dieser Krankheitsentität mit höheren Raten an B- und T-Zellaktivität, höheren Aktivitäten proinflammatorischer Zytokine und einer erhöhten ROS-Produktion einhergeht und es dadurch zu ausgeprägteren Krankheitsverläufen im Vergleich zu den Wildtyptieren kommt (Vogler et al., 2006). Auf der anderen Seite wird bei zerebraler Ischämie eine Protektion durch den UCP2 *knock out* beschrieben: In der Mikroglia von Wildtypmäusen wurde nach der zerebralen Ischämie ein geringeres Level an mitochondrialem Glutathion (GSH) als bei UCP2 -/- Mäusen nachgewiesen, welche dadurch weniger ausgeprägte Krankheitsverläufe aufwiesen (de Bilbao et al., 2004). Studien anderer Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit der Transplantation von steatotisch veränderten Lebern und gesunden Spenderlebern bei Ratten. Steatotische Lebertransplantate zeigten eine erhöhte Rate an TNF- α und eine Hochregulation von UCP2, was in einer massiven hepatozellulären Nekrose mit konsekutiver akuter Rejektion am fünften Tag *post transplantationem* mündete (Uchino et al., 2004). Darauf basierend postulieren Serviddio und Mitarbeiter, dass bei NASH UCP2 die Anfälligkeit auf die I/R-assoziierte Schädigung erhöht (Serviddio et al., 2008) und durch Hemmung der UCP2-Expression eine Milderung des Schadens nach I/R erreicht werden kann (Wan et al., 2008).

Wie all diese unterschiedlichen Studien zeigen, sind die Funktionen von UCP2 im Metabolismus gesunder Tiere und bei den verschiedensten Krankheitsentitäten sehr vielfältig und werden oft kontrovers diskutiert. Die hier vorliegende Studie diente dazu, die Rolle des mitochondrialen Proteins UCP2 im Rahmen des IRS der nicht vorgeschädigten Leber anhand eines etablierten Mausmodells näher zu charakterisieren.

Erstens kam es in dieser Studie nach Induktion von hepatischer I/R sowohl bei den UCP2 +/+ als auch bei den UCP2 -/- Tiere zu einem signifikanten Abfall der sinusoidalen Perfusion im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren. Kein wesentlicher Unterschied konnte für die sinusoidale Perfusionsrate in Abhängigkeit der Expression von UCP2 nach I/R festgestellt werden. Zweitens zeigte sich in Antwort auf I/R eine stärkere proinflammatorische Reaktion in den UCP2 -/- Tieren im Vergleich zu den Wildtyptieren. Gemessen wurde dies einerseits

an einem deutlicheren Anstieg der venolär rollenden und adhärenen Leukozyten in den UCP2 $-/-$ Tieren, andererseits an einer höheren plasmatischen Aktivität des proinflammatorischen Zytokins IL-6 unter UCP2 *knock out*, jeweils im Vergleich zur

Wildtypgruppe. Bereits unter Sham-Bedingungen zeigte sich in der UCP2 $-/-$ Gruppe eine signifikant höhere plasmatische IL-6-Konzentration als bei den UCP2 $+/+$ Tieren. Das lässt sich mit Studien vereinbaren, welche über die Beeinflussung des Zytokinmusters des angeborenen Immunsystems durch UCP2 berichten: Bei einer Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass UCP2 $-/-$ Mäuse mildere Krankheitsverläufe in den ersten Tagen *post infectionem* zeigen und auch einen Überlebensvorteil gegenüber den Wildtypmäuse haben (Rousset et al., 2006). Begründet wird dies damit, dass die Infektion in der Frühphase vorwiegend eine Antwort des angeborenen Immunsystems triggert (v. a. Makrophagen) und erst nach vier bis fünf Tagen das erworbene Immunsystem überwiegend agiert (Kaufmann, 1993). Daraus schlussfolgernd wird postuliert, dass das angeborene Immunsystem bei UCP2 $-/-$ Mäusen eine höhere Effektivität als bei Wildtyptieren aufweist (Rousset et al., 2006). Mit dieser Annahme lässt sich auch die in dieser Studie unter Sham-Bedingungen gemessene, signifikant erhöhte IL-6-Konzentration in den UCP2 $-/-$ Mäusen erklären.

Der Zusammenhang zwischen mitochondrialer Atmungskette, aufgebautem elektrochemischem Gradienten und dessen Entkopplung vom ATP-Synthase-Komplex durch UCP2 ist in der Literatur hinreichend beschrieben (Nicholls und Locke, 1984; Nègre-Salvayre et al., 1997; Boss et al., 1998; Rousset et al., 2004). Eine erhöhte Expression von UCP2 führt zu einer Abnahme von ATP in den Mitochondrien der Leber (Lemasters et al., 1997). Es gilt als akzeptiert, dass einerseits die hepatozelluläre ATP-Konzentration von der mitochondrialen UCP2-Expression abhängig ist. Andererseits ist der ATP-Gehalt aber auch für die Aufrechterhaltung der hepatozellulären Integrität nach I/R wichtig. Entsprechend konnte gezeigt werden, dass in Stresssituationen, z. B. bei I/R, die Überexpression von UCP2 zu einem schweren hepatozellulären Schaden aufgrund von ATP-Mangel führt (Rashid et al., 1999; Clavien und Selzner, 2002). Bei der Untersuchung der Sham-operierten Tiere in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die UCP2 $-/-$ Mäuse im Vergleich zu denen der UCP2 $+/+$ Gruppe einen deutlich höheren Gehalt an ATP aufweisen. Dies steht in Einklang mit der Literatur, wo bei Studien zur hepatozellulären Apoptose über eine limitierte ATP-Produktion unter UCP2-Aktivität berichtet wird (Kroemer et al., 1998) und unter UCP2-Defizienz ein erhöhter protonen elektrochemischer Gradient erreicht wird, der eine stärkere ATP-Synthese antreibt (Rousset et al., 2004). Konsekutiv führte die Induktion von I/R dann in der UCP2 $+/+$ Gruppe ebenso wie in den UCP2 $-/-$ Mäusen zu einem signifikanten Abfall der hepatozellulären ATP-Konzentration.

Neben dem hepatozellulären ATP-Gehalt gilt auch das ATP/ADP-Verhältnis als Marker für den Energiezustand der Zelle (Brealey et al., 2004; Crumm et al., 2008). Im Ruhezustand der Zelle ist der ATP-Pool gefüllt und weist einen hohen Wert zugunsten von ATP auf. Ein Abfall des ATP/ADP-Verhältnisses würde einen Verbrauch der ATP-Reserven bis hin zum

Mangel an energiereichen Phosphaten widerspiegeln. Das konnten wir in der hier vorliegenden Studie auch beobachten: Infolge von I/R kam es zu einem signifikanten Abfall des ATP/ADP-Verhältnisses in den UCP2 $+/+$ wie auch den UCP2 $-/-$ Mäusen. Erwartungsgemäß war auch der Abfall des ATP/ADP-Verhältnisses nach Induktion von I/R in der UCP2 $-/-$ Gruppe deutlicher.

Eng verknüpft mit der mitochondrialen ATP-Synthese ist die Entstehung von ROS mit nachfolgendem oxidativem Stress für die Zelle und den Gesamtorganismus. Unter UCP2-Defizienz kommt es zu einem höheren protonenelektrochemischen Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran und konsekutiv zu einer gesteigerten ATP-Syntheserate (Rousset et al., 2004). Daraus resultiert eine erhöhte ROS-Produktion. Die Zelle ist damit einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt.

Viele frühere Arbeiten haben die vielfältigen Funktionen von UCP2 u. a. zur Insulinsekretion, Immunzellfunktion und zur Entstehung von Adipositas bzw. Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben (Alves-Guerra et al., 2003; Parton et al., 2007; Pi et al., 2009; Derdak et al., 2008). Für UCP2 wird dabei stets angenommen, dass es seine maßgebliche Funktion über die Entkopplung der Atmungskette mit daraus resultierender Pufferfunktion bzgl. der ROS-Entstehung ausübt (Pecqueur et al., 2001; Andrews et al., 2008; Diao et al., 2008). Tatsächlich zeigten Studien an UCP2 $-/-$ Mäuse, dass diese einem höheren oxidativem Stress und einer geringeren Rate an zirkulierendem Glutathion ausgesetzt waren (Negre-Salvayre et al., 1997; Pi et al., 2009). Entsprechend zeigen Studien mit UCP2-Überexpression in Kardiomyozyten (Teshima et al., 2003) und in Neuronen (Sullivan et al., 2004) eine Protektion gegen ROS und den ROS-assoziierten Zelltod. Auch konnte in Krebszellen gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von UCP2 mit einer Arzneimittelresistenz einhergeht. Begründet wird dies wiederum mit der Pufferfunktion von UCP2 gegenüber ROS (Mailloux et al., 2010; Harper et al., 2002).

Zur Quantifizierung des oxidativen Stresses nutzten wir in der hier vorliegenden Arbeit die Messung von MDA (Janero, 1990). MDA ist ein Endabbauprodukt der Lipidperoxidation und entsteht, wenn freie Radikale mit ungesättigten Fettsäuren aus Biomembranen reagieren (Knight et al., 1988). Unsere Ergebnisse zeigen, dass einerseits unter Sham-Bedingungen der ATP-Gehalt (und auch das ATP/ADP-Verhältnis) der UCP2 $-/-$ Tiere deutlich höher war als der der entsprechenden Wildtypiere, andererseits die MDA-Produktion und damit der oxidative Stress in den UCP2 $-/-$ Tieren deutlich geringer ausfällt. Nach Induktion von I/R

steigt in den Tieren der UCP2 $-/-$ Gruppe jedoch die plasmatische MDA-Konzentration stärker an als bei den Tieren der UCP2 $+/+$ Gruppe. Auch ließ sich in den *knock out*-Tieren im Vergleich zu den Wildtypmäusen ein stärkerer Abfall des ATP-Gehaltes (und auch des ATP/ADP-Verhältnisses) in der Antwort auf I/R beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die in der UCP2 $-/-$ Sham-Gruppe signifikant höhere ATP-Konzentration die Tiere

möglicherweise dazu befähigt, den nach Induktion von I/R höheren Grad an oxidativem Stress zu bekämpfen, ohne letztendlich einen messbaren Vorteil aus dieser initial höheren Energiereserve ziehen zu können. Entsprechend ließ sich an einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe beim D-GalN/LPS-induzierten septischen Leberschaden zeigen, dass unter UCP2-Defizienz die hepatozelluläre Energiereserve höher ist und dadurch eine Schadenslinderung erreicht wird (Le Minh et al., 2009).

Basierend auf den Ergebnissen der hier vorliegenden Studie lässt sich zusammenfassend ein modulierender Einfluss von UCP2 auf den hepatozellulären Energiezustand postulieren. Die höhere hepatozelluläre Energiereserve in Form von ATP ermöglicht es den UCP2 $-/-$ Tieren potenziell schädigenden Einflüssen, wie z. B. oxidativem Stress, besser zu begegnen.

7.3 Schlussfolgerungen

Die hier vorliegende Studie wurde durchgeführt, um die Rolle des mitochondrialen Proteins UCP2 im Rahmen des IRS der gesunden Leber zu untersuchen. Zusätzlich zu den *in vivo* erhobenen Daten mittels IVM führten wir laborchemische, histologische, immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen durch. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen vermuten:

1. Der *knock out* von UCP2 hatte keinen wesentlichen Einfluß auf den Ausprägungsgrad des sinusoidalen Perfusionsversagens nach Induktion von I/R.
2. I/R bewirkte eine höhere inflammatorische Antwort und einen höheren Grad an oxidativem Stress unter UCP2 *knock out*-Bedingungen.
3. Unabhängig von der UCP2-Expression zeigten sich nach I/R sowohl hepatozelluläre Apoptose als auch Nekrose. Die unter Sham- und UCP2 *knock out*-Bedingungen signifikant höhere hepatozelluläre ATP-Konzentration erbrachte keinen Vorteil bzgl. der Ausprägung der hepatozellulären Schädigung.
4. Das mitochondriale Protein UCP2 hatte keinen Einfluß auf die Gesamtausprägung des Parenchymschadens nach „warmer“ I/R. Es kann daher gefolgert werden, dass UCP2 von eher geringer Relevanz für die Entstehung und das Ausmaß des hepatischen IRS ist und dass all die Mechanismen, welche zur Entstehung des IRS beitragen, durch UCP2 nicht maßgeblich beeinflusst werden (Evans et al., 2008).

7.4 Perspektiven

In der hier vorliegenden Studie wurden die Manifestation und das Ausmaß des hepatischen IRS in Abhängigkeit von der Expression des mitochondrialen Proteins UCP2 analysiert.

Defekte der Mitochondrien führen zum Versagen des zellulären Energiestoffwechsels und spielen heute eine wichtige Rolle in der klinischen Medizin. Primäre Atmungskettendefekte betreffen die Strukturuntereinheiten der Atmungskette selbst. Dies konnte z. B. anhand der Mutation im mitochondrialen Gen ATP8 eines Menschen gezeigt werden, da die Mutation mit einer hypertrophischen Kardiomyopathie und einer Neuropathie einhergeht (Jonckheere et al., 2008). Krankheiten mit Defekten der Atmungskette sind vorwiegend in Organen mit hohem Energieumsatz, z. B. im ZNS (Enzephalomyopathie), am Muskel (infantile Myopathie) und auch am Herz (Larson und Luft, 1999) anzutreffen.

Außerdem stellt die Abnahme der mitochondrialen Funktion einen Schlüsselmechanismus in Alterungsprozessen dar und erhöht darüber hinaus die Anfälligkeit des Organismus für altersbedingte Schädigungen. Ein besseres Verständnis der komplexen Funktionsmechanismen des Mitochondriums und des mitochondrialen Genoms ist daher elementar zum Verständnis der Pathophysiologie mitochondrialer Störungen (Seo et al., 2010).

Die Vielfalt und Heterogenität der Mitochondriopathien zeigt die Bedeutsamkeit für Klinik und Forschung in diesem Bereich. Die Aufklärung über die Bedeutung und Funktion der einzelnen mitochondrialen Proteine kann dabei einen entscheidenden Beitrag leisten.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adkison D, Höllwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN. Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:101-107.
2. Alves-Guerra MC, Rousset S, Pecqueur C, Mallat Z, Blanc J, Tedgui A, Bouillaud F, Cassard-Doulcier AM, Ricquier D, Miroux B. Bone marrow transplantation reveals the in vivo expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 in immune and nonimmune cells during inflammation. *J Biol Chem* 2003;278:42307-42312.
3. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschöp MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 2008;454:846-851.
4. Aii S, Teramoto K, Kawamura T. Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:189-194.
5. Arnold JT, Daw NC, Stenberg PE, Jayawardene D, Srivastava DK, Jackson CW. A single injection of pegylated murine megakaryocyte growth and development factor (MGDF) into mice is sufficient to produce a profound stimulation of megakaryocyte frequency, size, and ploidy. *Blood* 1997;89:823-833.
6. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 2000;26:435-439.
7. Ashcroft FM, Gribble FM. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 1999;42:903-919.
8. Bauer M, Zhang JX, Bauer I, Clemens MG. ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. *Am J Physiol* 1994;267:143-149.
9. Bautista AP, Spitzner JJ. Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion. *Free Radic Res Commun* 1992;17:195-209.
10. Bechstein WO, Neuhaus P. Bleeding problems in liver surgery and liver transplantation. *Chirurg* 2000;71:363-368.
11. Biberthaler P, Luchting B, Massberg S, Teupser D, Langer S, Leiderer R, Krombach F, Messmer K. Ischemia at 4 degrees C: a novel mouse model to investigate the effect of hypothermia on postischemic hepatic microcirculatory injury. *Res Exp Med* 2001;200:93-105.

12. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000;32:508-515.
13. Bilzer M, Schauer RJ, Gerbes AL. Prävention von Ischämie- Reperfusionsschäden: Schutz der Leber bei Resektion und Transplantation. *Dtsch Arztebl* 2002;99:A-1980/B-1669/C-1563.
14. Bismuth H, Castaing D, Garden OJ. Major hepatic resection under total vascular exclusion. *Ann Surg* 1989;210:13-19.
15. Blumhardt G, Ringe B, Bechstein WO, Pichlmayr R. Current clinical management of organoprotection in hepatic surgery. *Klin Wochenschr* 1986;64:144-145.
16. Boggon TJ, Shan WS, Santagata S, Myers SC, Shapiro L. Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis. *Science* 1999;286:2119-2125.
17. Bolmsjo M, Hafstrom L, Hugander A, Persson B. Measurement of blood flow in rat liver with Xenon-133. *Int J Microcirc Clin Exp* 1983;2:27-37.
18. Bordel R, Laschke MW, Menger MD, Vollmar B. Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Hum Reprod* 2006;21:610-617.
19. Boss O, Samec S, Paolonigiacobino A, Rossier C, Dulloo AG, Seydoux J, Muzzin P, Giacobino JP. Uncoupling protein-3: A new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. *FEBS Lett* 1997;408:39-42.
20. Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol* 1998;139:1-9.
21. Braide M, Amundson B, Chien S, Bagge U. Quantitative studies on the influence of leukocytes on the vascular resistance in a skeletal muscle preparation. *Microvasc Res* 1984;27:331-352.
22. Brealey D, Karyampudi S, Jacques TS, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286:491-497.
23. Brown MF, Zibari G, Burney D, Granger DN, McDonald JC. Hepatic ischemia/reperfusion affects leukocyte rolling and velocity. *Clin Transplant* 1997;11:511-515.
24. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. *Hepatology* 1989;10:292-299.
25. Cardenas A. Hepatorenal syndrome: A dreaded complication of end-stage liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:460-467.

26. Chappell D, Beiras-Fernandez A, Hammer C, Thein E. In vivo visualization of the effect of polyclonal antithymocyte globulins on the microcirculation after ischemia/reperfusion in a primate model. *Transplantation* 2006;81:552-558.
27. Chavin KD, Yang S, Lin HZ, Chatham J, Chacko VP, Hoek JB, Walajtys-Rode E, Rashid A, Chen CH, Huang CC, Wu TC, Lane MD, Diehl AM. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion. *J Biol Chem* 1999;274:5692-5700.
28. Clavien PA, Rüdiger HA, Selzner M. Mechanism of hepatocyte death after ischemia: apoptosis versus necrosis. *Hepatology* 2001;33:1555-1557.
29. Clavien PA, Selzner M. Hepatic steatosis and transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:980.
30. Chien KR, Abrams J, Pfau RG, Farber JL. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am J Pathol* 1977;88:539-557.
31. Chien S. The Microcirculatory Society Eugene M. Landis Award lecture. Role of blood cells in microcirculatory regulation. *Microvasc Res* 1985;29:129-151.
32. Chiu C, Toledo-Pereyra LH. Effect of catalase and/or allopurinol, or N-t-butyl-alpha-phenylnitron on hepatic ischemia. *Transplant Proc* 1987;19:1077-1079.
33. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997;8:80-85.
34. Columbano A. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cell Biochem* 1995;58:181-190.
35. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
36. Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Anthony Thompson J, Eckhoff DE. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery* 2004;136:390-400.
37. Crumm S, Cofan M, Juskeviciute E, Hoek JB. Adenine nucleotide changes in the remnant liver: An early signal for regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 2008;48:898-908.
38. Cservenka A, Spangler E, Cote DM, Ryabinin AE. Postnatal developmental profile of urocortin 1 and cocaine-and amphetamine-regulated transcript in the periculomotor region of C57BL/6J mice. *Brain Res* 2010;1319:33-43.
39. de Bilbao F, Arsenijevic D, Vallet P, Hjelle OP, Ottersen OP, Bouras C, Raffin Y, Abou K, Langhans W, Collins S, Plamondon J, Alves-Guerra MC, Haguenaer A, Garcia I, Richard D, Ricquier D, Giannakopoulos P. Resistance to cerebral ischemic injury in UCP2 knockout mice: evidence for a role of UCP2 as a regulator of mitochondrial glutathione levels. *J Neurochem* 2004;89:1283-1292.

40. Derdak Z, Mark NM, Beldi G, Robson SC, Wands JR, Baffy G. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res* 2008;68:2813-2819.
41. Diao J, Allister EM, Koshkin V, Lee SC, Bhattacharjee A, Tang C, Giacca A, Chan CB, Wheeler MB. UCP2 is highly expressed in pancreatic alpha-cells and influences secretion and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:12057-12062.
42. Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002;415:96-99.
43. Eguchi H, McCuskey PA, McCuskey RS. Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology* 1991;13:751-757.
44. Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:769-776.
45. Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P, Vollmar B. Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers. *Ann Surg* 2005;241:477-484.
46. Eipel C, Kidess E, Abshagen K, Le Minh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosaminesensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 2007;151:406-413.
47. Eipel C, Hardenberg J, Negendank S, Abshagen K, Vollmar B. Thrombopoietin limits IL-6 release but fails to attenuate liver injury in two hepatic stress models. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009;21:923-931.
48. Endo Y, Shibazaki M, Yamaguchi K, Kai K, Sugawara S, Takada H, Kikuchi H, Kumagai K. Enhancement by galactosamine of lipopolysaccharide(LPS)-induced tumour necrosis factor production and lethality: its suppression by LPS pretreatment. *Br J Pharmacol* 1999;128:5-12.
49. Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak,LP. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold- sensitive but not obese. *Nature* 1997;387:90-94.
50. Essani NA, Fisher MA, Farhood A, Manning AM, Smith CW, Jaeschke H. Cytokine-induced upregulation of hepatic intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA expression and its role in the pathophysiology of murine endotoxin shock and acute liver failure. *Hepatology* 1995;21:1632-1639.

51. Essani NA, Bajt ML, Vonderfecht SL, Farhood A, Jaeschke H. Transcriptional activation of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene in vivo and its role in the pathophysiology of neutrophil-induced liver injury in murine endotoxin shock. *J Immunol* 1997;158:5941-5948.
52. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-421.
53. Evans ZP, Ellett JD, Schmidt MG, Schnellmann RG, Chavin KD. Mitochondrial uncoupling protein-2 mediates steatotic liver injury following ischemia/reperfusion. *J Biol Chem* 2008;283:8573-8579.
54. Evans ZP, Mandavilli BS, Ellett JD, Rodwell D, Fariss MW, Fiorini RN, Schnellmann RG, Schmidt MG, Chavin K. Vitamin E succinate enhances steatotic liver energy status and prevents oxidative damage following ischemia/reperfusion. *Transplant Proc* 2009;41:4094-4098.
55. Flaherty JT, Weisfeldt ML. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1988;5:409-419.
56. Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, Levi-Meyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997;15:269-272.
57. Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 2000;182:41-49.
58. Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases-detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005;11:337-345.
59. Gimeno RE, Dembski M, Weng X, Deng N, Shyjan AW, Gimeno CJ, Iris F, Ellis SJ, Woolf EA, Tartaglia LA. Cloning and characterization of an uncoupling protein homolog: a potential molecular mediator of human thermogenesis. *Diabetes* 1997;46:900-906.
60. Glanemann M, Strenziok R, Kuntze R. Ischemic preconditioning and methylprednisolone both equally reduce hepatic ischemia/ reperfusion injury. *Surgery* 2004;135:203-214.
61. Gong DW, Monemdjou S, Gavrilova O, Leon LR, Marcus-Samuels B, Chou CJ, Everett C, Kozak LP, Li C, Deng C, Harper ME, Reitman ML. Lack of obesity and normal response to fasting and thyroid hormone in mice lacking uncoupling protein-3. *J Biol Chem* 2000;275:16251-16257.

62. González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993;91:456-464.
63. Goto M, Kawano S, Yoshihara H, Takei Y, Hijioka T, Fukui H, Matsunaga T, Oshita M, Kashiwagi T, Fusamoto H, Kamada T, Sato N. Hepatic tissue oxygenation as a predictive indicator of ischemia-reperfusion liver injury. *Hepatology* 1992;15:432-437.
64. Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;55:662-675.
65. Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1962;22:842-849.
66. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001;33:397-405.
67. Häussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* 1996;313:697-710.
68. Haidara K, Morel I, Abalea V, Gascon Barre M, Denizeau F. Mechanism of tert-butylhydroperoxide induced apoptosis in rat hepatocytes: involvement of mitochondria and endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 2002;1542:173-185.
69. Hanschen M, Zahler S, Krombach F, Khandoga A. Reciprocal activation between CD4+ T cells and Kupffer cells during hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 2008;86:710-718.
70. Harper ME, Antoniou A, Villalobos-Menuey E, Russo A, Trauger R, Vendemelio M, George A, Bartholomew R, Carlo D, Shaikh A, Kupperman J, Newell EW, Bespalov IA, Wallace SS, Liu Y, Rogers JR, Gibbs GL, Leahy JL, Camley RE, Melamede R, Newell MK. Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *FASEB J* 2002;16:1550-1557.
71. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur J Med Res* 2002;7:117-124.
72. Heaton GM, Wagenvoord RJ, Kemp A Jr, Nicholls DG. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur J Biochem* 1978;82:515-521.
73. Heidenhain C, Heise M, Jonas S, Ben-Asseur M, Puhl G, Mittler J, Thelen A, Schmidt S, Langrehr J, Neuhaus P. Retrograde reperfusion via vena cava lowers the risk of initial nonfunction but increases the risk of ischemic-type biliary lesions in liver transplantation--a randomized clinical trial. *Transpl Int* 2006;19:738-748.

74. Himms-Hagen J. Brown adipose tissue thermogenesis and obesity. *Prog Lipid Res* 1989;28:67-115.
75. Hirsch J, Hansen KC, Choi S. Warm ischemia induced alterations in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffer cells in rats. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:979-986.
76. Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, Jobard J, Gramaglia M, Lasserre M. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery* 1992;111:251-259.
77. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992;16:454-461.
78. Jabůrek M, Varecha M, Gimeno RE, Dembski M, Jezek P, Zhang M, Burn P, Tartaglia LA, Garlid KD. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem* 1999;274:26003-26007.
79. Jaeschke H, Smith CV, Mitchell JR. Reactive oxygen species during ischemia-reperfusion injury in isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 1988;81:1240-1246.
80. Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;160:140-147.
81. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990;4:3355-3359.
82. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ. Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Comm* 1991a;15:277-284.
83. Jaeschke H. Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 1991b;79:115-136.
84. Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol.* 1991c;260:355-362.
85. Jaeschke H, Gujral JS, Bajt ML. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int* 2004;24:85-89.
86. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress- induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;209:104-111.
87. Jaeschke H, Farhood A, Fisher MA, Smith CW. Sequestration of neutrophils in the hepatic vasculature during endotoxemia is independent of beta 2 integrins and intercellular adhesion molecule-1. *Shock* 1996a;6:351-356.
88. Jaeschke H. Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 1996b;25:774-780.

89. Jaeschke H, Essani NA, Fisher MA, Vonderfecht SL, Farhood A, Smith CW. Release of soluble intercellular adhesion molecule 1 into bile and serum in murine endotoxin shock. *Hepatology* 1996c;23:530–536.
90. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biol* 1997;61:647-653.
91. Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998;5:402-408.
92. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:15-26.
93. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003b;125:1246–1257.
94. Jaeschke H, Gujral JS, Bajt ML. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int* 2004;24:85-89.
95. Jaeschke H, Hasegawa T. Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 2006;26:912-919.
96. Jaeschke H. Mechanisms of liver cell destruction. In “Zakim and Boyer’s hepatology: A textbook of liver disease”. Editors: Boyer TD, Wright TL, Manns MP. Saunders Elsevier Philadelphia 2006:37-51.
97. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990;9:515-540.
98. Jarmuszkiewicz W, Milani G, Fortes F, Schreiber AZ, Sluse FE, Vercesi AE. First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Lett* 2000;467:145-149.
99. Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Hryniewiecka L, Sluse FE. Identification and characterization of a protozoan uncoupling protein in *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* 1999;274:23198-23202.
100. Jonckheere AI, Hogeveen M, Nijtmans LG, van den Brand MA, Janssen AJ, Diepstra JH, van den Brandt FC, van den Heuvel LP, Hol FA, Hofste TG, Kapusta L, Dillmann U, Shamdeen MG, Smeitink JA, Rodenburg RJ. A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *J Med Genet* 2008;45:129-133.
101. Kaufmann SH. Immunity to intracellular bacteria, *Annu Rev Immunol* 1993;129–163.
102. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemic reperfusion injury: A review. *Microsurgery* 1993;14:165-175.
103. Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, Hutter J, Messmer K, Krombach F. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002;18:529-535.

104. Khandoga A, Biberthaler P, Messmer K, Krombach F. Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc Res* 2003;65:71-77.
105. Khandoga A, Enders G, Luchting B, Axmann S, Minor T, Nilsson U, Biberthaler P, Krombach F. Impact of intraischemic temperature on oxidative stress during hepatic reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2003b;35:901-909.
106. Kim YI. Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003;10:195-199.
107. Klar E, Kraus T, Bredt M, Osswald B, Senninger N, Herfarth C, Otto G. First clinical realization of continuous monitoring of liver microcirculation after transplantation by thermodiffusion. *Transpl Int* 1996;9:140-143.
108. Klingenberg M, Appel M. The uncoupling protein dimer can form a disulfide cross-link between the mobile C-terminal SH groups. *Eur J Biochem* 1989a;180:123-131.
109. Klingenberg M. Molecular aspects of the adenine nucleotide carrier from mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1989b;270:1-14.
110. Knight JA, Pieper RK, Mc Clellan L. Specificity of the Thiobarbituric Acid Reaction: Its Use in Studies of Lipid Peroxidation. *Clin Chem*, 1988;34:2433- 2438.
111. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999;67:1099-1105.
112. Koeppel TA, Trauner M, Baas JC, Thies JC, Schlosser SF, Post S, Gebhard MM, Herfarth C, Boyer JL, Otto G. Extrahepatic biliary obstruction impairs microvascular perfusion and increases leukocyte adhesion in rat liver. *Hepatology* 1997;26:1085-1091.
113. Kondo T, Okamoto S, Todoroki T, Hirano T, Schildberg FW, Messmer K. Application of a novel method for subsequent evaluation of sinusoids and postsinusoidal venules after ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Eur Surg Res* 1998;30:252-258.
114. Kozak LP, Britton JH, Kozak UC, Wells JM. The mitochondrial uncoupling protein gene. Correlation of exon structure to transmembrane domains. *J Biol Chem* 1988;263:12274-12277.
115. Krauss S, Zhang CY. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol Cell Biol* 2005;6:248-261.
116. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:619–642.
117. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007;87:99-163.

118. Lacour S, Gautier JC, Pallardy M, Roberts R. Cytokines as potential biomarkers of liver toxicity. *Cancer Biomark* 2005;1:29-39.
119. Lalande ME, Ling V, Miller RG. Hoechst 33342 dye uptake as a probe of membrane permeability changes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:363-367.
120. Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997;11:118-124.
121. Larsson NG, Luft R. Revolution in mitochondrial medicine. *FEBS Lett* 1999;455:199-202.
122. Lawlor DK, Brock RW, Harris KA, Potter RF. Cytokines contribute to early hepatic parenchymal injury and microvascular dysfunction after bilateral hindlimb ischemia. *J Vasc Surg* 1999;30:533-541.
123. Ledesma A, de Lacoba MG, Rial E. The mitochondrial uncoupling proteins. *Genome Biol* 2002;3:3015.
124. Lehr HA, Vollmar B, Vajcocy P, Menger MD. Intravital fluorescence microscopy for the study of leukocyte interaction with platelets and endothelial cells. *Methods Enzymol* 1999;300:462-481.
125. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997;174:159-165.
126. Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2002;4:769-781.
127. Le Minh K, Klemm K, Abshagen K, Eipel C, Menger MD, Vollmar B. Attenuation of inflammation and apoptosis by pre- and posttreatment of darbepoetin-alpha in acute liver failure of mice. *Am J Pathol* 2007;170:1954-1963.
128. Le Minh K, Kuhla A, Abshagen K, Minor T, Stegemann J, Ibrahim S, Eipel C, Vollmar B. Uncoupling protein-2 deficiency provides protection in a murine model of endotoxemic acute liver failure. *Crit Care Med* 2009;37:215-222.
129. Lindenblatt N, Braun B, Menger MD, Klar E, Vollmar B. C-peptide exerts antithrombotic effects that are repressed by insulin in normal and diabetic mice. *Diabetologia* 2006;49:792-800.
130. Lindenblatt N, Platz U, Hameister J, Klar E, Menger MD, Vollmar B. Distinct effects of acute and chronic nicotine application on microvascular thrombus formation and endothelial function in male and female mice. *Langenbecks Arch Surg* 2007;392:285-295.

131. Liu P, Vonderfecht SL, McGuire GM, Fisher MA, Farhood A, Jaeschke H. The 21-aminosteroid tirilazad mesylate protects against endotoxin shock and acute liver failure in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:438-445.
132. Liu P, McGuire GM, Fisher MA, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia. *Shock* 1995;3:56-62.
133. Luster AD. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338:436-445.
134. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993;177:1277-1286.
135. Mailloux RJ, Adjeitey CN, Harper ME. Genipin-induced inhibition of uncoupling protein-2 sensitizes drug-resistant cancer cells to cytotoxic agents. *PLoS One* 2010;5:13289.
136. Mao W, Yu XX, Zhong A, Li W, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan G. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* 1999;443:326-330.
137. Martin J, Romanque P, Maurhofer O, Schmitter K, Ferrand G, Dufour JF, Hora C. Ablation of the tumor suppressor histidine triad nucleotide binding protein 1 is protective against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2011;53:243-52.
138. Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, Ezaki H, Kawasaki T. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 1980;30:294-296.
139. Marzi I, Zhi ZN, Zimmermann FA, Lemasters JJ, Thurman RG. Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1989;21:1319-1320.
140. Marzi I, Zhong Z, Lemasters JJ, Thurman RG. Evidence that graft survival is not related to parenchymal cell viability in rat liver transplantation. The importance of nonparenchymal cells. *Transplantation* 1989b;48:463–468.
141. Marzi I, Takei Y, Knee J, Menger M, Gores GJ, Bühren V, Trentz O, Lemasters JJ, Thurman RG. Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1990;22:2004-2005.
142. Marzi I, Takei Y, Rücker M, Kawano S, Fusamoto H, Walcher F, Kamada T. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transpl Int* 1994;7:503-506.

143. Massberg S, Gawaz M, Gruner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, Heinzmann U, Nieswandt B. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003;197:41-49.
144. Massip-Salcedo M, Roselló-Catafau J, Prieto J, Avila MA, Peralta C. The response of the hepatocyte to ischemia. *Liver Int* 2007;27:6-16.
145. Matschinsky FM, Glaser B, Magnuson MA. Pancreatic beta-cell glucokinase: closing the gap between theoretical concepts and experimental realities. *Diabetes* 1998;47:307-315.
146. Mavier P, Preaux AM, Guigui B, Lescs MC, Zafrani ES, Dhumeaux D. In vitro toxicity of polymorphonuclear neutrophils to rat hepatocytes: evidence for a proteinase-mediated mechanism. *Hepatology* 1988;8:254-258.
147. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-163.
148. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996;32:752-763.
149. McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988;46:178-191.
150. Meguro M, Katsuramaki T, Kimura H, Isobe M, Nagayama M, Kukita K, Nui A, Hirata K. Apoptosis and necrosis after warm ischemia-reperfusion injury of the pig liver and their inhibition by ONO-1714. *Transplantation* 2003;75:703-710.
151. Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle: Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med* 1988;188:151-165.
152. Menger MD, Sack FU, Hammersen F, Messmer K. Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Adv Exp Med Biol* 1989;248:387-395.
153. Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K. Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 1990;38:139-145.
154. Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991;23:158-169.
155. Menger MD, Barker JH, Messmer K. Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. *Plast Reconstr Surg* 1992;89:1104-1114.

156. Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992b;263:1892-1900.
157. Menger MD, Vollmar B, Glasz J, Post S, Messmer K. Microcirculatory Manifestations of Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. In: *Liver Microcirculation and Hepatobiliary Function* (Editors: Messmer K, Menger MD), S.106-124 KARGER Basel 1993.
158. Menger MD, Vollmar B, Glasz J, Post S, Messmer K. Microcirculatory manifestations of hepatic ischemia / reperfusion injury. *Prog Appl Microcirc* 1993b;19:106-124.
159. Menger MD, Vollmar B. In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin. *Microsurgery* 1994;15:383-389.
160. Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1452-1457.
161. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation* 2000;7:291.
162. Menger MD, Vollmar B. Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: is it time for the introduction of pleiotropic compounds? *Transplant Proc* 2007;39:485-488.
163. Messmer K, Krombach F. Microcirculation research in experimental surgery. *Chirurg* 1998;69:333-338.
164. Metzger J, Dore SP, Lauterburg PH. Oxidant stress during reperfusion of ischemic liver: No evidence for a role of xanthine oxidase. *Hepatology* 1988;8:580-584.
165. Minor T, Hachenberg A, Tolba R, Pauleit D, Akbar S. Fibrinolytic preflush upon liver retrieval from non-heart beating donors to enhance postpreservation viability and energetic recovery upon reperfusion. *Transplantation* 2001;71:1792-1796.
166. Minor T, Akbar S, Tolba R, Dombrowski F. Cold preservation of fatty liver grafts: prevention of functional and ultrastructural impairments by venous oxygen persufflation. *J Hepatol* 2000;32:105-111.
167. Miroux B, Frossard V, Raimbault S, Ricquier D, Bouillaud F. The topology of the brown adipose tissue mitochondrial uncoupling protein determined with antibodies against its antigenic sites revealed by a library of fusion proteins. *EMBO J* 1993;12:3739-3745.
168. Mutomba MC, Li F, Gottesdiener KM, Wang CC. A *Trypanosoma brucei* bloodstream form mutant deficient in ornithine decarboxylase can protect against wild-type infection in mice. *Exp Parasitol* 1999;91:176-184.
169. Myung SJ, Rerko RM, Yan M, Platzer P, Guda K, Dotson A, Lawrence E, Dannenberg AJ, Lovgren AK, Luo G, Pretlow TP, Newman RA, Willis J, Dawson D, Markowitz SD. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:12098-12102.

170. Nakamura S, Nishiyama R, Serizawa A, Yokoi Y, Suzuki S, Konno H, Baba S, Muro H. Hepatic release of endothelin-1 after warm ischemia. *Transplantation* 1995;59:679-684.
171. Nègre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Trolly M, Salvayre R, Pénicaud L, Casteilla L. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *FASEB J* 1997;11:809-815.
172. Nicholls DG. Brown adipose tissue mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1979;549:1-29.
173. Nicholls DG, Locke RM. Thermogenic mechanisms in brown fat. *Physiol Rev* 1984;64:1-64.
174. Nordström G, Seeman T, Hasselgren PO. Beneficial effect of allopurinol in liver ischemia. *Surgery* 1985;97:679-684.
175. Olsson GM, Brunmark A, Brunk UT. Acridine orange-mediated photodamage of microsomal and lysosomal fractions. *Virchows Arch* 1989;56:247-257.
176. Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, Lowell BB. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 2007;449:228-232.
177. Paxian M, Bauer I, Rensing H, Jaeschke H, Mautes AE, Kolb SA, Wolf B, Stockhausen A, Jeblick S, Bauer M. Recovery of hepatocellular ATP and "pericentral apoptosis" after hemorrhage and resuscitation. *FASEB J* 2003;17:993-1002.
178. Paraidathathu T, de Groot H, Kehrer JP. Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radic Biol Med* 1992;13:289-297.
179. Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 2001;276:8705-8712.
180. Pi J, Bai Y, Daniel KW, Liu D, Lyght O, Edelstein D, Brownlee M, Corkey BE, Collins S. Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function. *Endocrinology* 2009;150:3040-3048.
181. Powlshock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP. An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* 1983;110:148-160.
182. Pringle JH: V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg* 1908;48:541-549.

183. Raimbault S, Dridi S, Denjean F, Lachuer J, Couplan E, Bouillaud F, Bordas A, Duchamp C, Taouis M, Ricquier D. An uncoupling protein homologue putatively involved in facultative muscle thermogenesis in birds. *Biochem J* 2001;353:441-444.
184. Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl AM. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 1999;29:1131-1138.
185. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J* 1999;13:155-168.
186. Rial E, González-Barroso M, Fleury C, Iturrizaga S, Sanchis D, Jiménez-Jiménez J, Ricquier D, Gubern M, Bouillaud F. Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2. *EMBO J* 1999;18:5827-5833.
187. Ricquier D, Kader JC. Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;73:577-583.
188. Ricquier D, Bouillaud F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 2000;345:161-179.
189. Rolo AP, Teodoro JS, Peralta C, Rosello-Catafau J, Palmeira CM. Prevention of I/R injury in fatty livers by ischemic preconditioning is associated with increased mitochondrial tolerance: the key role of ATPsynthase and mitochondrial permeability transition. *Transpl Int* 2009;22:1081-1090.
190. Rotzius P, Soehnlein O, Kenne E, Lindbom L, Nystrom K, Thams S, Eriksson EE. ApoE(-)/lysozyme M(EGFP/EGFP) mice as a versatile model to study monocyte and neutrophil trafficking in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2009;202:111-118.
191. Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulier AM, Bouillaud F, Ricquier D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 2004;53:130-135.
192. Rousset S, Emre Y, Join-Lambert O, Hurtaud C, Ricquier D, Cassard-Doulier AM. The uncoupling protein 2 modulates the cytokine balance in innate immunity. *Cytokine* 2006;35:135-142.
193. Rymsa B, Wang JF, de Groot H. O₂-release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1991;261:602-607.
194. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. Intravital fluorescence microscopy: Impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 1997;45:505-513.

195. Sanchis D, Fleury C, Chomiki N, Goubern M, Huang Q, Neverova M, Gregoire FM, Easlick J, Raimbault S, Levi-Meyrueis C, Miroux B, Collins S, Seldin MF, Richard D, Warden C, Bouillaud F, Ricquier D. BMCP1, a novel mitochondrial carrier with high expression in the central nervous system of humans and rodents, and respiration uncoupling activity in recombinant yeast. *J Biol Chem* 1998;273:34611-34615.
196. Schemmer P, Mehrabi A, Kraus T. New aspects on reperfusion injury to liver—impact of organ harvest. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:26-35.
197. Schoen M, Rotter R, Gierer P, Gradl G, Strauss U, Jonas L, Mittlmeier T, Vollmar B. Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *J Trauma* 2007;63:788-797.
198. Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;136:17-24.
199. Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *Cell Sci* 2010;123:2533-2542.
200. Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Capitanio N, Romano AD, Sastre J, Vendemiale G, Altomare E. Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury. *Gut* 2008;57:957-965.
201. Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation* 2002;9:99-109.
202. Schlayer HJ, Laaff H, Peters T, Woort-Menker M, Estler HC, Karck U, Schaefer HE, Decker K. Involvement of tumor necrosis factor in endotoxin-triggered neutrophil adherence to sinusoidal endothelial cells of mouse liver and its modulation in acute phase. *J Hepatol* 1988;7:239-249.
203. Slotta JE, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B. Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) induce early hepatic injury, but provide a late window for protection against endotoxin-mediated liver damage. *J Hepatol* 2006;44:576-585.
204. Sluse FE, Jarmuszkiewicz W. Uncoupling proteins outside the animal and plant kingdoms: functional and evolutionary aspects. *FEBS Lett* 2002;510:117-120.
205. Sorg H, Hoffmann JN, Rumbaut RE, Menger MD, Lindenblatt N, Vollmar B. Efficacy of antithrombin in the prevention of microvascular thrombosis during endotoxemia: an intravital microscopic study. *Thromb Res* 2007;121:241-248.

206. Sorg H, Lorch B, Jaster R, Fitzner B, Ibrahim S, Holzhueter SA, Nizze H, Vollmar B. Early rise in inflammation and microcirculatory disorder determine the development of autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;295:1274-1280.
207. St Croix CM, Leelavanichkul K, Watkins SC. Intravital fluorescence microscopy in pulmonary research. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:834-840.
208. Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000;385:290-298.
209. Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Brand MD. Uncoupling protein 2 from carp and zebrafish, ectothermic vertebrates. *Biochim Biophys Acta* 1999;1413:50-54.
210. Sullivan PG, Springer JE, Hall ED, Scheff SW. Mitochondrial uncoupling as a therapeutic target following neuronal injury. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36:353-356.
211. Sutton GM, Trevaskis JL, Hulver MW, McMillan RP, Markward NJ, Babin MJ, Meyer EA, Butler AA. Diet-genotype interactions in the development of the obese, insulin-resistant phenotype of C57BL/6J mice lacking melanocortin-3 or -4 receptors. *Endocrinology* 2006;147:2183-2196.
212. Takahashi Y, Ganster R, Gambotto A, Shao L, Kaizu T, Wu T, Yagnik GM, Nakao A, Tsoulfas G, Ishikawa T, Okuda T, Geller DA, Murase N. Role of NF- κ B on liver cold ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:1175-1184.
213. Tamura M, Nakajima Y, Omura T, Ito K, Kimura J, Kusumoto K, Isai H, Uchino J, Nakane A, Minagawa T. Can anti-Mac-1 and anti-TNF monoclonal antibody protect the liver from warm ischemia-reperfusion injury in mice? *Transplant Proc* 1995;27:768-770.
214. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:891-902.
215. Teshima Y, Akao M, Jones SP, Marbán E. Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes. *Circ Res* 2003;93:192-200.
216. Thérond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:373-384.
217. Thompson JS, Brown SA, Khurdayan V, Zeynalzadedan A, Sullivan PG, Scheff SW. Early effects of tribromoethanol, ketamine/xylazine, pentobarbitol, and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. *Comp Med* 2002;52:63-67.

218. Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS. Factors determining successful liver preservation for transplantation. *Ann Surg* 1975;181:289-298.
219. Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Cemazar M, Shan S, Dewhirst MW, Barber PR, Vojnovic B, Chaplin DJ. Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer Res* 2001;61:6413-6422.
220. Tucker ON, Heaton N: The 'small for size' liver syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2005;11:150-155.
221. Uchida Y, Freitas MC, Zhao D, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. The Protective Function of Neutrophil Elastase Inhibitor in Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *Transplantation* 2010;15:89:1050-1056.
222. Uchino S, Yamaguchi Y, Furuhashi T, Wang FS, Zhang JL, Okabe K, Kihara S, Yamada S, Mori K, Ogawa M. Steatotic liver allografts up-regulate UCP-2 expression and suffer necrosis in rats. *J Surg Res* 2004;120:73-82.
223. Ulich TR, del Castillo J, Ni RX, Bikhazi N, Calvin L. Mechanisms of tumor necrosis factor alpha-induced lymphopenia, neutropenia, and biphasic neutrophilia: a study of lymphocyte recirculation and hematologic interactions of TNF alpha with endogenous mediators of leukocyte trafficking. *J Leukoc Biol* 1989;45:155-167.
224. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:79-82.
225. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang CY, Hagen T, Boss O, Ido Y, Szczepanik A, Wade J, Mootha V, Cortright R, Muoio DM, Lowell BB. Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice. *J Biol Chem* 2000;275:16258-16266.
226. Vladoianu IR, Dubini F. Experimental model of oral antityphoid vaccination with live streptomycin-dependent *Salmonella typhimurium* in C57BL/6 mice. *J Hyg* 1975;75:215-218.
227. Vogler S, Pahnke J, Rousset S, Ricquier D, Moch H, Miroux B, Ibrahim SM. Uncoupling protein 2 has protective function during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2006;168:1570-1575.
228. Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 1992;75:421-430.
229. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994a;145:1421-1431.

230. Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol* 1994b;20:301-304.
231. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994c;267:786-793.
232. Vollmar B, Lang G, Menger MD, Messmer K. Hypertonic hydroxyethyl starch restores hepatic microvascular perfusion in hemorrhagic shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1994d;266:1927-1934.
233. Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995;117:195-200.
234. Vollmar B, Rücker M, Menger MD. A new method for the intravital microscopic quantification of hepatic sinusoidal perfusion failure using the dye bisbenzamide H33342. *Microvasc Res* 1996;51:250-259.
235. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 1996b;270:G798-G803.
236. Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Role of microcirculatory derangements in manifestation of portal triad cross-clamping-induced hepatic reperfusion injury. *J Surg Res* 1996c;60:49-54.
237. Vollmar B, Menger MD. The use of intravital microscopy in surgical research. 26-years of experience analyzed by studies presented at the Surgical Forum of the Annual Congress of the German Society of Surgery. *Langenbecks Arch Surg* 1998;383:282-285.
238. Vollmar B, Bauer C, Menger MD. n-3 Polyunsaturated fatty acid-enriched diet does not protect from liver injury but attenuates mortality rate in a rat model of systemic endotoxemia. *Crit Care Med* 2002;30:1091-1098.
239. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev* 2009;89:1269-1339.
240. Wan CD, Wang CY, Liu T, Cheng R, Wang HB. Alleviation of ischemia/reperfusion injury in ob/ob mice by inhibiting UCP-2 expression in fatty liver. *World J Gastroenterol* 2008;14:590-594.
241. Weiss S, Kotsch K, Francuski M, Reutzel-Selke A, Mantouvalou L, Klemz R, Kuecuk O, Jonas S, Wesslau C, Ulrich F, Pascher A, Volk HD, Tullius SG, Neuhaus P, Pratschke J. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7(6):1584-1593.
242. Worthen GS, Schwab B, Elson EL, Downey GP. Mechanics of stimulated neutrophils: Cell stiffening induces retention in capillaries. *Science* 1989;245:183-186.

243. Wu C, Wang P, Rao J, Wang Z, Zhang C, Lu L, Zhang F. Triptolide alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress and inhibiting NF- κ B activity in mice. *J Surg Res* 2011;166:205-213.
244. Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 1999;29:1494-1502.
245. Zacharakis G, Kambara H, Shih H, Ripoll J, Grimm J, Saeki Y, Weissleder R, Ntziachristos V. Volumetric tomography of fluorescent proteins through small animals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:18252-18257.
246. Zdolsek JM, Olsson GM, Brunk UT. Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Photochem Photobiol* 1990;51:67-76.
247. Zdolsek JM. Acridine orange-mediated photodamage to cultured cells. *APMIS* 1993;101:127-132.
248. Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D, Hagen T, Vidal-Puig AJ, Boss O, Kim YB, Zheng XX, Wheeler MB, Shulman GI, Chan CB, Lowell BB. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 2001;105:745-755.
249. Zhang W, Wang M, Xie HY, Zhou L, Meng XQ, Shi J, Zheng S. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc* 2007;39:1332-1337.
250. Zhang X, Li L, Prabhakaran K, Zhang L, Leavesley HB, Borowitz JL, Isom GE. Uncoupling protein-2 up-regulation and enhanced cyanide toxicity are mediated by PPARalpha activation and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;223:10-19.
251. Zhong Z, Jones S, Thurman RG. Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1996;270:332-338.
252. Zweier JL, Kuppusamy P, Lutty GA. Measurement of endothelial cell free radical generation: Evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:4046-4050.

THESEN

1. Für eine Vielzahl an Lebererkrankungen gilt die chirurgische Intervention als wichtiges Behandlungskonzept. Dazu zählen beispielsweise das hepatozelluläre Karzinom, Lebermetastasen, Lebertraumata und Echinokokkuszysten. Trotz intensiver Forschung der letzten Jahre stellen Leberschädigungen, hervorgerufen durch Ischämie und Reperfusion, immer noch eine große Herausforderung in der Chirurgie dar.
2. Der Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber ist ein komplexes, multifaktorielles Geschehen, dessen pathophysiologische Grundlagen in den letzten Jahren weiter aufgeklärt werden konnten. In der Ischämiephase kommt es zur Hypoxie mit nachfolgender Zellschwellung, Entstehung von Mikrothrombosen und konsekutiver Einschränkung der nutritiven Kapillarperfusion. Ein signifikanter Anteil der hepatozellulären Schädigung ist aber auch auf die Reperfusion zurückzuführen. Hierbei stehen die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die Leukozytenaktivierung und der oxidative Stress im Vordergrund. Die Störung der hepatozellulären Mikrozirkulation spielt eine kritische und äußerst wichtige Rolle in der Manifestation der Organschädigung.
3. Die Erstbeschreibung der Entkopplerproteine begann 1976 mit dem namensgebenden Uncoupling Protein 1 (UCP1). Bisher sind 5 verschiedene UCPs bekannt. Sie weisen unterschiedliche Lokalisationen und Funktionen auf.
4. Die verschiedenen UCPs fungieren als mitochondriale Transportproteine und sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Sie haben die Fähigkeit, die Atmungskette zwischen Oxidation und Phosphorylierung zu entkoppeln. Dies resultiert in unterschiedlichen Veränderungen. Das ubiquitär vorkommende UCP2 hat eine zentrale Stellung im Energiestoffwechsel der Zelle. Seine physiologische Funktion wird kontrovers diskutiert. In Bezug auf die Leberschädigung konnten im Rahmen verschiedener Modelle (Ischämie/Reperfusion, Nichtalkoholische Steatohepatitis) protektive aber auch aggravierende Funktionen beschrieben werden. Die Rolle von UCP2 in der Antwort auf I/R der gesunden Leber ist noch weitgehend ungeklärt.
5. Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung des mitochondrialen Proteins UCP2 im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschaden der nicht vorgeschädigten Leber näher zu charakterisieren. Mit der intravitalen

Fluoreszenzmikroskopie wurden Veränderungen der hepatischen Mikrozirkulation (Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, sinusoidales Perfusionsversagen, hepatozelluläre Apoptose) in UCP2 +/+ und UCP2 -/- Mäusen in Antwort auf I/R und unter Sham-Bedingungen untersucht. Zusätzlich wurden histologische, immunhistochemische, molekularbiologische und laborchemische Analysen durchgeführt.

6. Durch die Induktion von Ischämie und Reperfusion am linken Leberlappen konnte eine deutliche Schädigung des Leberparenchyms beobachtet werden. Neben mikrozirkulatorischen Veränderungen (gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, sinusoidaler Perfusionsausfall) zeigten sich eine systemische Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und ein erhöhter Grad an oxidativem Stress. Dies führte zu einer deutlichen Störung der hepatischen Gewebsintegrität, welche mit einer erhöhten Freisetzung leberspezifischer Enzyme assoziiert war.
7. Die zentrale Rolle von UCP2 im Energiestoffwechsel der Zelle zeigte sich auch in der hier vorliegenden Arbeit. In Abwesenheit des UCP2-Gens konnten ein signifikant höherer ATP-Gehalt und ein größeres ATP/ADP-Verhältnis beobachtet werden. Jedoch fiel nach Induktion von I/R auch ein höherer Grad an Inflammation und oxidativem Stress in den UCP2 -/- Tieren auf. Die Gesamtausprägung des Leberparenchymschadens nach Induktion von I/R erwies sich als unabhängig von der UCP2-Genexpression. Die wesentlichen Mechanismen der durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufenen Leberschädigung scheinen somit nicht maßgeblich von UCP2 beeinflusst zu werden.
8. Das Mitochondrium mit der darin lokalisierten Atmungskette stellt die gemeinsame Endstrecke des Intermediärstoffwechsels mit dem Ziel der ATP-Erzeugung dar. Defekte der Mitochondrien führen konsekutiv zum Versagen des zellulären Energiemetabolismus. Die Abnahme der mitochondrialen Funktion stellt darüber hinaus einen Schlüsselmechanismus in Alterungsprozessen dar und erhöht die Anfälligkeit des Organismus für altersbedingte Schädigungen. Daher ist ein genaues Verständnis der komplexen Funktionsmechanismen des Mitochondriums und des mitochondrialen Genoms von elementarer Bedeutung. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis von UCP2 für den postischämischen Reperfusionsschaden der Leber.