

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

***Der Einfluss von Thrombopoetin auf den post-
ischämischen Leberschaden***



Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Steffen Negendank
Rostock 2012

1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Vollmar, Institut für Experimentelle Chirurgie,
Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Nöldge-Schomburg, Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universität Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Minor, Klinik und Poliklinik für Allgemein-,
Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Rheinische Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn

Datum der Einreichung: 18.01.2013

Datum der Verteidigung: 05.06.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	6
2	Abbildungsverzeichnis	7
3	Zusammenfassung	8
4	Einleitung	10
4.1	Leberchirurgie und Leberdysfunktion	10
4.2	Der Ischämie-/Reperfusionsschaden	11
4.2.1	Definition und klinische Relevanz	11
4.2.2	Therapeutische Strategien	14
4.3	Thrombopoetin	16
4.3.1	Struktur und Physiologie	16
4.3.2	Das pleiotrope Potential von Thrombopoetin	18
4.4	Ziele der Studie	20
5	Material und Methoden	21
5.1	Versuchstiere	21
5.2	Tiermodell	21
5.2.1	Prämedikation	21
5.2.2	Anästhesie und chirurgisches Vorgehen	21
5.2.3	Induktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens	22

5.3	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	23
5.3.1	Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie	25
5.3.2	Sinusoidale Perfusion	27
5.3.3	Sinusoidale Leukozytenstase	28
5.3.4	Leukozytenrolling und -adhärenz in den Venolen	29
5.3.5	Hepatozelluläre Apoptose	30
5.3.6	Off-Line-Auswertung	31
5.4	Entnahme von Gewebeproben	32
5.5	Plasmaanalytik und Blutbild	33
5.5.1	Erstellen von Blutbildern und Zentrifugation	33
5.5.2	Bestimmung der leberspezifischen Enzyme	33
5.5.3	Bestimmung von Interleukin-6	33
5.6	Immunhistochemie des Thrombopoetinrezeptors	33
5.7	Thrombozytenisolierung und -aktivierung	34
5.8	Statistik	35
6	Ergebnisse	36
6.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	36
6.1.1	Sinusoidale Perfusion	36
6.1.2	Sinusoidale Leukozytenstase	37
6.1.3	Leukozytenrolling und -adhärenz in den Venolen	38
6.1.4	Hepatozelluläre Apoptose	39
6.2	Serumanalytik und Blutbild	40

6.3	Expression des Thrombopoetinrezeptors	44
6.4	Thrombozytenaktivierung und Durchflusszytometrie	44
7	Diskussion	46
7.1	Diskussion des Modells und des chirurgischen Vorgehens	46
7.2	Diskussion der Untersuchungsmethoden	47
7.3	Diskussion der Ergebnisse	53
7.3.1	Der Ischämie-/Reperfusionsschaden	53
7.3.2	Die Beeinflussung des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch Thrombopoetin	55
7.3.3	Die pro- und antiapoptotische Wirkung von Thrombopoetin	60
7.3.4	Die durchflusszytometrische Bestimmung der Thrombozytenaktivität	61
7.3.5	Die Auswirkungen von Thrombopoetin und des Ischämie-/Reperfusionsschadens auf das Blutbild	62
7.4	Schlussfolgerung	64
8	Literaturverzeichnis	66
	Anhang	78

1 Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
EPO	Erythropoietin
EPO-R	Erythropoietin-Rezeptor
ET	Endothelin
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
ICAM	intracellular adhesion molecule
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
I/R 30/60	Ischämiedauer 30 min/Reperfusionsdauer 60 min
I/R 60/60	Ischämiedauer 60 min/Reperfusionsdauer 60 min
KG	Körpergewicht
MPL-virus	myeloproliferative leukemia virus
MW	Mittelwert
NAC	N-Acetyl-Cystein
NO	Stickstoffmonoxid
ROS	Reactive oxygen species
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin
VCAM	vascular cell adhesion molecule

2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Pathophysiologie des Circulus vitiosus des Ischämie-/Reperfusionsschadens	13
Abb. 2	Aktivierung des Zytokinrezeptors und anschließende Signalkaskaden	18
Abb. 3	Die Funktionsweise eines Intravitalmikroskops	25
Abb. 4	(A) Intravitalmikroskopische Aufnahme normal perfundierter Sinusoide	27
	(B) Intravitalmikroskopische Aufnahme schlecht perfundierter Sinusoide	27
Abb. 5	Leukozytenstase in den Sinusoiden	22
Abb. 6	(A) Intravitalmikroskopische Aufnahme einer postkapillären Venole ohne Leukozytenadhärenz	29
	(B) Intravitalmikroskopische Aufnahme einer postkapillären Venole mit Leukozytenadhärenz	29
Abb. 7	(A) Intravitalmikroskopische Aufnahme von Leberparenchym nach Bisbenzimidgabe ohne Apoptose von Hepatozyten	29
	(B) Intravitalmikroskopische Aufnahme von Leberparenchym nach Bisbenzimidgabe mit Apoptose von Hepatozyten	29
Abb. 8	Auswertung der sinusoidalen Perfusion mittels CapImage	30
Abb. 9	Quantitative Analyse der sinusoidalen Perfusion	35
Abb. 10	Quantitative Analyse der Leukozytenstase	36
Abb. 11	(A) Quantitative Analyse des Leukozytenrollings in Venolen	38
	(B) Quantitative Analyse der Leukozytenadhärenz in Venolen	38
Abb. 12	Quantitative Analyse der hepatozellulären Apoptose	39
Abb. 13	Spektrophotometrische Analyse der leberspezifischen Enzyme	41
Abb. 14	Plasmaanalyse von IL-6 als proinflammatorisches Zytokin	42
Abb. 15	Quantitative Auswertung der Blutbilder	43
Abb. 16	Immunhistochemische Darstellung des TPO-Rezeptors cMPL	44
Abb. 17	Quantitative Analyse der durchflusszytometrischen Bestimmung exemplarischer Oberflächenmoleküle nach Thrombozytenaktivierung	45

3 Zusammenfassung

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden führt nach Trauma, Schock oder chirurgischen Eingriffen mit Verminderung der Perfusion zu Milieuänderungen mit Zelluntergang und inflammatorischer Antwort sowie konsekutiver Leberdysfunktion. Zur Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens werden vielfältige Therapieansätze eingesetzt. In jüngerer Zeit fällt - auch andere Schadensmodelle, wie das akute Leberversagen, betreffend - der Fokus auf pleiotrope Substanzen, wie Kortikosteroide, Erythropoietin und auch Thrombopoetin. Für die beiden erstgenannten Substanzen ist bereits ein protektiver Effekt auf das Lebergewebe nach Ischämie/Reperfusion nachgewiesen. Für Thrombopoetin liegen in diesem Zusammenhang bisher keine Untersuchungen vor. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, den Einfluss von Thrombopoetin auf die Perfusion, die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und die Zellintegrität nach Ischämie und Reperfusion am Mausmodell *in vivo* zu untersuchen.

Die Vorbehandlung der weiblichen C57BL/6J-Mäuse erfolgte mittels intraperitonealer Applikation von 12,5 µg/kg Körpergewicht Thrombopoetin (TPO 30/60, TPO 60/60), oder NaCl-Lösung äquivalenten Volumens (KON 30/60, KON 60/60). Die Sham-Tiere wurden nicht vorbehandelt (Sham). 24 Stunden nach der Prämedikation erfolgte in Ketamin/Xylazin-Narkose die Induktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens des linken Leberlappens durch Setzen eines Clips auf das Gefäß-Nerven-Bündel für die Dauer von 30 (TPO 30/60, KON 30/60) bzw. 60 Minuten (TPO 60/60, KON 60/60). Im Anschluss erfolgte die 60-minütige Reperusionsphase nach Entfernen des Clips. Die Sham-Tiere wurden dem gleichen Protokoll, jedoch ohne Ischämie der Leber, unterzogen.

Anschließend erfolgte die Fluoreszenzmikroskopie *in vivo* und nachfolgend die Entnahme von Blut- und Gewebeproben für spätere immunhistochemische und laborchemische Untersuchungen. Zwei weitere Gruppen mit je vier Tieren wurden 24 Stunden nach identischer Vorbehandlung mit Thrombopoetin- oder Kontrolllösung zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Thrombozytenaktivität entblutet.

Sowohl die *in vivo*, als auch die serologische Analyse zeigten die charakteristischen Zeichen des Ischämie-/Reperfusionsschadens mit Perfusionsausfall, Leukozytenaktivierung und Störung der Zellintegrität nach einer Ischämiezeit von 60 Minuten.

Immunhistochemisch ließ sich der TPO-Rezeptor nach 60-minütiger Ischämie auf den Hepatozyten nachweisen. Die TPO-Gruppen zeigten jedoch keine wesentliche Verbesserung des sinusoidalen Perfusionsversagens. Auch die postischämische Leukozytenaktivität wurde nicht signifikant durch TPO vermindert. Weder nach 30-, noch nach 60-minütiger Ischämie kam es zu einer Steigerung der Apoptoserate. Die Transaminasen zeigten ein uneinheitliches Bild. Während der Anstieg der AST nach Ischämie/Reperfusion in der TPO-Gruppe tendenziell geringer ausfiel, war eine leichte Erhöhung der Freisetzung von ALT im Vergleich zur Kontrollgruppe zu verzeichnen. IL-6 als zusätzlicher Marker der Inflammationsreaktion war nach 60-minütiger Ischämie signifikant gegenüber der Sham-Gruppe erhöht. TPO führte zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Reduktion der Freisetzung von IL-6. Weder das Blutbild noch die Thrombozytenaktivität zeigten eine Beeinflussung durch die Vorbehandlung mit TPO.

Obwohl der Thrombopoetin-Rezeptor in der Ischämie-/Reperfusionsgeschädigten Leber nachgewiesen wurde, ergaben sich nur leichte Hinweise auf einen protektiven Effekt von TPO auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden. Ein therapeutischer Einsatz von TPO scheint daher zunächst nicht zielführend.

4 Einleitung

4.1 Leberchirurgie und Leberdysfunktion

Die Chirurgie leistet einen großen und wichtigen Beitrag zur Behandlung von Erkrankungen und Traumata der Leber. Einen wesentlichen Anteil daran hat die Leberteileresektion durch die Entfernung primärer und sekundärer Tumoren. Diese ist beispielsweise das Mittel der Wahl zur Therapie des hepatozellulären Karzinoms, welches einen der häufigsten primären Lebertumore in Europa darstellt. Ebenso ermöglicht die Resektion die Behandlung von Lebermetastasen oder -traumata.

Die hohe Regenerationsfähigkeit der Leber erlaubt prinzipiell die Entfernung von bis zu 80% des Parenchyms mit anschließender Rekonstitution zum Ausgangsgewicht mit normaler Funktion innerhalb von sechs Monaten (Court et al. 2002).

Der postoperative Verlauf wird neben allgemeinen Risikofaktoren, wie Nebenerkrankungen oder einem reduzierten Allgemeinzustand des Patienten, im Wesentlichen von der Größe und Funktion des verbleibenden Leberparenchyms bestimmt. Ist die hepatozelluläre Regenerationsfähigkeit eingeschränkt, können postoperativ lebensbedrohliche Komplikationen entstehen (Morita et al. 2002; Nagino et al. 2001; Seiler et al. 2000; Takeda et al. 2002). Diese sind primär durch die Stoffwechselfunktion der Leber bedingt (Tucker und Heaton 2005). Sie können jedoch auch durch sekundäre Folgen, wie zum Beispiel ein hepatorenales oder hepatopulmonales Syndrom, verursacht werden (Cardenas 2005). Bei fibrotisch oder zirrhotisch vorgeschädigtem Parenchym (Behrns et al. 1998; Huguet et al. 1994) oder bei intraoperativ temporärer Drosselung der Blutzufuhr (Huguet et al. 1992) kann das verbleibende Parenchym in erheblichem Maße in seiner Funktion beeinträchtigt werden. Die klinische Manifestation reicht hierbei von der partiellen Leberinsuffizienz bis hin zum kompletten Organausfall (Ezaki et al. 1998).

Um Blutverluste bei operativen Eingriffen an der Leber zu vermeiden, kann die Blutzufuhr des Organs vollständig oder partiell unterbunden werden. Diese Technik wurde erstmals 1908 von James Hogarth Pringle in dem Artikel „Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma“ beschrieben. Er ließ bei Patienten mit traumatischen Leberperforationen die Hauptzuflüsse Arteria hepatica und Vena porta inklusive des Ductus choledochus komprimieren. Dadurch erweiterte sich das Zeitfenster

für den notfallmäßigen Eingriff und bei gestoppter Blutung verbesserte sich die Übersicht im Operationsgebiet (Pringle 1908).

Zudem kann durch das Pringle Manöver die Notwendigkeit einer Bluttransfusion vermindert werden, was für den Patienten prognostisch vorteilhaft ist. So konnte in mehreren Studien die vermehrte Transfusion von Blutbestandteilen als negativer Prädiktor für das Patientenüberleben identifiziert werden (Kooby et al. 2003; Makuuchi et al. 1989).

Aus der Unterbrechung der Blutversorgung der Leber resultiert eine Ischämie, die, je nach Dauer, durch die anaerobe Stoffwechsellage und lokale Azidose eine Schädigung der betroffenen Zellen bis hin zum Zelltod verursachen kann (Clavien et al. 1992). Auch die anschließende Phase der Reperfusion nach Wiedereröffnung der zuführenden Gefäße verursacht auf mehreren Wegen hepatische Schäden. Das sinusoidale Endothel wird direkt geschädigt. Weiterhin kommt es zur Aktivierung von Thrombozyten und Leukozyten. Diese aggravieren die Minderperfusion und induzieren nach Emigration in das Gewebe eine Inflammationsreaktion (Clavien 1998; Jaeschke 1996; Lentsch et al. 2000). Diese Mechanismen fasst man unter dem Begriff des Ischämie-/Reperfusionsschadens zusammen.

4.2 Der Ischämie-/Reperfusionsschaden

4.2.1 Definition und klinische Relevanz

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden entsteht in Organen oder Geweben, deren Blutversorgung vorübergehend unterbunden ist. Es zeigt sich ein komplexes, aber stereotypes Schadensbild, welches in allen Organen vergleichbar ausgelöst werden kann.

Das Leberversagen bzw. die Leberdysfunktion ist bis heute ein bedeutendes klinisches Problem nach Leberoperationen, die mit einer Unterbrechung der Blutversorgung einhergehen. Dabei handelt es sich um Operationen, wie z. B. Teilresektionen, Leberlebenspenden oder Lebertransplantationen.

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden wurde 1975 erstmals als klinisch wichtiger pathophysiologischer Faktor im Zusammenhang mit Experimenten zur Lebertransplantation durch Toledo-Pereyra et al. (1975) beschrieben und ist seither Gegenstand intensiver Forschung. Der Term als solcher hielt in den 1980er Jahren Einzug in die

Literatur (Teoh und Farrell 2003). Die genauen molekularen Mechanismen sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

Pathomechanistisch sinkt während der Ischämie der Energiegehalt der Zellen. Dadurch wird die Homöostase von Wasserstoff-, Natrium-, Kalium- und Kalziumionen gestört, was zur Schwellung von Endothel- und Kupffer-Zellen führt sowie hydrolytische Enzyme aktiviert (Bronk und Gores 1991; Carini et al. 1999; Gasbarrini et al. 1992; Rosser und Gores 1995). Diese Veränderungen bedingen im Kontext mit dem Missverhältnis von Stickstoffmonoxid- und Endothelinproduktion eine Verengung des sinusoidalen Lumens. Dadurch wird die Mikrozirkulation gestört („no-reflow-Phänomen“) und die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Leber unterstützt (Peralta et al. 2000; Peralta et al. 1996).

Aktivierte Kupffer-Zellen setzen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukine-1 (IL-1) und -6 (IL-6) frei (Bilzer und Gerbes 2000; Busam et al. 1990; Lentsch et al. 2000). Diese proinflammatorischen Zytokine induzieren die Expression von Adhäsionsmolekülen (intracellular adhesion molecule (ICAM), vascular adhesion molecule (VCAM)) und die Freisetzung von Chemokinen, welche die Akkumulation und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten unterstützen. Diese emigrieren vermehrt in das Leberparenchym und setzen insbesondere in der Reperusionsphase ROS und Proteasen frei, welche zur Schädigung des Leberparenchyms beitragen (Jaeschke 1998; Jaeschke 2000; Lentsch et al. 2000). ROS schädigen direkt die Zellmembranen. Weiterhin inaktivieren sie Antiproteasen (Weiss 1989). Dadurch können Proteasen unlimitiert auf das Gewebe einwirken.

Hinzu kommt, dass TNF- α und IL-1 CD4-positive T-Lymphozyten aktivieren und rekrutieren. Diese produzieren granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), Interferon- γ und TNF- β , welche die Aktivierung der Kupffer-Zellen und Neutrophilen in den Sinusoiden verstärken (Casillas-Ramirez et al. 2006; Selzner et al. 2003; Zwacka et al. 1997). Durch die Herabsetzung der Fließgeschwindigkeit und die Expression von Adhäsionsmolekülen kommt es weiterhin zur Adhäsion von Thrombozyten und konsekutiv zur vermehrten Aggregation.

Diese Pathomechanismen induzieren einen Circulus vitiosus mit einer Verengung der Sinusoide bis zu deren vollständigem Verschluss und einer Schädigung des Leberparenchyms. Hierdurch kommt es zu einem Perfusionsversagen, welches die Beseitigung des Ischämie-auslösenden Faktors überdauert („Reflow-Paradox“) (Abb. 1).

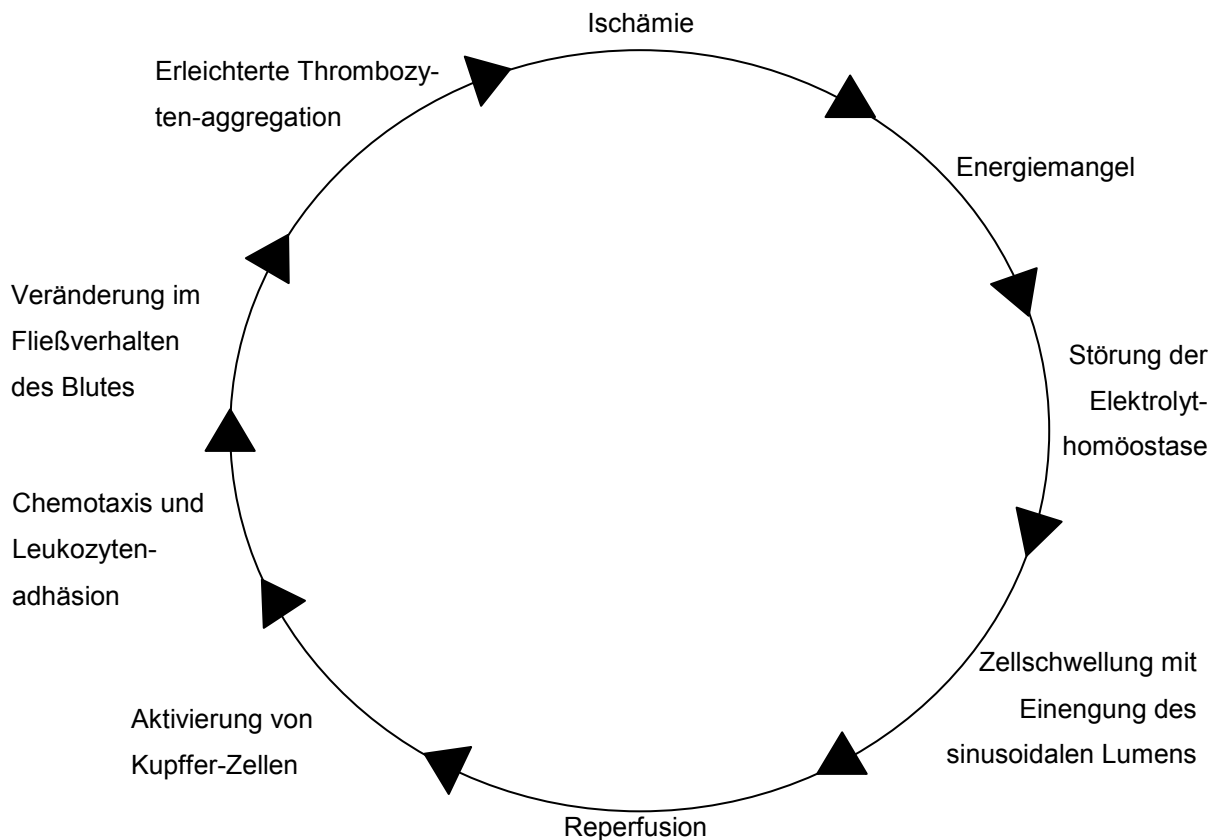


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der pathophysiologischen Vorgänge während des Ischämie-/Reperfusionsschadens: Ischämie führt unabhängig von der Ursache zu Energie- und Substratmangel. In der Folge können die Endothelzellen und Hepatozyten ihre Elektrolythomöostase nicht aufrecht erhalten und schwellen an. Dadurch kommt es zur Verengung der Sinusoide. Im Rahmen der folgenden Reperusionsphase werden Kupfer-Zellen aktiviert, welche durch Chemokine zur Akkumulation und Adhäsion von Leukozyten führen. Es kommt zur Veränderung des Fließverhaltens des Blutes, wodurch wiederum die Aggregation von Thrombozyten erleichtert wird. Dies resultiert im Verschluss der Sinusoide mit nachgeschalteter Ischämie und weiterer Zellschädigung bis hin zum Zelltod.

Untersuchungen zu den Auswirkungen der Ischämie/Reperfusion auf die Parenchymzellen der Leber zeigten zunächst, dass der programmierte Zelltod der vorherrschende Mechanismus des Zelluntergangs ist (Gao et al. 1998; Gerwig et al. 2003; Kohli et al. 1999). Weitergehende Untersuchungen stellten diesen Weg als alleinigen jedoch in Frage (Jaeschke 2002). Es wurde ein gemeinsamer intrazellulärer Signalweg postuliert, der über die Aktivierung von Caspasen sowohl in eine Apoptose als auch eine Nekrose der Hepatozyten und der sinusoidalen Endothelzellen münden kann (Banga et al. 2005; Rudiger et al. 2003).

Die Untersuchungen in diesem Zusammenhang führten zu einer Unterscheidung von zwei Ischämieformen. Entsprechend der Ursache werden eine kalte und eine warme Ischämie unterschieden.

Von kalter Ischämie spricht man im Zusammenhang mit Lebertransplantationen. Die Lebertransplantate müssen auf 4°C gekühlt und mit einer Konservierungslösung perfundiert werden, nachdem die Entnahme aus dem Spender erfolgt ist.

Die warme Ischämie beschreibt ein Perfusionsversagen der Leber oder von Leberteilchen in situ. Dies ist der Fall, wenn bei Leberoperationen eine Unterbrechung der Blutzufuhr notwendig wird. Aber auch Traumata und Schockzustände können für eine warme Ischämie ursächlich sein.

In Untersuchungen zum Pathomechanismus der beiden Schädigungsmodelle zeigte sich, dass Hepatozyten sensibler auf die warme Ischämie, Endothelzellen stärker auf die kalte Ischämie der Leber reagieren (Bilzer und Gerbes 2000; Ikeda et al. 1992; McKeown et al. 1988).

4.2.2 Therapeutische Strategien

Auf Grund der schwerwiegenden Folgen des Ischämie-/Reperfusionsschaden wurde eine Vielzahl von therapeutischen Ansätzen entwickelt, um das Ausmaß des Schadens zu minimieren.

Zum einen werden chirurgische Methoden genutzt, die helfen sollen, den Einsatz und die Dauer des Pringle-Manövers durch blutungsarmes Vorgehen zu minimieren: So wird zum Beispiel die Resektionslinie mittels elektrischer Koagulation markiert und anschließend das Parenchym mit einer Ultraschall-Schere bis in eine Tiefe von zwei bis drei Zentimetern geteilt. Der Ultraschall trennt die Interzellularkontakte. Kleine Blutgefäße werden durchtrennt und gleichzeitig verschlossen, wodurch der Blutverlust signifikant reduziert werden kann. Weiterhin können - statt des gesamten Ligamentum hepatoduodenale - selektiv Äste der versorgenden Gefäße des zu entfernenden Parenchymlappens ligiert und anschließend durchtrennt werden. Die verbleibenden Leberanteile werden so vor dem Ischämie-/Reperfusionsschaden geschützt. Zur Kontrolle venöser Blutungsquellen werden Klammerapparate eingesetzt (Lentsch et al. 2000).

Andere Beispiele sind die Nutzung intraoperativen Ultraschalls zum Auffinden größerer Venen oder die Unterstützung der Hämostase durch einen Argon-Koagulator (Lentsch et al. 2000). Tiefer liegendes Leberparenchym kann durch behutsames Setzen von Kelly-Klemmen mit anschließender Ligatur und Durchtrennung von Blutgefäßen und Gallengängen in kleinen Portionen abgetrennt werden (Lentsch et al. 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Prävention von Ischämie-/Reperfusionsschäden ist die ischämische Präkonditionierung. Hierbei wird die Leber vor der eigentlichen Anwendung des Pringle-Manövers kurzen Ischämieperioden ausgesetzt. Man unterscheidet die klassische von der verzögerten Form der ischämischen Präkonditionierung. Bei der klassischen Form setzt die Protektion unmittelbar nach der Reperfusion ein und dauert bis zu zwei Stunden an. Die zunehmende Toleranz des Leberparenchyms gegenüber einer Ischämie wird unabhängig von der Genregulation durch eine kurzfristige Anpassung des Zellstoffwechsels gewährleistet. Dagegen wird bei der verzögerten Form eine veränderte Genregulation mit der Produktion neuer Proteine für die Schutzeffekte, die erst 24 Stunden nach Reperfusion einsetzen und mehrere Tage anhalten, verantwortlich gemacht (Banga et al. 2005).

Auch medikamentös kann man dem Ischämie-/Reperfusionsschaden vorbeugen. So liegen zahlreiche Studien und Ergebnisse vor, wobei jedoch bisher nur den pleiotropen Glukokortikoiden und Erythropoietin (EPO) sowie *N*-Acetyl-Cystein (NAC) eine vielversprechende Bedeutung zukommt.

Die Steroidtherapie ist die älteste medikamentöse Therapieoption. 1975 wurde experimentell die Möglichkeit, die Leber mit Hilfe von Steroiden vor einer nachfolgenden Ischämie/Reperfusionsschädigung zu schützen, beschrieben und mit klinischen Daten untermauert (Santiago Delpin et al. 1975). In den Folgejahren wurde Kortison routinemäßig bei traumatologischen Patienten mit einer operationspflichtigen Leberverletzung vor Durchführung eines Pringle-Manövers verabreicht (Pachter und Spencer 1979; Pachter et al. 1992). Insbesondere in Verbindung mit den Aminosäuren Glycin, Taurin, Arginin und Alanin war Prednisolon in der Lage, die Freisetzung von LDH, AST und ALT nach warmer Ischämie-/Reperfusion zu senken. Weiterhin wurde durch dieses Substanzgemisch die sinusoidale Perfusion verbessert und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion vermindert (Schindler et al. 2009).

NAC ist ein weiteres potentes Medikament zur Prävention des Ischämie-/Reperfusionsschadens der Leber. Durch Prämedikation mit diesem Medikament konnte eine signifikante Senkung der ALT-Freisetzung erreicht werden. Zudem war der Mitose-Index in der NAC-Gruppe höher sowie der histologisch beurteilte Schaden geringer (Lee et al. 2012).

Erythropoietin wurden zahlreiche protektive Effekte nachgewiesen. Es beschleunigte zum Beispiel die Regeneration von Skelettmuskelgewebe nach Trauma (Rotter et al.

2008) und wirkte neuroprotektiv bei Hypoxie und Hyperoxie des sich entwickelnden Hirns (Juul et al. 2008; Kaindl et al. 2008; Yis et al. 2008). Ursächlich für diese Protektion ist insbesondere die antiapoptotische Wirkung (Arcasoy 2008; Ghezzi und Brines 2004). Auf Grund dieser Erkenntnisse wurden die Auswirkungen von EPO auch am Modell des hepatischen Ischämie-/Reperfusionsschadens untersucht. Es konnte am Modell der Ratte gezeigt werden, dass EPO in der Lage ist, die Folgen des Ischämie-/Reperfusionsschadens zu vermindern. Es kam zur signifikanten Senkung der Zahl apoptotischer Zelluntergänge wie auch der Freisetzung intrazellulärer Enzyme (Yilmaz et al. 2004). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde 2010 die erste klinische Studie durchgeführt. Kato et al. konnten darin nachweisen, dass das protektive Potential von EPO im Rahmen des hepatischen Ischämie-/Reperfusionsschadens das von Kortison übersteigt.

4.3 Thrombopoetin

4.3.1 Struktur und Physiologie

Thrombopoetin ist ein dem Erythropoietin strukturell nahe stehendes Zytokin. TPO und EPO zeigen eine 20%ige Übereinstimmung und eine 25%ige Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz der *N*-terminalen Domäne (Geddis et al. 2002).

Thrombopoetin wird aus 353 Aminosäuren gebildet, wovon anschließend 21 Aminosäuren abgespalten werden. Es entsteht ein Protein mit einer EPO-ähnlichen, rezeptorbindenden *N*-terminalen und einer stark glykosilierten *C*-terminalen Domäne, die die Stabilität der Aminosäurekette gewährleistet (de Sauvage et al. 1994; Foster et al. 1994; Lok et al. 1994; Sohma et al. 1994).

Der Rezeptor für Thrombopoetin (cMPL) wurde ursprünglich als zelluläres Analogon eines retroviralen Onkogens (vMpl) entdeckt und in die Zytokinrezeptorsuperfamilie eingeordnet (Souyri et al. 1990). Er zeigt große Ähnlichkeit zu den Rezeptoren für Erythropoietin und Interleukin-3 (Vigon et al. 1992).

Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch eine Dimerisierung nach Bindung seines Liganden TPO. Es folgt die Induktion von Signalwegen, welche zur Modifikation der mitochondrialen und nukleären Transkriptionsaktivität führen (Gurney et al. 1995; Nagata und Todokoro 1995; Skoda et al. 1993) (Abb. 2).

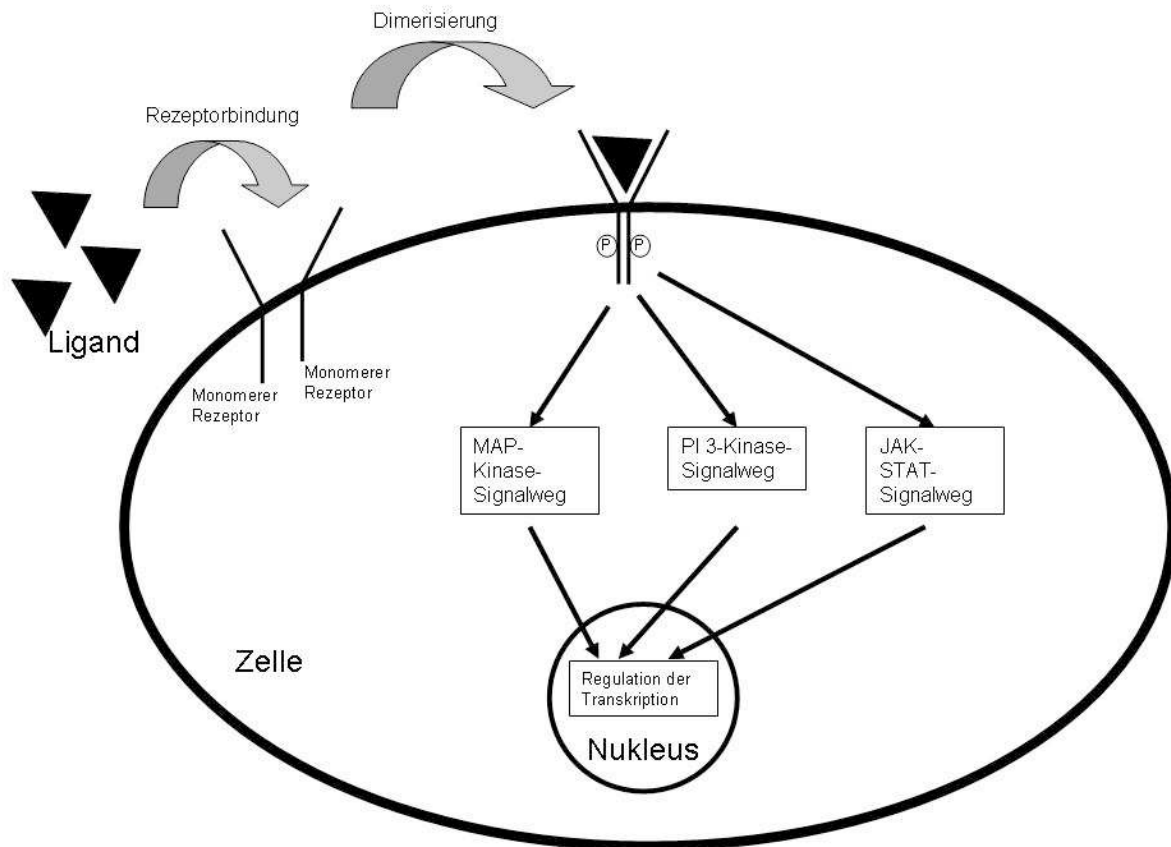


Abb. 2: Dargestellt sind Wege der Signalübertragung durch den TPO-Rezeptor. Nach Aktivierung durch den Liganden findet eine Dimerisierung des Rezeptors statt. Anschließend werden über Phosphorylierung die MAP-, PI3- und JAK/STAT-Signalwege aktiviert, die das proliferative Signal in den Nukleus übertragen.

Thrombopoetin wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert, in kleineren Mengen auch in der Niere, der Milz und dem Knochenmark, wobei die Synthese wenig von externen Signalen beeinflusst wird (Jelkmann 2001). Die Transkription und Translation des TPO-Gens laufen mit stets konstanter Geschwindigkeit ab (Stoffel et al. 1996; Yang et al. 1999). Die Konzentration des freien TPO im Blut ist im Wesentlichen von der Zahl der zirkulierenden Thrombozyten abhängig, welche Thrombopoetin binden und internalisieren und damit dem Blutkreislauf entziehen (Fielder et al. 1996). Somit steigt die TPO-Blutkonzentration mit fallender Thrombozytenzahl und bleibt erhöht bei persistierender Thrombozytopenie. Umgekehrt sinkt sie nach Transfusion von Thrombozyten in thrombozytopenen Tieren oder Menschen (Kuter und Rosenberg 1995; Scheduling et al. 2002).

Die wesentliche Funktion von TPO ist die Stimulation der Thrombozytopoese. Die Größe, Aktivität und Zahl der Megakaryozyten werden erhöht und die Expression

Plättchen-spezifischer Marker stimuliert (Broudy et al. 1995; Kaushansky et al. 1994; Kuter et al. 1994). Dabei beschränkt sich die Wirkung auf frühe Vorstufen der Megakaryozyten und auf hämatopoetische Stammzellen. Auf späte Stadien der Megakaryozyten und auf Thrombozyten hat Thrombopoetin nur wenig Einfluss (Choi et al. 1996; Kojima et al. 1995). Es ist nicht in der Lage, die Freisetzung von Plättchen aus Megakaryozyten zu beschleunigen. Dieser Prozess wird sogar verlangsamt (Choi et al. 1996).

Auf Thrombozyten hat Thrombopoetin auch in hohen Dosen keine direkt aktivierende Wirkung. Vielmehr erhöht es die Empfindlichkeit der Thrombozyten auf aggregationsfördernde Stimuli. Nach Kontakt mit hohen Dosen von TPO benötigen Plättchen nur halb so viel Adenosindiphosphat für die Aktivierung mit konsekutiver Aggregation (Harker et al. 1996; Peng et al. 1996).

Die Bedeutung von TPO für die Bildung der Blutplättchen wird klar, wenn man genetisch veränderte Mäuse betrachtet, die nicht in der Lage sind, TPO oder seinen Rezeptor zu synthetisieren. Die Zahl der zirkulierenden Thrombozyten, der Megakaryozyten und der Vorstufen ist bei diesen Tieren um 85 bis 95 % erniedrigt (Alexander et al. 1996; Carver-Moore et al. 1996; Gurney et al. 1994).

In Verbindung mit weiteren hämatopoetisch wirksamen Substanzen, wie Erythropoietin oder Stammzellfaktoren (colony stimulating factors (CSF)) hat TPO einen synergistischen Effekt auf das Wachstum myeloischer und erythroider Vorstufen (Ku et al. 1996; Rasko et al. 1997; Sitnicka et al. 1996).

4.3.2 Das pleiotrope Potential von Thrombopoetin

Neben den oben beschriebenen Effekten auf die Hämatopoese und hier insbesondere auf die Thrombozytopoese wurden für TPO weiterreichende Effekte nachgewiesen. Li et al. (2006) zeigten an Ratten, dass TPO im Doxorubizin-Schadensmodell einen protektiven Effekt auf Myokardzellen hat. Weiterhin konnte durch die Prämedikation mit TPO die Größe des Infarktgebietes nach Ischämie/Reperfusion am Herzen der Ratte verringert werden (Baker et al. 2008). Im Gegensatz dazu wirkt Thrombopoetin unter hypoxischen Bedingungen auf undifferenzierte Neurone proapoptotisch. Anhand dieser Ergebnisse kann nicht angenommen werden, dass TPO ein generell protektives Wirkspektrum zeigt. Vielmehr hat es in Abhängigkeit vom betrachteten Gewebe und vom angewandten Schadensmodell unterschiedliche Effekte. Die Auswirkungen von Thrombopoetin auf den Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber

lassen sich also nicht extrapolieren, auch wenn für das nahe verwandte EPO bereits protektive Effekte nachgewiesen sind (Yilmaz et al. 2004). Am Neuron, zum Beispiel, sind EPO und TPO Gegenspieler unter hypoxischen Bedingungen. Während EPO protektiv auf hypoxische undifferenzierte Neurone wirkt (Yis et al. 2008), steigert TPO die Apoptoserate derselben unter den Bedingungen der Hypoxie (Ehrenreich et al. 2005).

4.4 Ziele der Studie

Das Ziel der Studie war es, am Mausmodell zu untersuchen, welchen Effekt Thrombopoetin auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber hat. Wie bereits erwähnt, wurden für EPO protektive Effekte im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens sowie des akuten Leberversagens beschrieben. Thrombopoetin ist dem EPO strukturell sehr ähnlich. Auch eine Kreuzreaktion an dessen Rezeptor ist nicht ausgeschlossen (Rouleau et al. 2004). Es ist daher möglich, dass Thrombopoetin an seinem quantitativ wichtigsten Bildungsort, der Leber, die Auswirkungen von Schädigungen unterschiedlicher Ätiologie modifizieren kann.

Folgende zentrale Fragestellungen sollten beantwortet werden:

- Verbessert die Applikation von Thrombopoetin die nutritive Perfusion und vermindert sie die Leukozytenakkumulation in der durch Ischämie/Reperfusion geschädigten Leber?
- Hat die Vorbehandlung mit TPO einen Effekt auf die Integrität hypoxischer Zellen? Beeinflusst sie die Apoptose- und Nekroserate nach Ischämie und Reperfusion der Leber?
- Wird die Freisetzung intrazellulärer Enzyme durch (sub)letale Zellschädigungen beeinflusst?
- Welchen Einfluss hat die Vorbehandlung mit TPO auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine?
- Hat TPO einen direkten Einfluss auf die Thrombozytenaktivität?
- Kann Thrombopoetin als Therapeutikum zur Minderung der Folgen des Ischämie-/Reperfusionsschadens an der Leber herangezogen werden?

5 Material und Methoden

5.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche C57BL/6J-Mäuse mit einem Körpergewicht zwischen 19 und 24 g und einem Alter von 12 bis 16 Wochen. Sie entstammten der eigenen Zucht der dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock angeschlossenen Zentralen Versuchstierhaltung.

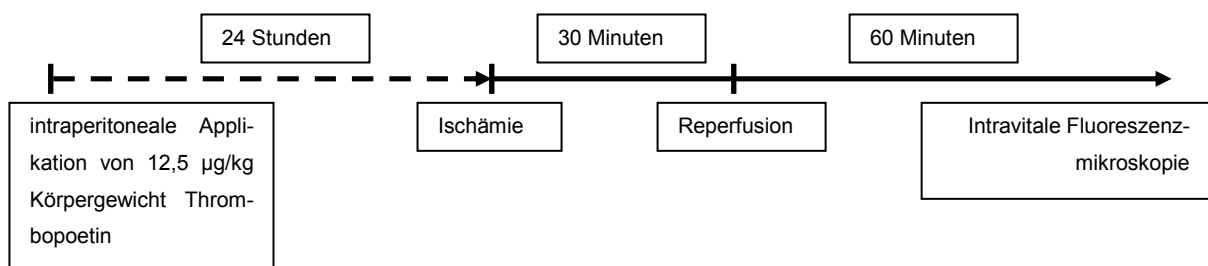
Die Mäuse wurden bei kontrolliertem Tag-/Nachtzyklus in Gruppen von 3 bis 5 Tieren in Makrolon-Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und einem Standardfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz §8 Abs. 1 durch die örtliche Tierschutzbehörde genehmigt.

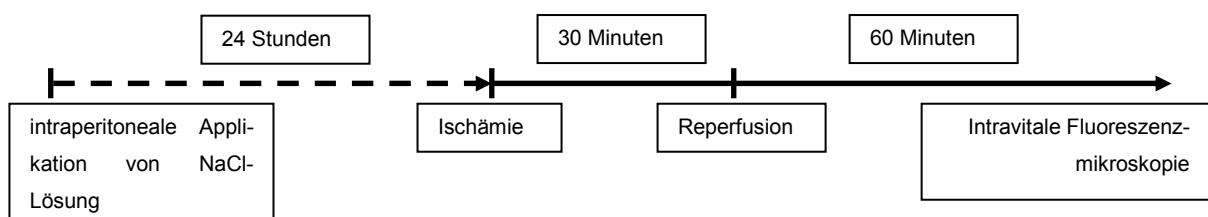
5.2 Tiermodell

Es wurden, unterteilt nach Art der Prämedikation und Dauer der Ischämie, fünf Gruppen gebildet:

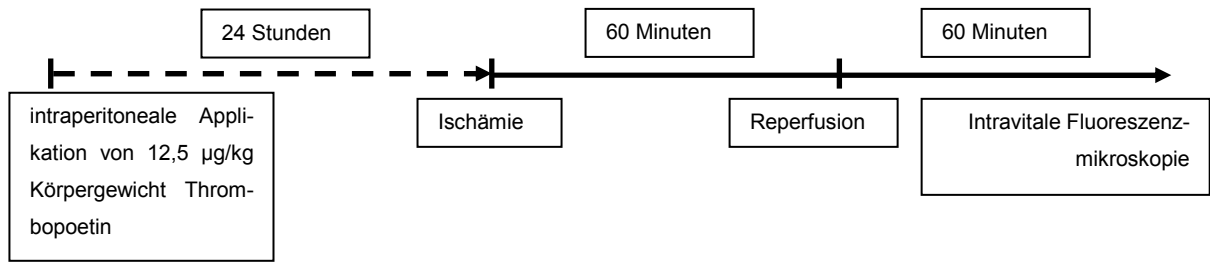
1. **TPO 30/60**: mit TPO vorbehandelte Tiere, 30 min Ischämie- und 60 min Reperfusionzeit (n = 7).



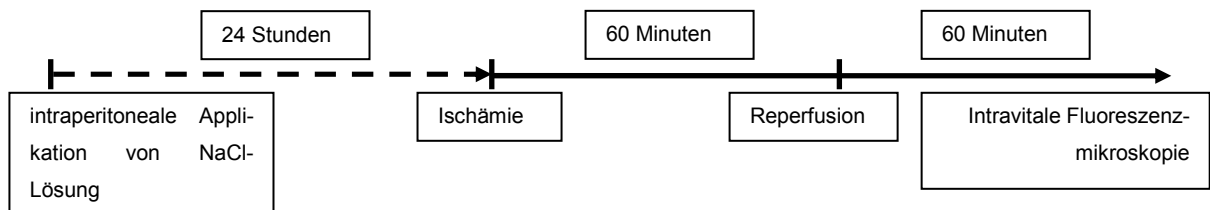
2. **KON 30/60**: mit NaCl-Lösung vorbehandelte Tiere, 30 min Ischämie- und 60 min Reperfusionzeit (n = 7).



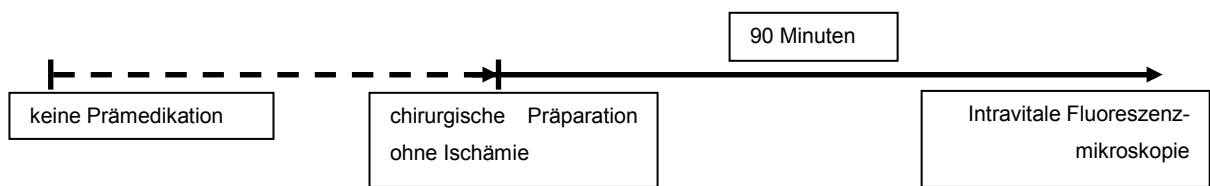
3. **TPO 60/60**: mit TPO vorbehandelte Tiere, 60 min Ischämie- und 60 min Reperfusionzeit (n = 7).



4. **KON 60/60**: mit NaCl-Lösung vorbehandelte Tiere, 60 min Ischämie- und 60 min Reperfusionzeit (n = 7).

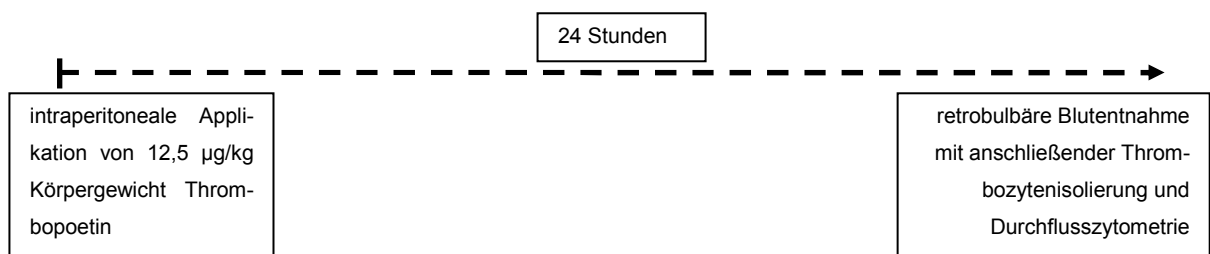


5. **Sham**: keine Vorbehandlung, keine Ischämie, analoges chirurgisches Vorgehen, anschließend 90 min Wartezeit (n = 7).

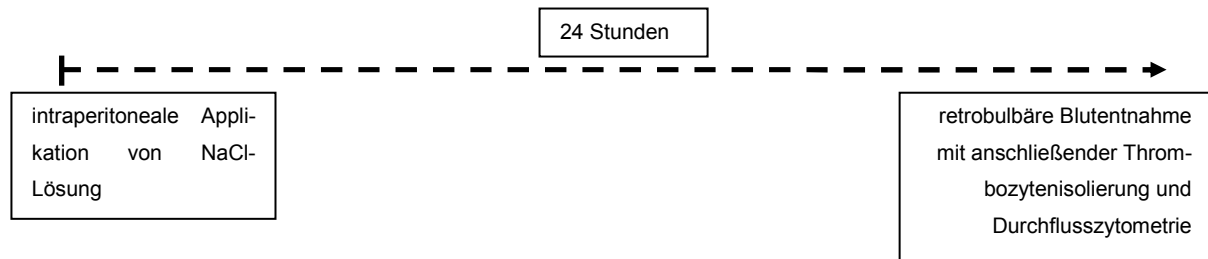


Weitere zwei Gruppen wurden gebildet, um Blut für die durchflusszytometrische Untersuchung der Thrombozytenaktivität zu gewinnen:

6. **TPO**: mit TPO-Lösung vorbehandelte Tiere, denen 24 Stunden später retrobulbär das Blut für die Thrombozytenisolierung entnommen wurde (n = 4).



7. **KON**: mit NaCl-Lösung vorbehandelte Tiere, denen 24 Stunden später retrobulbär das Blut für die Thrombozytenisolierung entnommen wurde (n = 4).



Die Zuordnung der Tiere zu den TPO- bzw. KON-Gruppen erfolgte verblindet und zufällig.

5.2.1 Prämedikation

Den Mäusen der TPO-Gruppen wurde 24 Stunden vor Induktion der Ischämie des linken Leberlappens bzw. 24 Stunden vor Blutentnahme eine Thrombopoetinlösung (Sigma Aldrich, St.Louis, USA) in einer Konzentration von 12,5 µg/kg Körpergewicht (KG) intraperitoneal injiziert.

Die Kontroll-Tiere erhielten analog 24 Stunden vor Induktion der Ischämie NaCl-Lösung (0,9 %) gleichen Volumens/kg KG intraperitoneal. Die Applikation der Prämedikationslösungen erfolgte verblindet.

5.2.2 Anästhesie und chirurgische Präparation

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 75 mg/kg KG Ketamin (Ketamin®, Betapharm GmbH & Co. KG, Vechta, Germany) und 25 mg/kg KG Xylazin (Rompun®, Bayer Vital GmbH, Bayer HealthCare, Germany) narkotisiert. In Narkose wurden sie an Hals und Bauch elektrisch enthaart (Favorita 2, Aesculap, Suhl, Deutschland) und spontan-atmend in Rückenlage auf einer Heizplatte (Klaus Effenberger, Pfaffing, Deutschland) fixiert, um eine konstante Körpertemperatur von 36°C bis 37°C zu gewährleisten.

Zur späteren Injektion von Farbstoffen und zur Volumensubstitution wurde in die Vena jugularis sinistra ein Polypropylenkatheter (Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm, Smiths Medical International Ltd., Kent, UK) eingelegt. Dazu wurde am mikrochirurgischen Arbeitsplatz unter Verwendung eines binokularen Operationsmikroskops (M651 MSD, Leica, Wetzlar, Deutschland, Vergrößerung von 5 bis 40fach) links paratracheal längs inzidiert. Anschließend erfolgte die Präparation der

Vene. Nach Anschlingen des Gefäßes wurde über eine kleine Inzision der Katheter eingelegt und mit den zuvor platzierten Fäden fixiert.

5.2.3 Induktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Nach Platzierung des Katheters erfolgte die Longitudinal- und Transversal-Laparotomie unter Blutstillung mittels Thermokoagulation. Die kranialen Anteile der Bauchdecken wurden an Haken fixiert, um das perihepatische Operationsfeld frei zu halten. Im Anschluss erfolgte das Lösen des linken Leberlappens aus seinen Haltebändern am Zwerchfell und Retroperitoneum. Das zuführende Gefäßnervenbündel (Äste der V. porta und der A. hepatica, abführende Gallengänge) wurden nun mittels eines Gefäßclips reversibel unterbunden. Die richtige Positionierung des Clips konnte durch Beobachtung des unverzüglichen Ablassens des Leberparenchyms kontrolliert werden. Bei Sham-Tieren erfolgte ein analoges chirurgisches Vorgehen, jedoch ohne Setzen des Clips. Nach einer Ischämiezeit von 30 oder 60 min erfolgte die Entfernung des Clips zur Reperfusion mit einer Dauer von 60 min.

Die geöffnete Bauchhöhle wurde während der Wartezeiten durch Readaptation der Bauchdecken sowie mit Folie und aufliegender feuchter Kompresse vor Austrocknung und Luftsauerstoff geschützt.

Zehn Minuten vor Ablauf der Reperfusionszeit wurde der linke Leberlappen ausgelagert und für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet. Dazu wurde der Leberlappen auf einer speziellen individuell anzupassenden Vorrichtung mit der Dorsal-seite nach oben zugfrei ausgelagert. Ein Deckglas wurde drucklos aufgebracht. Zum Schutz des Intestinums vor Austrocknung wurde dieses mit Folie bedeckt. Zusätzlich wurde es regelmäßig superfundiert.

5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

5.3.1 Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenz ist ein optisches Phänomen, bei dem die Absorption eines (exzitativen) Photons die Emission eines Photons höherer Wellenlänge auslöst. Der Begriff ist vom Namen des Minerals Fluorit (Kalziumfluorid) abgeleitet, welches dieses Phänomen aufweist. Bei diesem Mineral liegt das absorbierte Licht im UV-Bereich, das emittierte Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich. Technisch lassen sich auch Lichtstrahlen mit Wellenlängen im sichtbaren Bereich zur Exzitation nutzen, um eine Emission von Photonen hervorzurufen, welche vom menschlichen Auge wahrgenommen werden können. Um Fluoreszenzeigenschaften zu definieren, müssen daher sowohl die exzitative als auch die emittierte Wellenlänge angegeben werden.

Das für diese Studie genutzte Fluoreszenzmikroskop ist ein Auflichtmikroskop. Als Lichtquelle dient eine 100 W Quecksilberlampe. Zur Anregung verschiedener fluoreszierender Farbstoffe wird Licht unterschiedlicher Wellenlänge benötigt. Ein der Lichtquelle nachgeschalteter Filterblock (Axiotech vario, Zeiss, Jena, Deutschland) ermöglicht die selektive Exzitation mit Licht grüner (Exzitation: Wellenlänge 530-560 nm; Emission: Wellenlänge > 580 nm) und blauer Wellenlänge (Exzitation: Wellenlänge 450-490 nm; Emission: Wellenlänge > 515 nm) sowie mit UV-Licht (Exzitation: Wellenlänge 330-380 nm, Emission: Wellenlänge > 414 nm).

Um die Registrierung des emittierten Lichtes frei von reflektierter exzitativer Strahlung zu ermöglichen, sind Strahlenquelle und Kamera räumlich voneinander getrennt. Dadurch können Filter eingebracht werden, die die reflektierte Strahlung abfangen und nur die tatsächlich emittierte Strahlung zur Darstellung kommen lassen (Abb. 3).

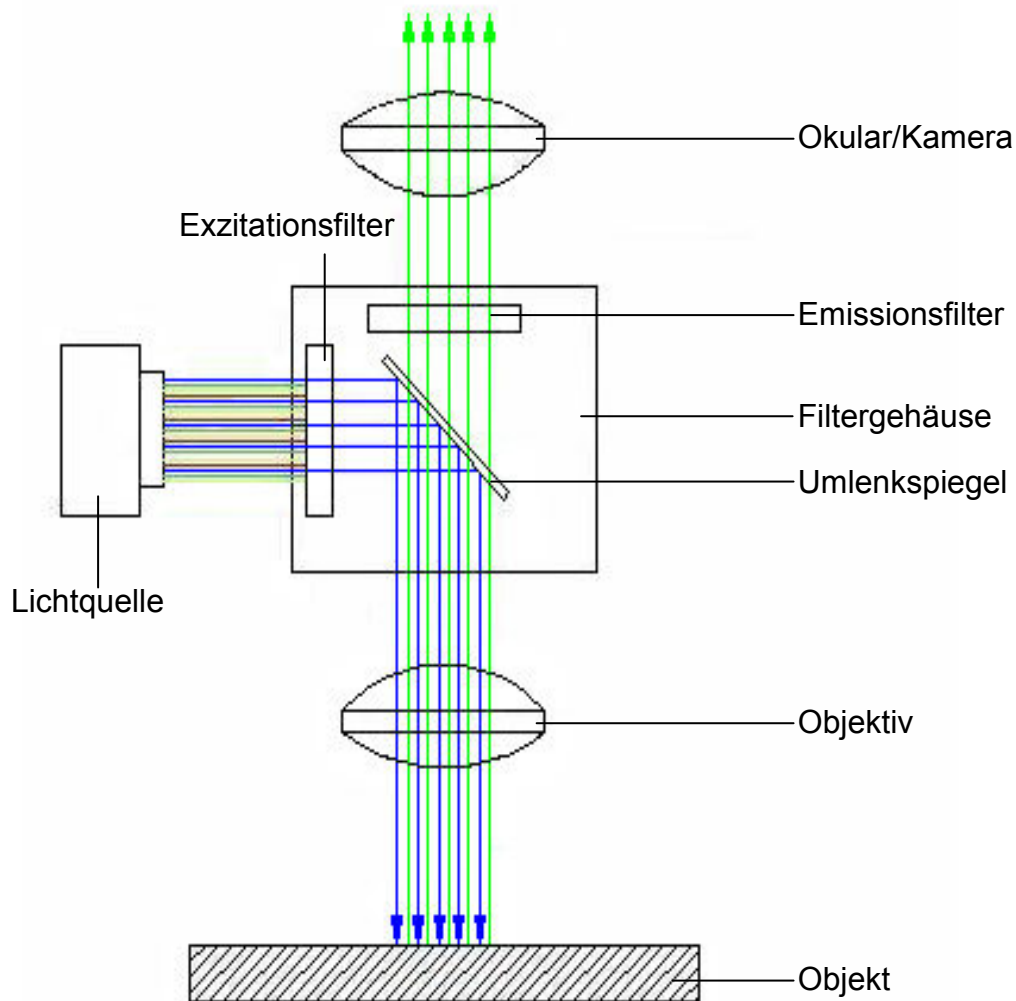


Abb. 3 Schematische Darstellung des Strahlenverlaufs der Photonen des IVM (blau dargestellt ist die exzitative Strahlung, grün die emittierte, modifiziert nach Juelich (2009))

Die intravitalfluoreszenzmikroskopischen Bilder können mittels einer CCD-Videokamera (FK 6990AIQ, Pieper, Berlin, Deutschland) auf einen Bildschirm übertragen und gleichzeitig durch ein Videoband-Gerät (Fuji magnetics GmbH, Kleve, Deutschland) gespeichert werden. Durch Objektive mit 10-, 20-, und 40-facher Vergrößerung kann das betrachtete Areal von 212- über 424- bis 848-fach vergrößert dargestellt werden.

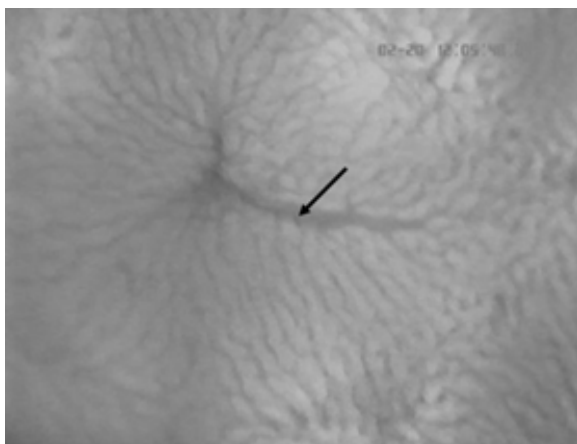
Um die Aufnahmen später eindeutig zuordnen zu können, werden durch einen Videozeitgenerator (Fora video timer, Modell VTG33, Fora company limited, Japan) das Datum und die Uhrzeit sowie eine individuelle Kennung eingeblendet.

Die Auswertung erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt off-line an einem PC-Arbeitsplatz unter Verwendung des Programms CaplImage (CaplImage; Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

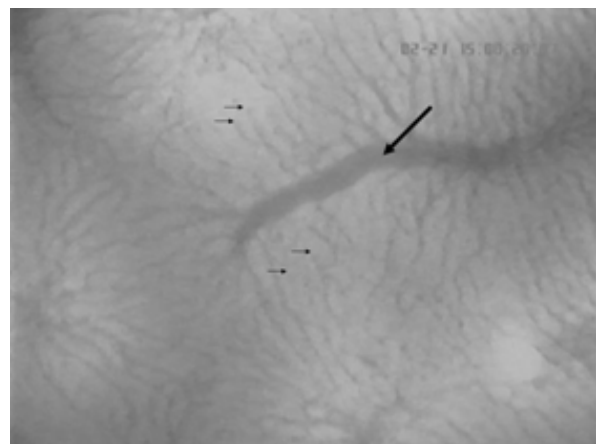
Die Intravitalmikroskopie ermöglicht die Erfassung dynamischer Prozesse, wie der mikrovaskulären Perfusion, der Leukozytenakkumulation, der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie morphologischer Veränderungen des Leberparenchyms.

5.3.2 Sinusoidale Perfusion

Zur Evaluation der Mikrozirkulation wurden die Kapillaren durch die intravenöse Gabe von 2 $\mu\text{mol/kg}$ KG des Fluoreszenzfarbstoffs Natriumfluoreszein (Merck, Darmstadt, Deutschland) zum umgebenden Gewebe kontrastiert. Dieser Farbstoff dissoziiert zügig aus den Sinusoiden in die Hepatozyten und lässt diese in der Mikroskopie heller erscheinen. Anschließend erfolgte unter Licht blauer Wellenlänge bei 212-facher Vergrößerung die Aufnahme von zehn zufällig ausgewählten Leberazini über die Dauer von jeweils 20 Sekunden (Abb. 4).



A



B

Abb. 4: Exemplarische Bilder von regelrecht perfundierten Sinusoiden (A) und von Perfusionsausfällen von Sinusoiden (B, kleine Pfeile) des Leberparenchyms unter 212-facher Vergrößerung. Zentral im Bild jeweils die postsinusoidale Venole (großer Pfeil). Die Kontrastierung der Gefäße erfolgte mittels Aufhellung des Gewebes durch Applikation von Natriumfluoreszein und Exzitation mit blauem Licht.

5.3.3 Sinusoidale Leukozytenstase

Die Darstellung der Leukozyten erfolgte mittels Kontrastierung mit 1 $\mu\text{mol/kg}$ KG Rhodamin 6G (Merck, Darmstadt, Deutschland), welches durch Licht grüner Wellenlänge bei 424-facher Vergrößerung angeregt wurde. Zehn zufällig ausgewählte Gesichtsfelder wurden anschließend jeweils für 20 s aufgezeichnet (Abb. 5).



Abb. 5: Exemplarisches Bild von Leukozyten (Pfeile) im Leberparenchym in 424-facher Vergrößerung. Diese wurden mittels Rhodamin gegenüber dem umgebenden Gewebe kontrastiert. Unter Exzitation mit Licht grüner Wellenlänge heben sie sich optisch als helle Punkte vom Gewebe ab.

5.3.4 Leukozytenrolling und -adhärenz in den Venolen

Unter Exzitation mit blauem Licht und Gabe von 2 $\mu\text{mol/kg}$ KG Natriumfluoreszein (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei gleichzeitiger Gabe von 1 $\mu\text{mol/kg}$ KG Rhodamin 6G (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden Venolen bei 424-facher Vergrößerung zufällig aufgesucht. Nach Wechsel in die Exzitation durch grünes Licht erfolgte über jeweils 20 s die Erfassung der mit Rhodamin markierten frei fließenden, rollenden und über die gesamte Zeitspanne fest adhärennten Leukozyten (Abb. 6).

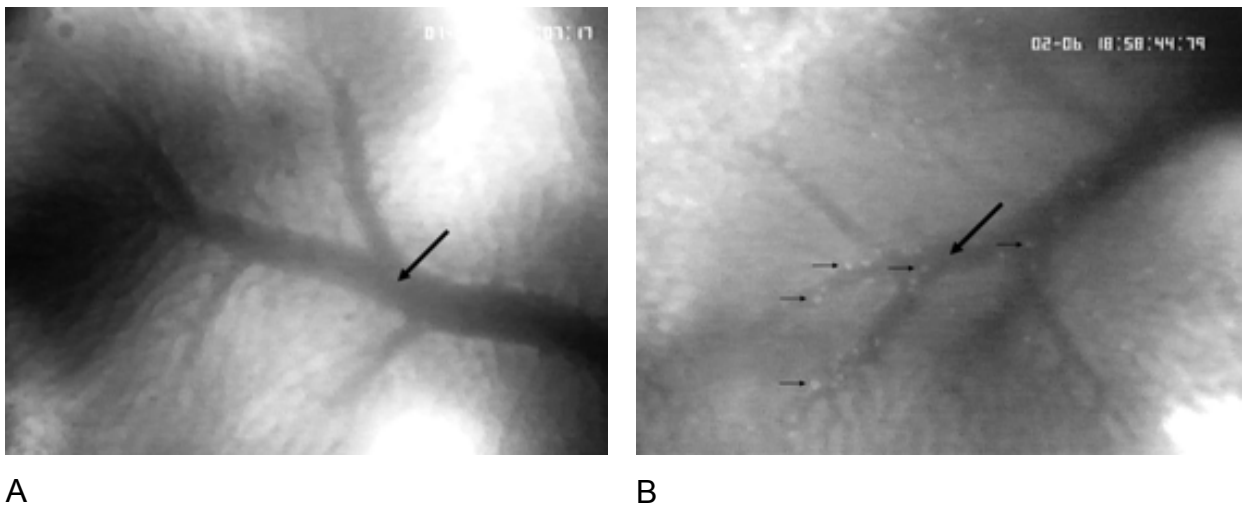


Abb. 6: Exemplarische Bilder von postsinusoidalen Venolen (großer Pfeil) unter Exzitation mit grünem Licht nach Applikation des Farbstoffes Rhodamin 6G in 424-facher Vergrößerung: Während in (A) keine adhärennten oder rollenden Leukozyten zu sehen sind, finden sich in (B) zahlreiche adhärennte und rollende Leukozyten (kleine Pfeile) an der Venolenwand.

5.3.5 Hepatozelluläre Apoptose

Die Visualisierung der Hepatozyten-Zellkerne erfolgte durch Anfärbung des Chromatins der Zellkerne mit Bisbenzimid. Bei 848-facher Vergrößerung wurden unter Anregung mit UV-Licht kondensierte und fragmentierte Zellkerne von normalen Zellkernen unterschieden. Kondensation und Fragmentation des Chromatins sind Vorgänge im apoptotischen Zellkern (Abb. 7).

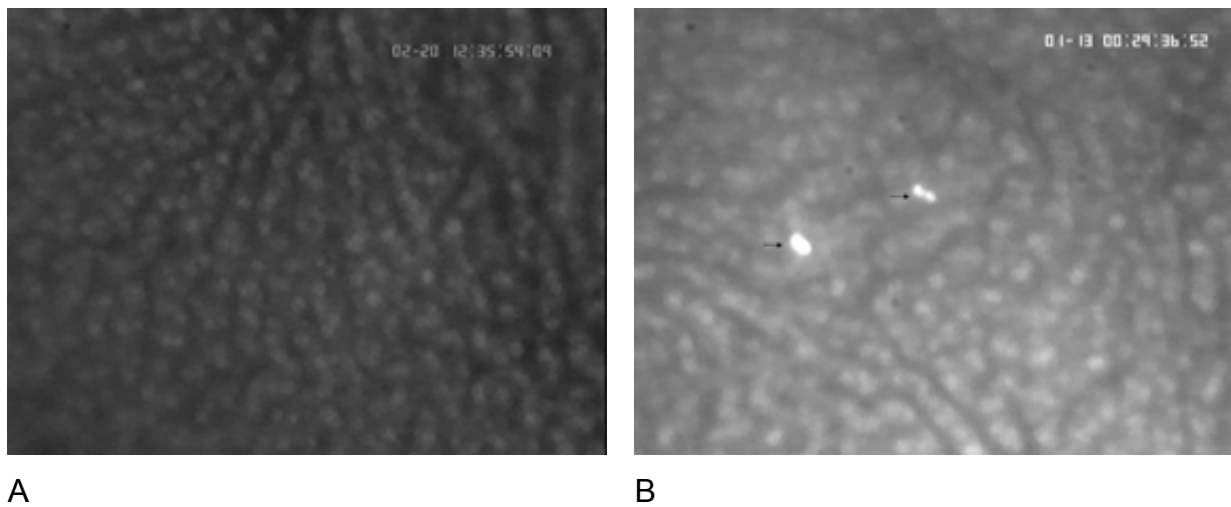


Abb. 7: Exemplarische Bilder von Aufnahmen des Leberparenchyms bei 848-facher Vergrößerung unter Exzitation mit UV-Licht nach Applikation von Bisbenzimid: In (A) sind keine auffälligen Zellkerne zu erkennen, während in (B) kondensiertes Chromatin in vier Zellkernen durch helles Aufleuchten markiert ist (kleine Pfeile).

5.3.6 Off-Line-Auswertung

Die Off-Line-Auswertung erfolgte verblindet mit Hilfe des Programms „CapImage“. Die sinusoidale Perfusion wurde erfasst, indem eine 200 µm lange Rasterlinie rechtwinklig über die Sinusoide midzonal der betrachteten Azini projiziert wurde. Nun wurde die Anzahl der perfundierten Sinusoide zu der Gesamtzahl der gekreuzten Sinusoide (durchschnittlich 10 bis 12) ins Verhältnis gesetzt (Abb. 8).

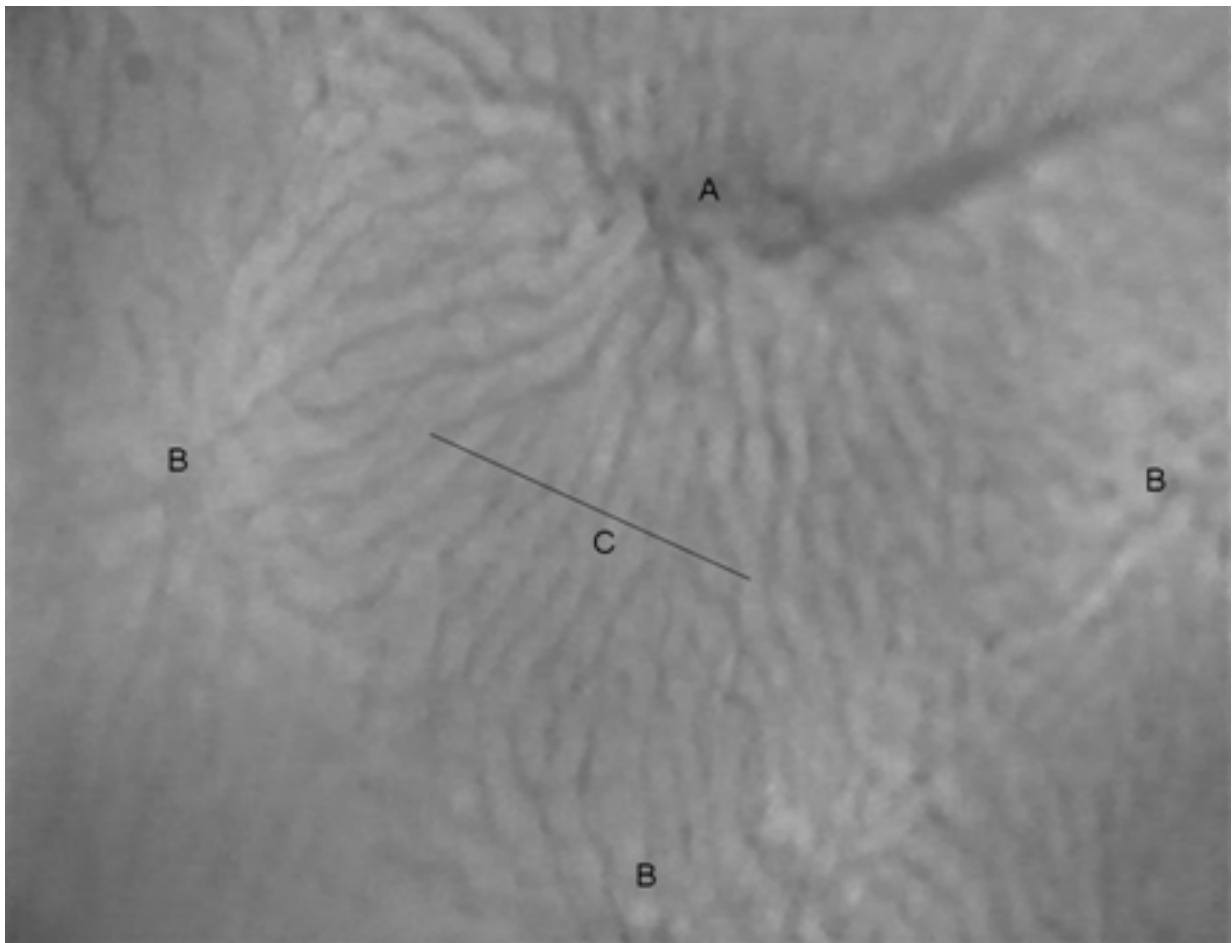


Abb. 8: Intravitalmikroskopische Aufnahme (212-fache Vergrößerung) mit projizierter 200 µm langer Linie zur Ermittlung der Zahl der kreuzenden Sinusoide. A: postsinusoidale Venole, B: Glisson'sche Trias, C: virtuelle Linie, welche hier 10 Sinusoide kreuzt.

Zur Auswertung der sinusoidalen Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden die im Sinusoid permanent stagnierenden Leukozyten zur beobachteten Fläche ins Verhältnis gesetzt.

Zur Auswertung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in Venolen wurden zunächst Länge und Durchmesser der auszuwertenden Abschnitte der Venolen markiert und vermessen. Unter Annahme einer zylindrischen Geometrie konnte so die Endotheloberfläche berechnet werden. Die im vermessenen Bereich über die gesamte Betrachtungsdauer adhärenenten Leukozyten wurden zu dieser Fläche ins Verhältnis gesetzt. Weiterhin wurden langsam fließende Leukozyten gezählt und in Relation zu allen im gleichen Zeitabschnitt passierenden Leukozyten gesetzt.

Die hepatozelluläre Apoptose wurde nach Darstellung des Zellchromatins mittels Bisbenzimid unter Exzitation mit UV-Licht beurteilt. Die Zahl der Kerne mit fragmentiertem oder kondensiertem Zellchromatin wurde im Verhältnis zur Gesamtfläche des beobachteten Areals angegeben.

5.4 Entnahme von Gewebeproben

Nach Beendigung der Aufnahmen am IVM wurden die Versuchstiere durch Entnahme von Blut aus der Vena cava inferior entblutet und damit getötet. Es konnten durchschnittlich 1,5 ml Vollblut je Maus gewonnen und in Ca^{2+} -EDTA-beschichteten Röhrchen asserviert werden. Anschließend wurde der linke Leberlappen entfernt und für die spätere histologische und immunhistologische Aufarbeitung in Portionen von ca. 8 mm³ aufgeteilt. Ein Teil dieser Portionen wurde nach Schockfrostung in flüssigem Stickstoff bei -80°C asserviert. Ein weiterer Teil des Gewebes wurde in 4%iger Formalinlösung für 2-3 Tage fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Als Kontrolle wurden Proben der nicht der Ischämie ausgesetzten Restleber entnommen und nach den gleichen Verfahren asserviert.

5.5 Plasmaanalytik und Blutbild

5.5.1 Erstellen von Blutbildern und Zentrifugation

Die entnommene Blutprobe wurde zunächst in einem mit EDTA beschichteten Röhrchen asserviert. Es folgte die Erstellung eines Blutbildes. Anschließend wurde nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4000 Umdrehungen/Minute (GS15 Zentrifuge, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) der Überstand abpipettiert. Das so gewonnene Plasma wurde bis zur biochemischen Analyse bei -20°C asserviert.

5.5.2 Bestimmung der leberspezifischen Enzyme

Zur Ermittlung von systemischen Auswirkungen des Ischämie-/Reperfusionsschadens als auch der Modifikation des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch TPO dienten verschiedene Verfahren der Plasma- und Blutbildanalyse. Das asservierte Plasma wurde zur Bestimmung der Aktivitäten der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), der Alanin-Aminotransferase (ALT) bzw. Glutamat-Pyruvat-Transaminase und der Aspartat-Aminotransferase (AST) bzw. Glutamat-Oxalacetat-Transaminase spektrophotometrisch (Bergmeyer et al. 1978) mit Hilfe des Hitachi 704 Automatic Analysers (Boehringer, Mannheim, Deutschland) genutzt.

5.5.3 Bestimmung von Interleukin-6

Die Messung der Aktivität von IL-6 als proinflammatorisches Zytokin erfolgte mittels eines Sandwich-ELISA (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) nach Herstellerangaben. Mit dieser Methode ist es möglich, Proteine in einer Probe von nur 12,5 µl Volumen zu detektieren.

5.6 Immunhistochemie des Thrombopoetin-Rezeptors

Die immunhistochemische Darstellung des Thrombopoetinrezeptors (cMPL) erfolgte anhand der in Paraffin eingebetteten Parenchymschnitte postischämischer und nicht-ischämischer Lebern. Diese wurden zunächst mittels Xylol entparaffiniert. Nach Zugabe der polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen Mäuse-, Ratten- und humanen TPO-Rezeptor (1:100, 06-944, Cell Signalling Technology, Frankfurt, Deutschland) wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte nach ent-

sprechenden Vorgaben die Anwendung eines auf biotinylierten Kopplungsantikörpern und HRP-markiertem Streptavidin basierenden Visualisierungskits (LSAB™ + Kit/HRP, Dako Cytomation). Im letzten Schritt wurden die HRP-Bindungsstellen mit Hilfe eines Chromogens (Dako Cytomation) sichtbar gemacht. Die Beurteilung erfolgte durchlicht-mikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung.

5.7 Thrombozytenisolierung und -aktivierung

Die Messung der Thrombozytenaktivität erfolgte mittels Analyse der Oberflächenrezeptoren Gp IIb/IIIa, CD 107 und P-Selektin durch ein durchflusszytometrisches Verfahren. Vier C57BL/6J-Mäuse wurden mit TPO- bzw. NaCl-Lösung vorbehandelt. 24 Stunden später erfolgte in Äthernarkose die retrobulbäre Blutentnahme mit Hilfe eines Kapillarröhrchens. Es konnten durchschnittlich 0,8 ml Blut gewonnen werden. Das Vollblut wurde mit 200 µl Pufferlösung (Tris-buffered Saline) und 20 U/ml Heparin asserviert. Die Probe wurde durchmischt und bei 500 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 300 x g für acht Minuten. Anschließend wurde das plättchenreiche Plasma vorsichtig entnommen und 0,5 µl gelöstes Prostacyclin (1 mol/l) zugegeben. Anschließend wurde die Probe für die Dauer von fünf Minuten bei 1300 x g zentrifugiert. Das entstehende Pellet wurde in 1 ml TBS, welche 1 mmol Kalziumchlorid, 2 µl Apyrase (10U/ml) und 0,5 µl gelöstes Prostacyclin (1 mol/l) enthielt, resuspendiert. Nach einer 30-minütigen Ruhephase bei einer Temperatur von 37°C erfolgte die Markierung der oben genannten Oberflächenantigene durch Zugabe der Antikörper-Lösung und die anschließende Aktivierung der Thrombozyten durch die Zugabe von Thrombin-Lösung und Kalzium. Nach Durchmischung wurden die Proben für eine Dauer von 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Aktivierung mittels Zugabe von 400 µl PBS gestoppt. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse mittels FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

Die Expression der Antigene wurde mittels folgender Antikörper gemessen:

Gp IIb/IIIa : JON/A, PE-konjugiert (rot, Emfret Analytics, Würzburg, Deutschland)

CD 107: LAMP1, FITC-konjugiert (grün, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

P-Selektin: WUG E9, FITC-konjugiert (grün, Emfret Analytics, Würzburg, Deutschland)

5.8 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat 3.0 (Jandel Corporation, SanRafael, CA, USA). Als Signifikanz wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angesehen. Die Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ($MW \pm SEM$) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte als gruppenweiser Paarvergleich bei Normalverteilung der Werte mittels einfaktorierter Varianzanalyse (one way analysis of variance). Waren die Werte nicht normal verteilt, erfolgte der gruppenweise Paarvergleich mittels Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Dunn`s-Test.

6 Ergebnisse

6.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

6.1.1 Sinusoidale Perfusion

Ischämie mit anschließender Reperfusion führt über die bereits beschriebenen Pathomechanismen zum Perfusionsausfall im Leberparenchym. Um diesen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen zu quantifizieren, wurden in der Off-Line-Auswertung der intravitalmikroskopischen Bilder die nicht perfundierten Sinusoide gezählt und in % aller midzonal betrachteten Sinusoide eines Azinus angegeben.

In den Gruppen mit 30-minütiger Ischämie und nachfolgender 60-minütiger Reperfusion zeigte sich nur ein geringer Perfusionsausfall. Nach einer Ischämie mit der Dauer von 60 Minuten und nachfolgender 60-minütiger Reperfusion war eine signifikante Reduktion der Anzahl perfundierter Sinusoide nachweisbar. Die Prämedikation mit Thrombopoetin führte nur zu einem sehr geringen Anstieg der Zahl der perfundierten Sinusoide nach 60-minütiger Ischämie (Abb. 9).

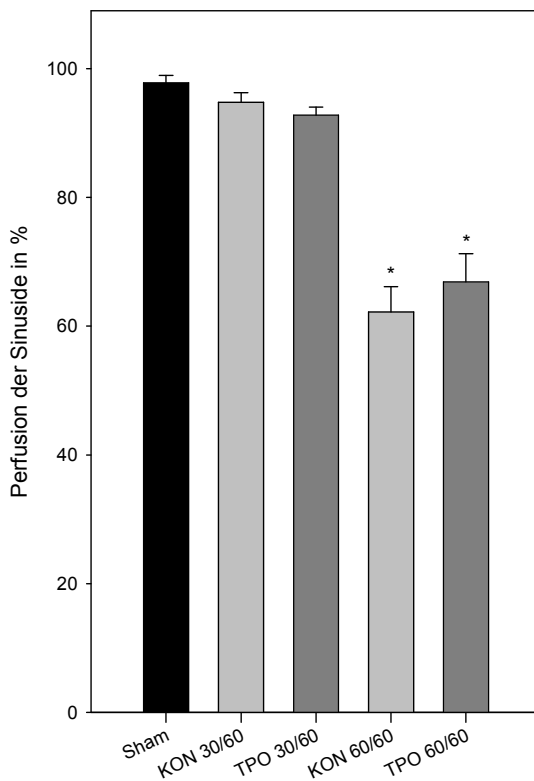


Abb. 9: Quantitative Analyse des Perfusionsversagens nach Ischämie und Reperfusion im Leberparenchym der Versuchstiere in der Sham-Gruppe ohne Ischämie, nach 30-minütiger Ischämie und Applikation der Kontrolllösung (KON 30/60) oder von Thrombopoetin (TPO 30/60) sowie nach 60-minütiger Ischämie und Applikation von Kontrolllösung (KON 60/60) oder von Thrombopoetin (TPO 60/60). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. * $p < 0,05$ vs. Sham

6.1.2 Sinusoidale Leukozytenstase

Als Maß der Leukozytenaktivierung wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Rahmen der Inflammation nach Ischämie und Reperfusion erfasst. Nur Leukozyten, die über die gesamte Beobachtungsdauer von 20 s im Sinusoid stagnierten, wurden gezählt und als Anzahl pro ausgewertete Fläche angegeben. Die Zahl der stagnierenden Leukozyten war nach 30-minütiger Ischämie nur tendenziell, nach 60-minütiger Ischämie signifikant gesteigert. Die Vorbehandlung mit Thrombopoetin führte zu keiner signifikanten Verminderung der sinusoidalen Leukozytenstase (Abb. 10).

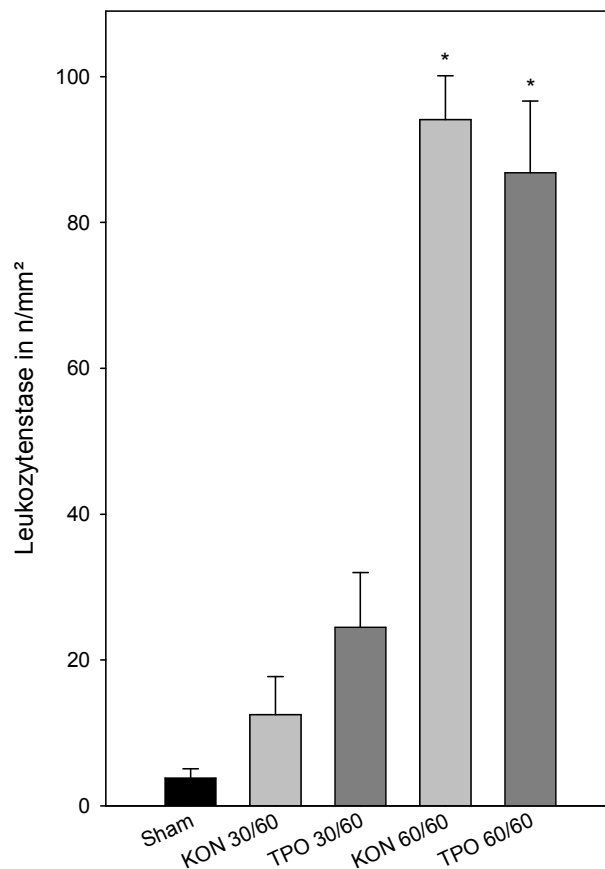


Abb. 10: Quantitative Auswertung der sinusoidalen Leukozytenstase im Leberparenchym der Versuchstiere in der Sham-Gruppe ohne Ischämie, nach 30-minütiger Ischämie und Applikation der Kontrolllösung (KON 30/60) oder von Thrombopoetin (TPO 30/60), sowie nach 60-minütiger Ischämie und Applikation von Kontrolllösung (KON 60/60) oder von Thrombopoetin (TPO 60/60). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. * $p < 0,05$ vs. Sham

6.1.3 Leukozytenrolling und Leukozytenadhärenz in den Venolen

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden manifestiert sich unter anderem in einer gesteigerten Aktivierung der Leukozyten. Als intravitalmikroskopisches Korrelat wurden in den Venolen die rollenden zu der Anzahl aller den Beobachtungsbereich passierenden Leukozyten ins Verhältnis gesetzt. Unabhängig von der Dauer der Ischämie wurde keine statistisch signifikante Steigerung des Leukozytenrollings in Venolen ermittelt (Abb. 11 A). Der Folgeschritt des Rollens entlang der Venolen ist die feste Adhärenz der Leukozyten am venulären Endothel, um im Anschluss in das Parenchym der Leber zu emigrieren. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der venulären Leukozytenadhärenz erst nach 60-minütiger Ischämie. Die Vorbehandlung mit TPO führte zu einer leichten, jedoch nicht signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenter Leukozyten (Abb. 11 B).

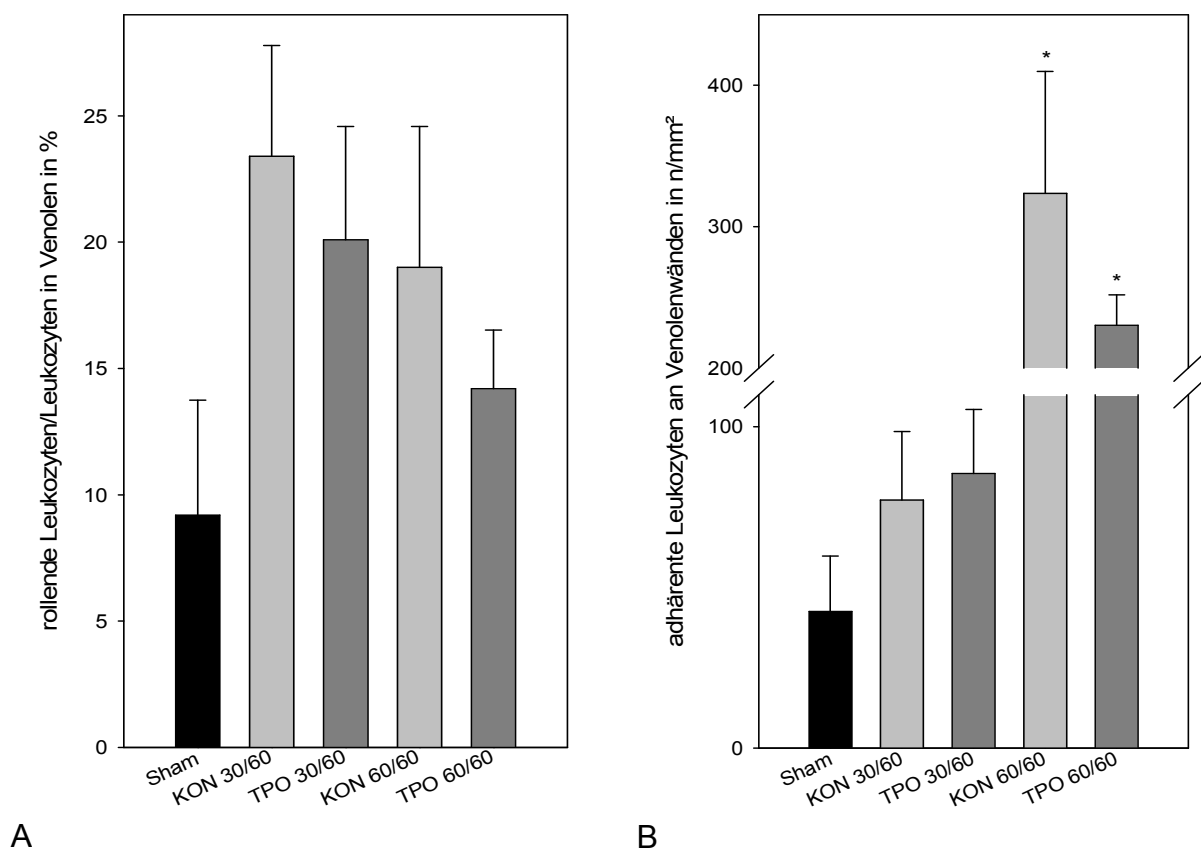


Abb. 11: Quantitative Analyse des Leukozytenrollings (A) in Relation zu allen passierenden Leukozyten in % sowie der Leukozytenadhärenz (B) in den Venolen in n/mm² als Maß für die Aktivierung der Leukozyten in der Sham-Gruppe ohne Ischämie, nach 30-minütiger Ischämie und Applikation der Kontrolllösung (KON 30/60) oder von Thrombopoetin (TPO 30/60), sowie nach 60-minütiger Ischämie und Applikation von Kontrolllösung (KON 60/60) oder von Thrombopoetin (TPO 60/60). Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. * p<0,05 vs. Sham

6.1.4 Hepatozelluläre Apoptose

Nach intravenöser Gabe von Bisbenzimid zur Anfärbung des Chromatins der Hepatozyten erfolgte intravitalmikroskopisch die Betrachtung der Zellkerne innerhalb einer zuvor definierten Fläche. Die durch fragmentiertes oder kondensiertes Chromatin auffallenden Kerne wurden als apoptotisch gewertet und ihre absolute Anzahl ins Verhältnis zur Fläche des betrachteten Areals gesetzt. Es konnte weder nach 30- noch nach 60-minütiger Ischämie ein signifikanter Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen ermittelt werden. Ebenso zeigte sich keine wesentliche Änderung der Zahl apoptotischer Zellen nach Gabe von TPO (Abb. 12).

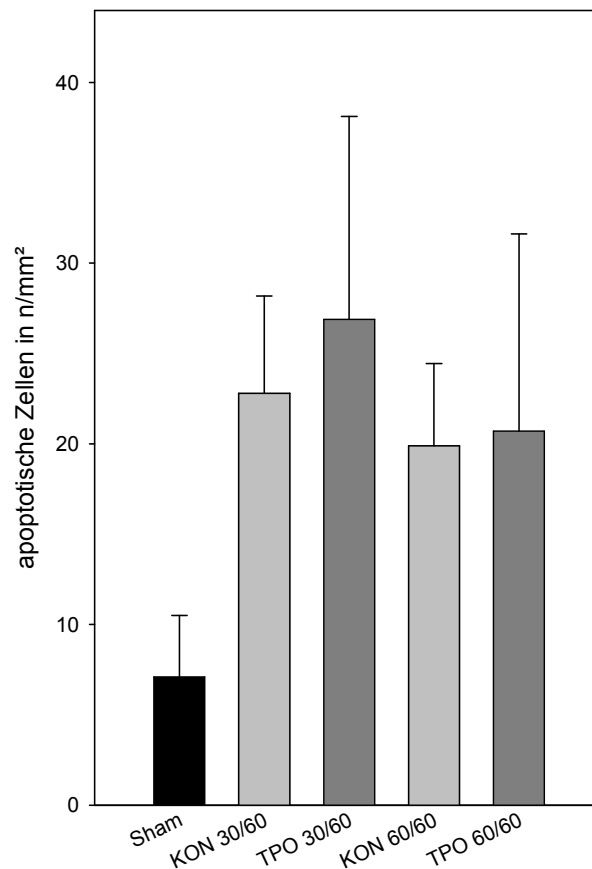


Abb. 12: Anzahl der intravitalmikroskopisch nach Anfärbung mit Bisbenzimid als apoptotisch zu wertenden Zellen je mm² in der Sham-Gruppe ohne Ischämie, nach 30-minütiger Ischämie und Applikation der Kontrolllösung (KON 30/60) oder von Thrombopoetin (TPO 30/60), sowie nach 60-minütiger Ischämie und Applikation von Kontrolllösung (KON 60/60) oder von Thrombopoetin (TPO 60/60). Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

6.2 Serumanalytik und Blutbild

Die Glutamatdehydrogenase wurde als Marker für eine schwere Schädigung des Leberparenchyms erfasst. Sie befindet sich intramitochondrial und wird somit erst nach massiver Zellschädigung freigesetzt. Gegenüber der Sham-Gruppe zeigte sich eine Verdopplung der GLDH-Werte sowohl nach 30-minütiger als auch nach 60-minütiger Ischämie, jedoch ohne Signifikanz. Durch die Vorbehandlung mit Thrombopoetin zeigte sich eine leichte Senkung der GLDH-Aktivität nach 30-minütiger Ischämie. Nach 60-minütiger Ischämie war ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Signifikanzen ergaben sich jedoch nicht (Abb. 13 A).

Die Aspartat-Aminotransferase ist ein unspezifisches Enzym, welches bei Leberschäden vermehrt freigesetzt wird. Es liegen zwei Isoformen vor, die zytoplasmatische und die mitochondriale AST. Neben der Leber kommt AST auch in den Zellen der Skelett- und Herzmuskulatur vor. Nach 30-minütiger Ischämie kam es zur Verdopplung der Plasmaaktivität von AST in beiden Gruppen. Nach 60-minütiger Ischämie zeigte sich ein gegenüber der Sham-Gruppe signifikanter Anstieg der AST-Aktivität auf über 3000 U/l, welche in der mit Thrombopoetin vorbehandelten Gruppe um 50% , jedoch nicht signifikant, vermindert war (Abb. 13 B).

Die Alanin-Aminotransferase ist ein vorwiegend im Zytosol von Hepatozyten lokalisiertes Enzym, welches bei erhöhter Konzentration im Serum eine Leberschädigung spezifisch anzeigt. Nach Ischämie/Reperfusion stieg die Plasmaaktivität von ALT im Vergleich zur Sham-Gruppe an. Sie verdoppelte sich nach 30-minütiger Ischämie, war jedoch erst nach 60-minütiger Ischämie signifikant erhöht. Die ALT-Plasmaaktivität lag in den TPO-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen deutlich höher, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 13 C).

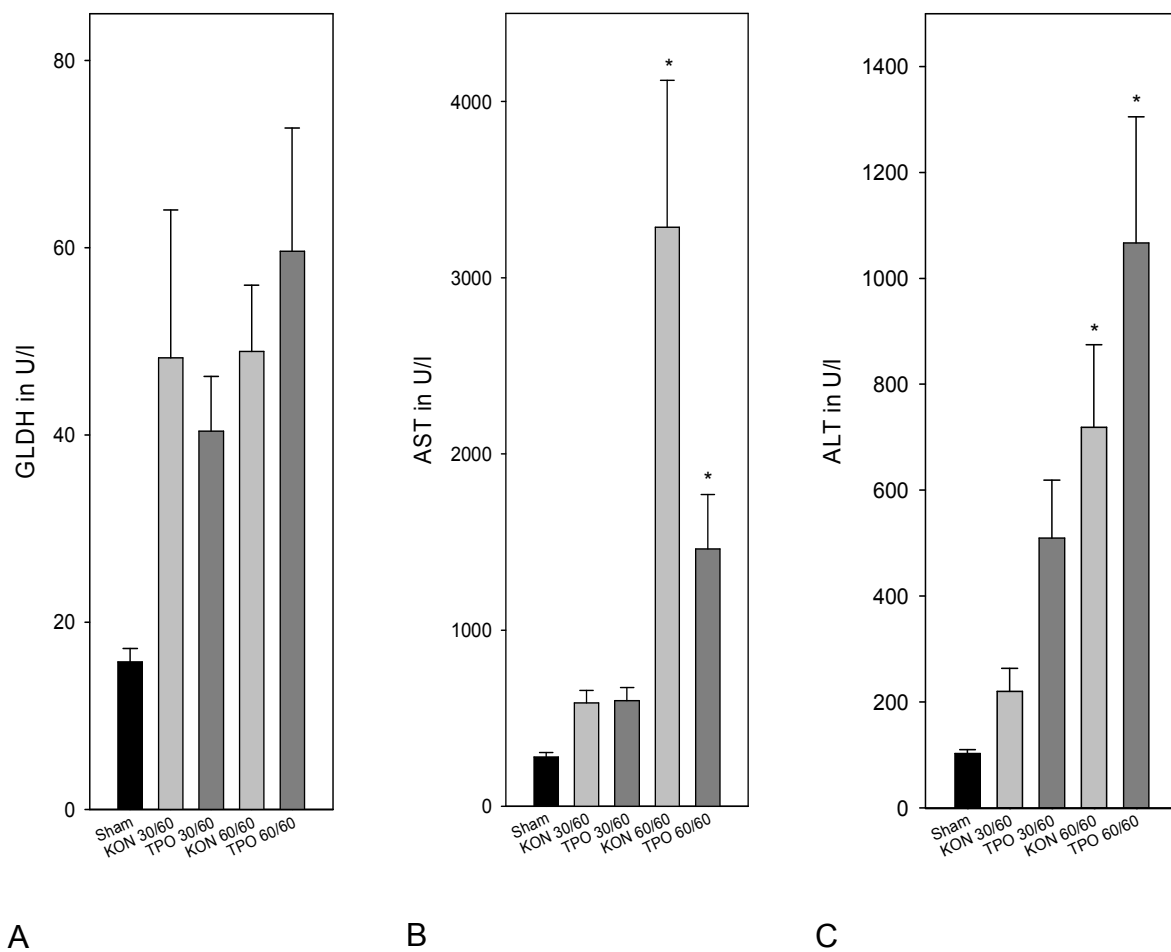


Abb. 13: Aktivitäten der Glutamatdehydrogenase (GLDH) (A), Aspartat-Aminotransferase (AST) (B) und Alanin-Aminotransferase (ALT) (C) in der Sham-Gruppe ohne Ischämie, nach 30-minütiger Ischämie und Applikation der Kontrolllösung (KON 30/60) oder von Thrombopoetin (TPO 30/60), sowie nach 60-minütiger Ischämie und Applikation von Kontrolllösung (KON 60/60) oder Thrombopoetin (TPO 60/60). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. * $p < 0,05$ vs. Sham

Das proinflammatorische IL-6 wird z.B. nach Bakterienkontakt von Monozyten und Makrophagen freigesetzt. Des Weiteren sind Endothel- und Epithelzellen in der Lage, IL-6 freizusetzen. Eine massive Freisetzung findet auch nach Ischämie statt. Die Messung von IL-6 im Serum der Versuchstiere der 5 Gruppen zeigte nach 30-minütiger Ischämie eine Verdreifachung der Konzentration, nach 60-minütiger Ischämie jedoch erst einen signifikanten Anstieg auf Werte über 1000 pg/ml. In den TPO-Gruppen war ein Abfall gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen zu erkennen, der jedoch nicht statistisch signifikant war (Abb. 14).

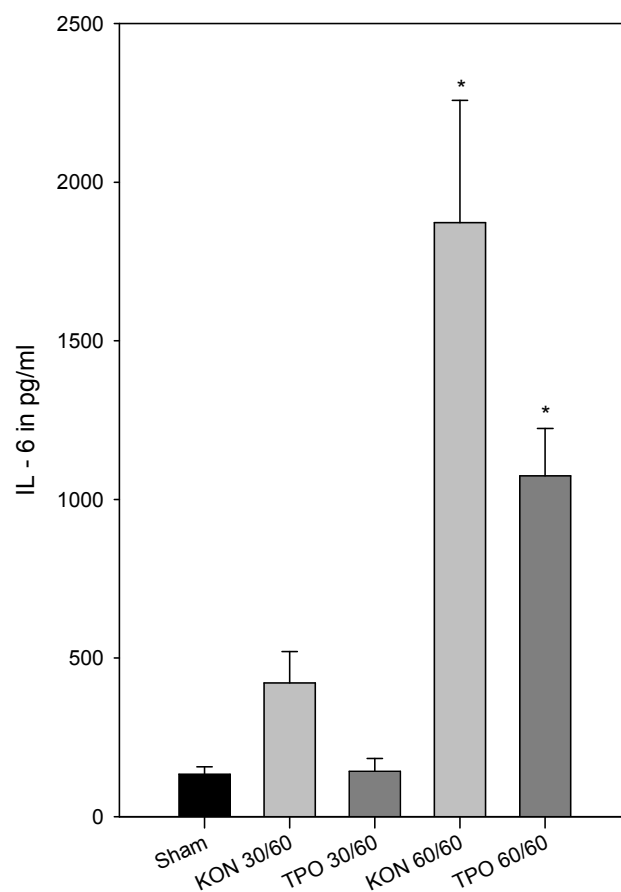


Abb. 14: Serumkonzentration von Interleukin-6 in der Sham-Gruppe ohne Ischämie, nach 30-minütiger Ischämie und Applikation der Kontrolllösung (KON 30/60) oder von Thrombopoetin (TPO 30/60), sowie nach 60-minütiger Ischämie und Applikation von Kontrolllösung (KON 60/60) oder Thrombopoetin (TPO 60/60). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. * $p < 0,05$ vs. Sham.

Um Veränderungen des Blutbildes durch Ischämie und Reperfusion der Leber sowie eine mögliche hämatopoetische Wirkung von Thrombopoetin zu erfassen, wurden die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen aus dem Vollblut aller Versuchstiere gemessen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Zellzahlen zwischen den Gruppen (Abb. 15 A-C).

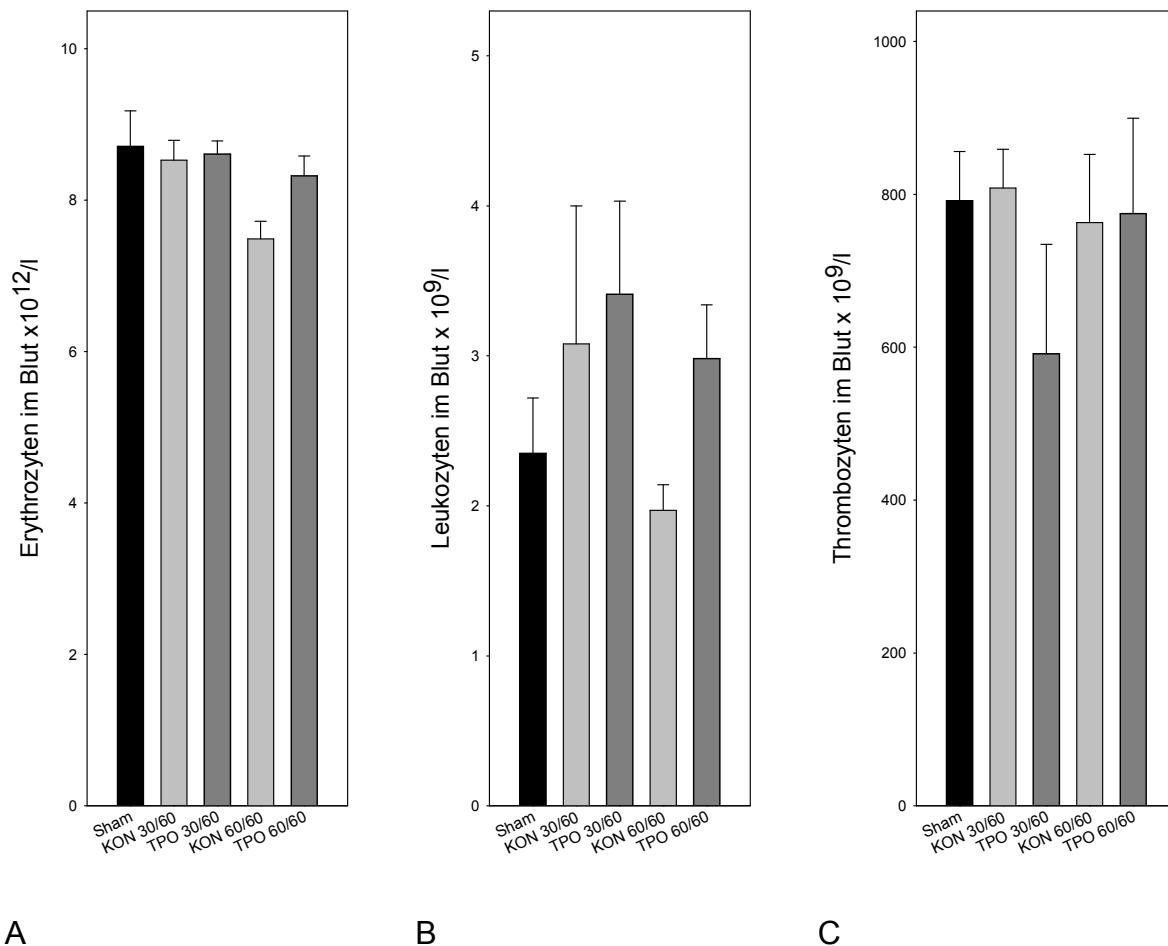
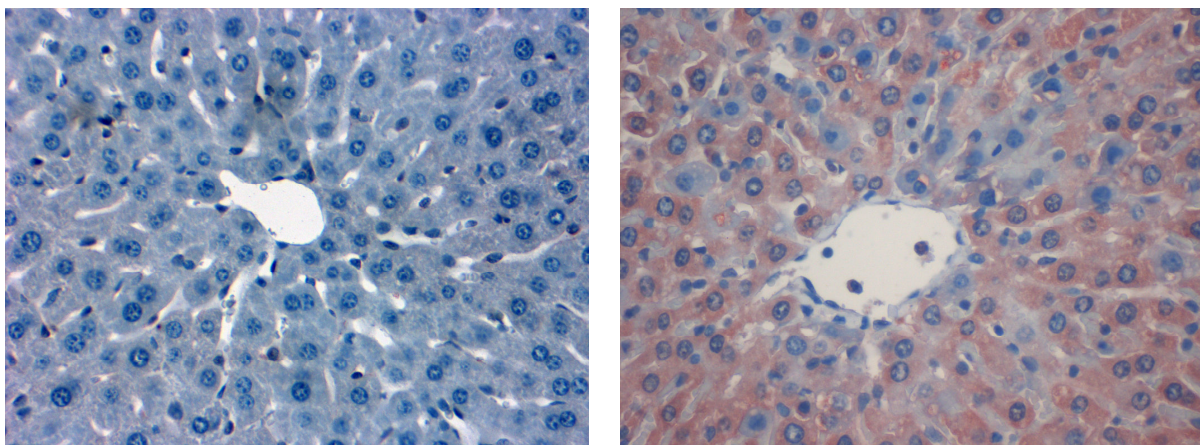


Abb. 15: Quantitative Analyse der Erythrozyten- (A), Leukozyten- (B) und Thrombozytenzahlen (C) im Vollblut der Versuchstiere in der Sham-Gruppe ohne Ischämie, nach 30-minütiger Ischämie und Applikation der Kontrolllösung (KON 30/60) oder von Thrombopoetin (TPO 30/60), sowie nach 60-minütiger Ischämie und Applikation von Kontrolllösung (KON 60/60) oder Thrombopoetin (TPO 60/60). Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

6.3 Expression des Thrombopoetinrezeptors

Die Expression des TPO-Rezeptors wurde anhand der Paraffinschnitte der Lebern nach 60-minütiger Ischämie (KON 60/60) sowie von Lebern ohne Ischämie mikroskopisch untersucht. Die immunhistochemische Darstellung und Visualisierung des TPO-Rezeptors zeigte eine Expression nach 60-minütiger Ischämie sowohl auf Hepatozyten als auch auf nicht-parenchymatösen Zellen (Abb. 16 B). In den Paraffinschnitten der Lebern ohne Ischämie konnte die Expression des TPO-Rezeptors nicht nachgewiesen werden (Abb. 16 A).



A

B

Abb. 16: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Darstellung des Thrombopoetinrezeptors (rot) in nicht-ischämischen Lebern (A) und in Lebern nach 60-minütiger Ischämie und anschließender 60-minütiger Reperfusion (B). Während in den nicht-ischämischen Lebern keine TPO-Rezeptor-Expression zu sehen war (A), war in den postischämischen Lebern der TPO-Rezeptor sowohl auf Hepatozyten als auch auf nicht-parenchymatösen Zellen hoch exprimiert (B). Vergrößerung 400-fach.

6.4 Thrombozytenaktivierung und Durchflusszytometrie

Gp IIb/IIIa, CD 107a und P-Selektin sind Oberflächenrezeptoren, welche bei einer Aktivierung von Thrombozyten exprimiert werden und durchflusszytometrisch auf vorher isolierten Thrombozyten bestimmt werden können. Um eine direkte Aktivierung von Thrombozyten durch Thrombopoetin auszuschließen, wurden Vollblutproben aus Versuchstieren, welche mit Kontrollösung oder Thrombopoetin vorbehandelt wurden, diesem Verfahren unterzogen. Es zeigte sich, dass die Rezeptorexpression von Gp IIb/IIIa entsprechend seiner konstitutiven Expression schon vor der Aktivie-

zung der Plättchen mittels Thrombin hoch war. Nach Applikation von Thrombin war die Gp IIb/IIIa-Expression sowohl in der KON- als auch in der TPO-Gruppe tendenziell geringer. Ein Unterschied zwischen der Gp IIb/IIIa-Expression der Kontroll- und der TPO-Gruppe war nicht messbar (Abb. 17 A).

Nach Thrombozytenaktivierung mit Thrombin war ein signifikanter Anstieg der CD 107a-positiven und der P-Selektin-positiven Thrombozyten zu verzeichnen. In der mit TPO prämedizierten Gruppe zeigten sich analoge Werte ohne signifikante Unterschiede zur NaCl-prämedizierten Gruppe (Abb. 17 B und C).

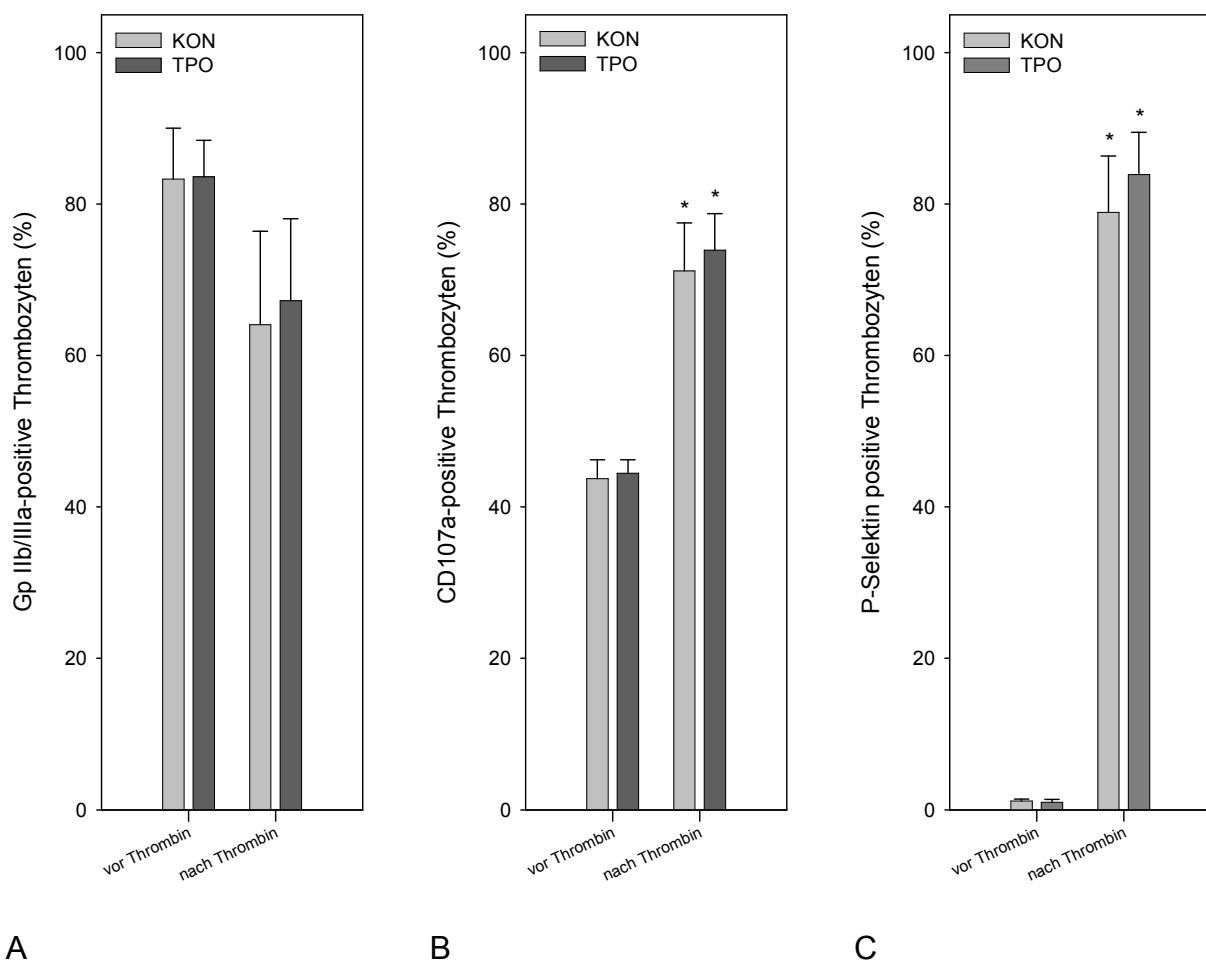


Abb. 17: Durchflusszytometrisch erhobene Daten zur Expression der Oberflächenmoleküle Gp IIb/IIIa (A), CD107a (B) und P-Selektin (C) auf isolierten Thrombozyten vor und nach Aktivierung mittels Thrombin aus Tieren nach intraperitonealer Injektion von 0,9 % NaCl-Lösung (KON) oder Thrombopoetin (TPO 12,5 µg/kg Körpergewicht). Angegeben sind die für den jeweiligen Oberflächenrezeptor positiven Thrombozyten relativ zu allen Thrombozyten in %. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. * p<0,05 vs. KON

7 Diskussion

7.1 Diskussion des Modells und des chirurgischen Vorgehens

Von James Hogart Pringle 1908 erstmals beschrieben, findet das nach ihm benannte Manöver des transienten Verschlusses des Gefäß-Nervenbündels inklusive des Gallengangs in ursprünglicher und vor allem in modifizierter Weise breite Anwendung in der Leberchirurgie (Lau et al. 2010). Es ist das am häufigsten eingesetzte Mittel zur Kontrolle von Blutungen während Leberteilresektionen (Man et al. 1997). Die vorübergehende Unterbindung der Blutzirkulation vermindert den intraoperativen Blutverlust und damit den Bedarf an Transfusionen von Blutprodukten. Ein hoher Bedarf an Transfusionen ist ein negativer Prädiktor für die postoperative Mortalität (Kooby et al. 2003; Makuuchi et al. 1989). Bei Patienten, welche keine intra- und postoperativen Bluttransfusionen benötigen, ist auch die Rate an Infektionen geringer und das tumorfreie Überleben länger (Matsumata et al. 1993). Nicht zuletzt wird die Übersicht im Operationsgebiet durch das Pringle-Manöver verbessert (Pringle 1908).

Die Nebenwirkungen dieser Methode können jedoch schwerwiegend sein. Die als Ischämie-/Reperfusionsschaden zusammengefassten Pathomechanismen sind komplex, beginnend mit einem Perfusionsversagen aufgrund einer Parenchymschädigung (no-reflow) bis zur Reperusions-assoziierten inflammatorischen Reaktion (reflow paradox) (Menger et al. 1999). Für die Analyse von Pathomechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens und entsprechenden therapeutischen Ansätzen ist es notwendig, Tiermodelle zu entwickeln, welche in der Lage sind, diese komplexen Pathomechanismen abzubilden. Ein etabliertes und häufig beschriebenes Modell ist die transiente Okklusion des Gefäß-Nervenbündels inklusive des Gallengangs des linken Leberlappens der Maus (Biberthaler et al. 2001; Bilzer und Gerbes 2000; Horie et al. 1997; Khandoga et al. 2003). Der linke Leberlappen der Maus ist gut zugänglich und mobilisierbar und damit für intravitale Untersuchungen verwendbar. Die für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wichtigen anatomischen Strukturen (präsinusoidale Arteriolen, Sinusoide und postsinusoidale Venolen) treten bis an die Oberfläche und sind so der Epi-Illumination zugänglich. Die Leberkapsel ist nur sehr dünn und beeinträchtigt somit nicht die Qualität der intravitalen Aufnahmen. Für die vorlie-

gende Studie wurden weibliche C57BL/6J-Mäuse verwendet, für die bei weitgehender immunologischer Charakterisierung eine Vielzahl von Antikörpern kommerziell erhältlich und zahlreiche Untersuchungsmethoden etabliert sind. Dies ermöglicht die detaillierte Aufarbeitung der gewonnenen Proben, sowohl histologisch als auch durchflusszytometrisch.

Das gewählte Modell sowie der C57BL/6J-Stamm erfüllen also die Ansprüche, die sich aus der Fragestellung dieser Studie, deren Schwerpunkt auf der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie liegt, ergeben.

Die Auslösung der Ischämie des linken Leberlappens erfolgte durch das Setzen eines Clips über das Gefäß-Nervenbündel des linken Leberlappens, was eine komplette Unterbrechung der arteriellen und portalvenösen Versorgung sowie eine Cholestase zur Folge hat. Der Clip ist atraumatisch zu setzen und ebenso zu entfernen. Diese Methode ist sowohl am Mausmodell (Rudiger et al. 2002) als auch an Ratten vielfach etabliert (Vollmar et al. 1996).

7.2 Diskussion der Untersuchungsmethoden

Die vorliegende Studie stützt sich wesentlich auf die Intravitalmikroskopie. Mit diesem Verfahren lassen sich mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (patho)physiologische Interaktionen auf mikroskopischer Ebene in vivo visualisieren. Dazu wird die Auflichtmethode (Epi-Illumination) angewandt, bei der das Licht auf die zu untersuchende Oberfläche trifft, reflektiert und registriert wird. Im Gegensatz zur Durchlichtmethode (Trans-Illumination) ist sie unabhängig von der Schichtdicke des Präparates, da die Lichtwellen dieses nicht durchdringen müssen. Mittels Trans-Illumination lassen sich selbst bei Kleintierlebern mit ihren dünnen Kapseln nur die Randbezirke darstellen und beurteilen. Dadurch ist nur die Untersuchung weniger Azini möglich. Zudem ist die Perfusion im Randbereich schon unter Normalbedingungen eingeschränkt (Eguchi et al. 1991). Außerdem ist die benötigte Lichtmenge zur Durchleuchtung höher, was in Kombination mit der Präparation zu einer beschleunigten Austrocknung und zu Artefakten bei der Beurteilung der pathophysiologischen Vorgänge führt. Damit ist die Aussagekraft der Transilluminations-Methode in vivo stark eingeschränkt.

Die Epi-Illumination ermöglicht hingegen die Darstellung und Auswertung verschiedener Parameter der Mikrozirkulation und der zellulären Interaktionen im Bereich der

gesamten Leberoberfläche (Menger et al. 1991). Sie kann weiterhin Informationen über die sinusoidale und venuläre Leukozytenaktivität und Leukozyten-Endothelzellinteraktionen liefern. Des Weiteren lassen sich Sinusoidweite und phagozytäre Aktivität der Kupffer-Zellen bestimmen (Menger et al. 1991; Vollmar et al. 1996). Das volle Spektrum dieser Untersuchungsmethode wird erst durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. Zur Visualisierung der Perfusion wird Natriumfluoreszein genutzt, welches auf Grund seiner geringen Molekülgröße zügig durch das fenestrierte Gefäßendothel penetriert und in die Hepatozyten diffundiert. Konsekutiv kommt es zur Negativkontrastierung der Sinusoide gegenüber dem nun heller erscheinenden Parenchym (Vollmar et al. 1994). Die Auswertung der auf Videoband aufgezeichneten Bilder erfolgt off-line mit Hilfe des Software-Programms „CapImage“ anhand des oben beschriebenen etablierten Verfahrens (Clemens et al. 1985). Die Zahl der perfundierten Sinusoide als objektivierbares Maß für die Mikrozirkulation lässt im Ergebnis Rückschlüsse auf die Ausprägung des Ischämie-/Reperfusionsschadens zu.

Die sinusoidale Leukozytenstase sowie die venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion werden nach Anfärbung der Leukozyten mit Rhodamin 6G ermittelt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff markiert Thrombozyten und Leukozyten durch Anreicherung in deren Mitochondrien (Baatz et al. 1995). Dadurch kann sowohl die Zahl der in den Sinusoiden stagnierenden als auch der in den Venolen frei fließenden und rollenden Leukozyten bestimmt werden. Die Zahl der rollenden und haftenden Leukozyten korreliert mit dem Grad der Aktivierung dieser Zellen, welche wiederum ein Maß für die inflammatorische Reaktion im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens ist. Bei starker Inflammation werden mehr Leukozyten aktiviert und penetrieren in das Gewebe. Dies spiegelt sich intravitalmikroskopisch in einer steigenden Zahl stagnierender und adhärerender Leukozyten in den Sinusoiden sowie in den Venolen wider.

Zur Darstellung von apoptotischen Hepatozyten erfolgte die Injektion von Bisbenzimid. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet intranukleär an A-T-reiche Areale der DNS und kontrastiert diese unter UV-Licht gegen die übrigen Zellbestandteile. Durch die Anfärbung lassen sich Veränderungen visualisieren, wie sie für die Apoptose typisch sind, z. B. Kondensation, abnormale DNS-Konfiguration und Fragmentation des

Chromatins. Nekrotische Zelluntergänge lassen sich auf Grund der fehlenden Verdichtung des Chromatins mit dieser Methode nicht darstellen.

Während der Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie wurden die relevanten Areale jeweils zügig aufgesucht, Videosequenzen auf einem Videoband gespeichert und der späteren Off-Line-Auswertung zugeführt. Außerdem wurden die Farbstoffe kombiniert appliziert, so dass nach schnellem Wechsel der Anregungswellenlänge durch Verschieben des Filterblocks die genannten Parameter direkt nacheinander betrachtet werden konnten. Durch diese Maßnahmen ließ sich die applizierte Lichtenergie und damit der mögliche phototoxische Schaden minimieren (Saetzler et al. 1997; Steinbauer et al. 2000). Weiterhin wurden durch eine möglichst kurze Untersuchungsdauer Artefakte durch Austrocknung und eine getriggerte Inflammationsreaktion vermieden.

Die Auswertung der intravitalmikroskopischen Daten erfolgte zeitversetzt und unabhängig vom Versuchsablauf nach dem oben genannten Vorgehen. Dabei waren die gesammelten Daten ausschließlich durch die Kennnummer der Versuchslösung charakterisiert, wodurch weiterhin eine Verblindung gewährleistet war. Die Verblindung erfolgte durch eine nicht am Experiment beteiligte Person, welche die TPO-haltigen Versuchslösungen mit der gleichen Zahl an Kontroll-Lösungen, welche zur Prämedikation nach oben genanntem Schema appliziert wurden, zufällig sortierte und dann durchnummerierte. Erst nach Abschluss der Auswertung der intravitalmikroskopisch gesammelten Daten dieser Versuchsreihe wurde die Zuordnung der Kontroll- und der TPO-Lösungen zu den Versuchstieren bekannt gegeben. Dieses Vorgehen ermöglicht eine objektive „bias“-freie Datenerhebung.

Die nach Abschluss der intravitalen Mikroskopie entnommenen Blutproben dienten der Erstellung von Blutbildern und der Bestimmung der Aktivitäten von GLDH, ALT, AST und IL-6. Mit den üblichen, auch in der Humanmedizin angewandten Methoden wurden die Aktivitäten der genannten Enzyme gemessen. Die AST kommt sowohl in den Mitochondrien als auch im Zytosol, die ALT ausschließlich im Zytoplasma vor. Eine Erhöhung der Enzymaktivität im Plasma lässt nicht zwingend auf einen Zelltod schließen, sondern kann schon bei einer anoxischen Störung der Zellintegrität, die prinzipiell reversibel ist, auftreten. Es ist also möglich, prämortale Zellschäden zu de-

tektieren. Die Konzentration der AST im Blut steigt mit dem vermehrten Zelltod weiter an, da sie bei voranschreitender Desintegration zusätzlich aus den Mitochondrien freigesetzt wird.

Die Glutamat-Dehydrogenase ist ein ausschließlich mitochondrial vorkommendes Enzym, welches die Reaktion von Glutamat, Wasser und NAD(P)^+ zu Ammonium, α -Ketoglutarat und NAD(P)H katalysiert. Es ist für die Fixierung und Freisetzung von Ammonium von zentraler Bedeutung und somit Teil des Stickstoffmetabolismus. Eine Erhöhung der GLDH zeigt auf Grund der mitochondrialen Lokalisation eine massive Zerstörung von Hepatozyten an.

IL-6 wird neben $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 von aktivierten Kupffer-Zellen während der hepatischen Ischämie und Reperfusion freigesetzt (Busam et al. 1990; Colletti et al. 1990; Decker 1990; Jaeschke und Farhood 1991). Die Messung der IL-6-Aktivität im Plasma der Versuchstiere erfolgte zur weiteren Quantifizierung der Inflammationsreaktion nach Ischämie und Reperfusion der Leber mittels ELISA-Technik.

Die bereits genannten Untersuchungsmethoden zur Klärung der Frage, ob Thrombopoetin einen protektiven Effekt auf das Lebergewebe hat, wurden durch weitere Untersuchungen ergänzt. Das Ziel war die Untermauerung der Ergebnisse mit Nebenbefunden zu den physiologischen Grundlagen. So ist die Vermittlung der Thrombopoetin-Wirkung über den eigenen Rezeptor oder, wie einleitend erwähnt, über den Erythropoietin-Rezeptor anzunehmen. Voraussetzung ist eine Expression des Rezeptors auf den Zellen des Leberparenchyms. Die Expression des Erythropoietin-Rezeptors nach Ischämie/Reperfusion wurde bereits nachgewiesen (Hochhauser et al. 2008). Ob der Thrombopoetin-Rezeptor ebenfalls auf den Hepatozyten zu finden ist, sollte durch ein immunhistochemisches Verfahren geklärt werden. Es erfolgte zum Vergleich in den postischämischen und nicht-ischämischen Lebergewebeproben.

Thrombopoetin ist in der Lage, die Empfindlichkeit von Thrombozyten auf Aggregationsstimuli zu erhöhen (Harker et al. 1996). Es ist nicht auszuschließen, dass über diesen Mechanismus durch die Verstärkung des Perfusionsausfalls, welcher eine maßgebliche Rolle in der Pathophysiologie des Ischämie-/Reperfusionsschadens spielt, ein protektiver Effekt von Thrombopoetin auf die Hepatozyten konterkariert

wird. Daher wurde die Aktivierbarkeit der Thrombozyten 24 Stunden nach Applikation von Thrombopoetin quantifiziert. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können nach Isolierung von Thrombozyten deren Oberflächenmoleküle, welche nach Aktivierung der Thrombozyten exprimiert werden, quantitativ erfasst werden. Diese Methode bedient sich ebenfalls dem Mittel der Fluoreszenz. Die gewählten Oberflächenmoleküle werden mittels eines spezifischen Antikörpers erfasst, welcher direkt fluoresziert oder durch einen fluoreszierenden Zweitantikörper detektierbar ist. Die Fluoreszenz korreliert sowohl mit dem Anteil der aktivierten Thrombozyten an der Gesamtzahl selbiger als auch mit der Zahl der exprimierten Oberflächenmoleküle (Nickels et al. 2003). In dieser Studie wurde vor und nach Aktivierung der isolierten Thrombozyten mit Thrombin die Expression von GP IIb/IIIa, CD107a und P-Selektin als Maß für die Thrombozytenaktivität detektiert.

GP IIb/IIIa ist ein Komplex aus den Glykoproteinen IIb und IIIa, welcher kalziumabhängig gebildet wird (Calvete 1995; Shattil 1999). Nach Aktivierung der Thrombozyten findet eine Konformationsänderung statt, wodurch hochaffine Bindungsstellen für Fibrinogen freigelegt werden (Shattil et al. 1985). GP IIb/IIIa wird der Familie der Integrine zugeordnet. 70 % des Glykoproteins werden permanent an der Thrombozytenoberfläche präsentiert, die übrigen 30 % werden erst nach Aktivierung aus intrazellulären Speichern exprimiert (Wagner et al. 1996).

CD107a oder auch lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) ist ein auf der Oberfläche von Lysosomen vorkommendes Molekül, welches nach Aktivierung von Thrombozyten, bedingt durch die Degranulation von Lysosomen, auf der Oberfläche präsentiert wird (Febbraio und Silverstein 1990).

P-Selektin oder auch CD 62 p ist in ruhenden Thrombozyten in den α -Granula gespeichert und wird innerhalb weniger Sekunden nach Aktivierung exprimiert. Es vermittelt die Bindung an Leukozyten. Die Messung der P-Selektin-Expression galt lange Zeit als Goldstandard zur Bestimmung der Thrombozytenaktivität (Michelson 1996). Die Degranulation verläuft jedoch rasch und die Thrombozyten verlieren das P-Selektin schnell von ihrer Oberfläche (Berger et al. 1998; Michelson et al. 1996). Daher hat die Methode an Bedeutung verloren. Für die Messung im Rahmen der vorliegenden Studie ist dieser Aspekt jedoch zu vernachlässigen, da die durchflusszytometrischen Messungen unmittelbar nach Aktivierung der Thrombozyten durchgeführt wurden.

Eine relevante Steigerung der Thrombozytenaktivität hätte im Zusammenhang mit dem Ischämie-/Reperfusionsschaden eine weitere Verminderung der sinusoidalen Perfusion zur Folge. Dadurch könnte ein möglicher protektiver Effekt von TPO direkt konterkariert werden. Daher wurde in der vorliegenden Studie das aktivierende Potential von TPO auf die Thrombozyten mittels des durchflusszytometrischen Messverfahrens evaluiert.

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass insbesondere Parameter untersucht und evaluiert wurden, welche eine Vergleichbarkeit mit bestehenden Studien ermöglichen. Einen Anspruch auf Vollständigkeit kann diese Studie nicht erheben, so wurde z. B. auf Langzeituntersuchungen verzichtet. Aussagen über mittel- bis langfristige Effekte lassen sich daher nicht treffen. Ebenso wurde auf Grund des aufwändigen tierexperimentellen Protokolls keine Dosisfindungskurve erstellt und in Zusammenarbeit mit ethischen und tierschutzrechtlichen Faktoren die Fallzahl je Gruppe begrenzt, um gerade statistische Aussagen treffen zu können. Dadurch kam es jedoch zu relativ hohen Standardabweichungen, welche das Erreichen von signifikanten Unterschieden erschwerten.

7.3 Diskussion der Ergebnisse

7.3.1 Der Ischämie-/Reperfusionsschaden

Die Ursachen für den Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber sind überwiegend chirurgisch. Die chirurgische Intervention nach Leberverletzungen kann eine Unterbrechung der Perfusion erfordern, um Blutverluste zu vermindern und die Übersicht des Operationsgebietes zu verbessern. Auch ein Trauma ohne direkte Leberbeteiligung kann durch einen hämorrhagischen Schock zur Zentralisation des Blutkreislaufes und damit zur Minderperfusion der Leber führen. Die Teilresektion im Rahmen der Tumorchirurgie ist einer der häufigsten Eingriffe an der Leber, in dessen Rahmen das Pringle-Manöver zur Blutungskontrolle Anwendung findet (Serracino-Inglott et al. 2001). Die dadurch induzierte Ischämie mit der konsekutiven Reperfusion hat einen gravierenden Einfluss auf die postoperative Morbidität und Mortalität (Rudiger et al. 2003).

Die Methode der intraoperativen Ischämie des Leberparenchyms ermöglicht ein blutungsarmes Vorgehen, induziert jedoch eine Ischämie der Zellen, welche über verschiedene Pathomechanismen zu einer Einengung der Sinusoide führt. Dadurch ist die Perfusion auch nach der Beendigung des Pringle-Manövers vermindert. Vollmar et al. zeigten (1994) eine direkte Korrelation zwischen der Ischämiedauer und dem Ausmaß des Perfusionsausfalls. Dieser Studie entsprechen die Ergebnisse des Perfusionsausfalls in der vorliegenden Studie. Während nach 30-minütiger Ischämie nur eine minimale Reduktion der sinusoidalen Perfusion zu erfassen war, kam es nach 60-minütiger Ischämie zu einer signifikanten Reduktion.

Pathomechanistisch kommt es während der Ischämiephase durch die Hypoxie zu einer Alteration der Homöostase von Wasserstoff-, Natrium-, Kalium- und Chloridionen. Die in der Folge geschädigten Endothel- und Kupffer-Zellen schwellen an und engen die Sinusoide ein (Bronk und Gores 1991; Carini et al. 1999). Das zusätzlich entstehende Missverhältnis zwischen Stickstoffmonoxid- und Endothelinproduktion zieht eine Vasokonstriktion nach sich. Weiterhin werden während der Ischämie Kupffer-Zellen aktiviert. Sie setzen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), TNF- α und IL-1 und -6 frei (Bilzer und Gerbes 2000; Busam et al. 1990; Lentsch et al. 2000). Die ROS schädigen Membranen, insbesondere der Mitochondrien und inaktivieren Antiproteasen. Nun können Proteasen - speziell in der Umgebung gewebeinfiltrierender Leukozyten - ungehindert das Gewebe zerstören (Jaeschke 1998; Jaeschke 2000;

Kroemer et al. 2007; Lentsch et al. 2000). In der vorliegenden Studie war abhängig von der Dauer der Ischämie ein Anstieg der Leukozytenaktivität erfassbar. Sowohl die Zahl der stagnierenden Leukozyten in den Sinusoiden als auch die der adhären-ten Leukozyten in den Venolen zeigte nach 30-minütiger Ischämie einen tendenziellen und nach 60-minütiger Ischämie einen signifikanten Anstieg. Die Zahl der rollen- den Leukozyten war hingegen nach kürzerer Ischämie höher als nach längerer, je- doch in beiden Fällen nicht signifikant erhöht. Intravitalmikroskopische Untersuchun- gen der Leukozytenaktivität an Ratten zeigten bereits nach 20-minütiger Ischämie einen signifikanten Anstieg der Anzahl sinusoidal stagnierender Leukozyten. Ver- gleichbar zur vorliegenden Studie stand die Zahl der aktivierten Leukozyten zu dem Transaminasenanstieg und der Ischämiedauer in Korrelation (Vollmar et al. 1994). Die Ergebnisse aus Untersuchungen an Ratten können demnach qualitativ, jedoch nicht quantitativ auf Mausmodelle übertragen werden.

IL-1 und -6 wirken als Chemotaxine und aktivieren weitere Leukozyten. TNF- α ist insbesondere für die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen verantwortlich (Mackay et al. 1993). Sie ermöglichen erst die Adhäsion von Leukozy- ten und sind Bedingung für die Transmigration der Leukozyten in das Gewebe. Die IL-6-Aktivität wurde in der vorliegenden Studie exemplarisch für die inflammatori- schen Zytokine gemessen. Analog zu den Transaminasen kam es zu mehr als einer Verdopplung nach 30-minütiger Ischämie, jedoch erst nach 60-minütiger Ischämie zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration.

Diese oben aufgeführten multiplen Mechanismen verursachen eine Schädigung der Hepatozyten und der Endothelzellen, welche in der Folge anschwellen. Dadurch füh- ren sie in der Reperfusionphase zur prolongierten Minderperfusion (Menger et al. 1999).

Weiterhin verursachen sie insbesondere in der Reperfusionphase eine Emigration weiterer Leukozyten in das Parenchym. Diese setzen wiederum ROS, Proteasen so- wie weitere Chemotaxine frei. Dadurch wird die Inflammation aufrechterhalten und die Zellschädigung aggraviert (Bilzer und Gerbes 2000; Busam et al. 1990; Lentsch et al. 2000). Letztere wurde in der vorliegenden Studie unter anderem durch die Frei- setzung intrazellulärer Enzyme erfasst. Auch hier zeigte sich ein wesentlicher, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Plasmaaktivität von GLDH, AST und ALT nach 30- minütiger Ischämie. Erst nach 60-minütiger Ischämie war ein signifikanter Anstieg von AST und ALT messbar. Die GLDH-Aktivität war auch nach längerer Ischämie nur

leicht erhöht. Laborchemisch ergibt sich somit das Bild einer von der Ischämiedauer abhängigen zunehmenden hepatozellulären Zellschädigung. Diese bleiben jedoch auch nach 60-minütiger Ischämie subletal. Die GLDH ist ein ubiquitär vorkommendes intramitochondriales Enzym. Somit ist davon auszugehen, dass andere Zellpopulationen, insbesondere die Endothelzellen, nur in geringem Umfang massive Zellschäden erlitten. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass das Maximum der Plasmaaktivität auf Grund der kurzen Zeit von 60 min zwischen Ischämie und Blutentnahme noch nicht erreicht war.

7.3.2 Die Beeinflussung des Ischämie-/Reperfusionsschadens der Leber durch Thrombopoetin

Die therapeutischen Möglichkeiten zur Minderung der Folgen des Ischämie-/Reperfusionsschadens sind begrenzt, obwohl dieses Thema Gegenstand langjähriger und intensiver Forschung ist. Große Bedeutung wird der Modifikation des chirurgischen Vorgehens, insbesondere im Rahmen von Leberteilresektionen (z. B. in der Tumorchirurgie) zugeschrieben. Ist trotz präventiver chirurgischer Maßnahmen eine längere Unterbrechung der Perfusion intraoperativ notwendig gewesen, bedarf es postoperativer Strategien zur Stabilisierung der Leberfunktion. Daher erfolgt eine intensive Forschung an potentiell hepatoprotektiven Substanzen. In der klinischen Anwendung bzw. Erprobung sind bisher z. B. die Steroide und das Erythropoietin zu finden. Steroide werden schon lange perioperativ eingesetzt (Pachter und Spencer 1979; Santiago Delpin et al. 1975). Kato et al. (2010) führten eine der ersten klinischen Studien zum therapeutischen Potential von Erythropoietin im Zusammenhang mit dem Ischämie-/Reperfusionsschaden durch. Im Ergebnis zeigte sich, verglichen zu den Steroiden, eine größere hepatoprotektive Potenz. Die genauen Mechanismen, welche diese Protektion bedingen, sind bislang jedoch nicht bekannt. Weitere insbesondere pleiotrope Substanzen sowie Substanzgemische mit antiapoptotischer Wirkung wurden auf ihr therapeutisches Potential untersucht. Die vorliegende Studie konzentrierte sich auf das dem Erythropoietin sehr ähnliche Thrombopoetin.

Der TPO-Rezeptor (cMPL) befindet sich physiologisch auf Megakaryozyten und weiteren hämatopoetischen Stammzellen. Dort ist auch die Hauptfunktion des TPO, die Regulierung der Thrombozytopoese, angesiedelt (Alexander et al. 1996). Auch auf reifen Thrombozyten wurde der TPO-Rezeptor gefunden. Hier wird Thrombopoetin gebunden und aus dem Kreislauf eliminiert (Fielder et al. 1996). Zudem wurde der

TPO-Rezeptor auf Myokardzellen (Baker et al. 2008) und im Hirn (Ehrenreich et al. 2005) nachgewiesen. In der vorliegenden Studie und in einer parallelen Untersuchung zur Wirkung von TPO auf das akute Leberversagen konnten wir erstmals eine Rezeptorexpression in der postischämischen Leber nachweisen (Eipel et al. 2009). Diese Tatsache impliziert die Möglichkeit der Beeinflussbarkeit des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch Thrombopoetin.

Nach Induktion eines ischämischen Ereignisses auf das Leberparenchym dominieren direkte Zellschäden durch das Fehlen von Sauerstoff und den konsekutiven Energiemangel. Die dadurch in Gang gesetzte pathophysiologische Kaskade verursacht über die bereits erwähnten Mechanismen den (partiellen) Ausfall der sinusoidalen Perfusion in der Reperusionsphase. Der Schädigungsmechanismus wird prolongiert und der entstehende Schaden an den Hepatozyten aggraviert (Vollmar et al. 1994). Damit ist der Perfusionsausfall ein entscheidender Faktor, welcher in der vorliegenden Studie intravitalmikroskopisch als Parameter für die Ausprägung des Ischämie-/Reperfusionsschaden erfasst wurde. Durch die Vorbehandlung mit TPO konnte keine Zunahme der Zahl perfundierter Sinusoide erreicht werden.

Schon während der Ischämiephase wird durch die Aktivierung von ortsständigen Kupffer-Zellen eine Inflammationsreaktion in Gang gesetzt. Diese wird in der Reperusionsphase durch die Emigration weiterer Leukozyten aufrechterhalten und verstärkt. Durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Proteasen tragen die Leukozyten wesentlich zur weiteren Schädigung des Leberparenchyms bei (Lentsch et al. 2000). Ein Ziel von therapeutischen Strategien zur Verbesserung des „Outcome“ nach Ischämie-/Reperfusionsschäden der Leber sollte daher die Verminderung der Zahl aktivierter Leukozyten sein. Der therapeutische Effekt einer Substanz oder eines Substanzgemisches im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens wird entsprechend in der Literatur unter anderem an der Eigenschaft gemessen, die Leukozytenemigration in das Gewebe zu senken. Mittels TPO, welches 24 Stunden vor Auslösung der Ischämie appliziert wurde, konnte dieses Ziel in der vorliegenden Studie nicht erreicht werden. Intravitalmikroskopisch zeigte sich kein signifikanter Einfluss von TPO auf die Leukozytenstase in den Sinusoiden. Damit ließ sich auch auf den zweiten pathophysiologisch relevanten Faktor, welcher auf eine protektive Potenz hinweist, kein Effekt durch TPO erzielen.

Ein weiterer Marker der Immunreaktion ist das IL-6. Es ist ein Akute-Phase-Protein und reguliert die Leukozytenaktivierung, -migration und -apoptose (Hurst et al. 2001;

McLoughlin et al. 2004; Modur et al. 1997; Romano et al. 1997). Es ist ein wichtiges Bindeglied in der Interaktion des unspezifischen und spezifischen Immunsystems (Hurst et al. 2001; Jones 2005; Kishimoto 2005).

1993 zeigte sich am Modell des akuten septischen Leberversagens eine protektive Wirkung von IL-6. Zusammen mit anti-TNF-Antikörpern in niedriger Dosierung konnte die Mortalität signifikant reduziert werden (Barton und Jackson 1993). Dieses Ergebnis konnte auf den warmen Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber übertragen werden. Camargo et al. erfassten nach Ischämie/Reperfusion die Transaminasen-Aktivität sowie einen Nekrose-Score an IL-6-defizienten- und Wildtypmäusen. IL-6-defiziente Mäuse wiesen eine deutlich erhöhte Transaminasen-Aktivität auf. Zudem zeigten sie einen höheren Nekrose-Score. Dieser Effekt konnte durch die Substitution von rekombinantem IL-6 aufgehoben werden. Weitere Untersuchungen zeigten bei Analyse identischer Parameter bei Wildtypmännchen, welche mit rekombinantem IL-6 vorbehandelt wurden, einen Vorteil gegenüber unbehandelten Ratten (Camargo et al. 1997). Weiterhin nimmt IL-6 im Rahmen der Leberregeneration eine Schlüsselrolle ein. Die Vermehrung von Hepatozyten in Zellkultur konnte sowohl mit als auch ohne Epidermal Growth Factor durch IL-6 signifikant gesteigert werden (Kuma et al. 1990). Cressman et al. konnten (1996) eine eingeschränkte Leberregeneration nach partieller Hepatektomie bei IL-6-defizienten Mäusen zeigen. Dieser Unterschied zu Wildtypmäusen konnte ebenfalls durch Substitution von rekombinantem IL-6 ausgeglichen werden.

In der vorliegenden Studie zeigte sich ein moderater, nicht signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentration nach 30-minütiger Ischämie. Eine massive Zunahme der Aktivität wurde nach 60-minütiger Ischämie beobachtet. In den mit TPO vorbehandelten Gruppen war eine zur jeweiligen Kontrollgruppe tendenziell geringere IL-6-Aktivität zu verzeichnen. Dies kann für eine geringere inflammatorische Aktivität im Vergleich zu den Kontrollgruppen sprechen, was die These einer Hepatoprotektion durch TPO nach Ischämie-/Reperfusion der Leber stützen würde. Diese Möglichkeit ist jedoch anhand der weiteren Ergebnisse im Rahmen der vorliegenden Studie nicht konsistent zu belegen.

Eine gegensätzliche Möglichkeit der Interpretation ist die tendenziell verminderte Freisetzung von IL-6 durch direkte Suppression durch TPO. Im Hinblick auf die oben erwähnte Studie von Camargo et al. wäre eine Steigerung der IL-6-Aktivität im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens jedoch durchaus günstig. Inwieweit positi-

ve Effekte durch die Senkung der IL-6-Aktivität konterkariert werden, lässt sich anhand der vorliegenden Studie nicht ermitteln. Jedoch wird die IL-6-Aktivität nicht unter physiologische Werte supprimiert. Es ist also davon auszugehen, dass die regenerativen und proliferativen Langzeiteffekte von IL-6 erhalten bleiben. Letztendlich beweisen ließe sich diese These jedoch nur durch Langzeituntersuchungen, welche im Rahmen der vorliegenden Studie nicht durchgeführt wurden.

Die Perfusion und die Inflammation haben pathophysiologisch großen Einfluss auf das „Outcome“ nach Ischämie-/Reperfusion der Leber. Sie sind jedoch nur Teilaspekte im komplexen Zusammenspiel vieler Faktoren. Um dieser Komplexität im Rahmen der vorliegenden Studie gerecht zu werden, wurden auch Parameter der Parenchymschädigung erfasst. Die Hepatozyten reagieren auf eine Störung ihrer Integrität unter anderem mit einer Freisetzung von intrazellulären Enzymen, welche im Blutplasma gemessen werden können. Die klinisch relevantesten Enzyme sind die ALT, AST und GLDH. Die ALT und AST werden bereits bei subletalen Zellschäden aus dem Zytosol nach extrazellulär freigesetzt. Ein weiterer Anstieg der AST erfolgt bei massiver Desintegration von Hepatozyten durch Freisetzung aus den Mitochondrien. Die GLDH befindet sich ausschließlich intramitochondrial. Eine Steigerung der Plasmaaktivität zeigt eine massive Zerstörung von Zellen an. Auf Grund dieser Eigenschaften werden diese Enzyme im klinischen Alltag zur Quantifizierung von Leberparenchymschäden herangezogen und finden in experimentellen Studien analog Verwendung. In der vorliegenden Studie konnte sowohl nach 30- als auch nach 60-minütiger Ischämie nur ein tendenzieller Anstieg der GLDH-Aktivität nach Ischämie/Reperfusion erfasst werden.

Die Aktivitäten der ALT und AST hingegen waren nach 60-minütiger Ischämie signifikant erhöht. In den entsprechenden TPO-Gruppen war die Aktivität der im Zytosol lokalisierten ALT sogar tendenziell höher, was eher für eine Zunahme der Zellschädigung sprechen würde. Die Aktivität der im Zytosol sowie intramitochondrial vorkommenden AST war in der TPO-Gruppe jedoch tendenziell geringer als in der Kontroll-Gruppe. Diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Befunde können insgesamt aber als leichte Verringerung des Schadens durch TPO zu Gunsten einer non-letalen Schädigung der Hepatozyten interpretiert werden. Die Ergebnisse entsprechen im Ausmaß nicht denen anderer Studien, in welchen die Transaminasen durch z. B. EPO (Yilmaz et al. 2004) oder einen Cocktail aus Glukokortikoiden, Glycin, Tau-

rin, Alanin und Arginin (Schindler et al. 2009) um bis zu 80 % gesenkt werden konnten.

Eine Studie zu den Auswirkungen von TPO am Modell des akuten septischen Leberversagens bestätigte die negativen Ergebnisse der vorliegenden Studie. TPO führte auch hier weder zu einer signifikanten Verbesserung der sinusoidalen Perfusion noch zu einer Reduktion der Leukozytenaktivität. Auch die Transaminasen-Aktivität im Plasma konnte nach Sepsisinduktion durch TPO nicht signifikant gesenkt werden (Eipel et al. 2009). Erreicht wurden diese Ziele jedoch durch ein Substanzgemisch aus Prednisolon, Glycin, Taurin und Arginin. Schindler et. al führten 2009 an Sprague-Dawley-Ratten Versuche im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch. Sie applizierten den Tieren vor Induktion der 90-minütigen hepatischen Ischämie dieses Substanzgemisch. Anschließend erfassten sie unter anderem intravital die sinusoidale Perfusion und die Leukozytenaktivität. Nach der 90-minütigen Ischämie zeigten sich eine signifikante Reduktion der Leukozytenadhärenz sowie eine Verbesserung der sinusoidalen Perfusion. Weiterhin konnten die Transaminasen signifikant gesenkt werden. Ähnlich positive Effekte wurden durch EPO erreicht. So zeigten Yilmaz et. al (2004), dass EPO die postischämische Transaminasenfreesetzung in Sprague-Dawley-Ratten um bis zu 80 % reduzieren kann. Schmeding et al. untersuchten ebenfalls die Wirkung von EPO auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber der Ratte (2007). Sie wiesen eine signifikante Reduktion der Transaminasen-Aktivität sowie der hepatozellulären Apoptoserate nach. 2009 folgte eine Studie zur Evaluation der hepatoprotektiven Wirkung nach kalter Ischämie. Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Aktivitäten von ALT und LDH sowie des apoptotischen und nekrotischen Zelluntergangs (Schmeding et al. 2009). Kato et al. führten (2010) die erste klinische Studie an Patienten zur Evaluation der therapeutischen Effekte von EPO nach erfolgtem Pringle-Manöver durch. Sie verglichen die Aktivitäten von ALT, AST, LDH, IL-6 und TNF- α in drei Gruppen von Patienten. Eine Gruppe wurde mittels Hydrokortison, die beiden anderen Gruppen mittels EPO unterschiedlicher Applikation behandelt. Für die Gruppe, welche EPO vor Beginn des Pringle-Manövers und nach Abschluss der Operation erhielt, zeigten sich signifikant niedrigere Werte für ALT, AST, IL-6 und TNF- α sowie eine signifikant verkürzte Hospitalisationsdauer.

7.3.3 Die pro- und antiapoptotische Wirkung von Thrombopoetin

Ein weiterer Parameter, welcher zur Quantifizierung des Parenchymschadens herangezogen wird, ist das Ausmaß des Zelluntergangs im postischämischen Parenchym. So erfassten Yilmaz et al. einen histopathologischen Score, um die Auswirkungen von EPO auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber zu analysieren. Dieser Score zeigte eine signifikant geringere Schädigung des postischämischen Leberparenchyms nach Applikation von EPO. Eine absolute Apoptose-Rate wurde nicht angegeben. Schindler et al. beschrieben 2009 eine signifikante Senkung der Nekrose-rate im gleichen Modell durch ein Substanzgemisch aus Prednisolon und Aminosäuren.

Die multilokuläre Expression des TPO-Rezeptors impliziert einen vielfältigen Einfluss von Thrombopoetin auf den Organismus. Dieser wurde in wenigen Studien für das rekombinante TPO quantifiziert. Ehrenreich et. al untersuchten 2005 die Wirkung von TPO auf Neuronen des Hirns unter ischämischen Bedingungen. Dabei konnten sie zeigen, dass TPO in einer Dosierung von 12,5 µg/kg KG im Gegensatz zu EPO eine proapoptotische Wirkung auf undifferenzierte Neurone hat. Dies hat insbesondere Bedeutung für die postnatale Entwicklung, da es erst nach der Geburt zur Expression von TPO und seinem Rezeptor im Hirn kommt. EPO hingegen wirkt neuroprotektiv, unter anderem durch die Hemmung des proapoptotischen Potentials von TPO während ischämischer Phasen (Ehrenreich et al. 2005). Baker et. al zeigten 2008, dass TPO in der Lage ist, die Größe des Infarktgebietes nach myokardialer Ischämie zu verringern. Von den untersuchten Dosierungen (0,005, 0,05 und 0,5 µg/kg KG) zeigten sich die günstigsten Effekte für die Dosierung von TPO von 0,05 µg/kg KG. Sowohl bei Gabe 15 min vor und 15 min nach Ischämie als auch nach Beginn der Reperfusion konnten signifikante protektive Effekte durch TPO erzielt werden. Auch die Anzahl der Apoptosen nach myokardialer Schädigung durch Doxorubizin ließ sich durch TPO signifikant reduzieren (Li et al. 2006). Thrombopoetin wurde in einer Dosierung von 12,5 µg/kg KG 24 Stunden vor sowie 24 Stunden und 72 Stunden nach Doxorubizingabe intraperitoneal appliziert. Die TPO-behandelte Gruppe zeigte tendenziell eine höhere Überlebensrate bei signifikant besserer kardialer Pumpfunktion und geringeren Zellläsionen. Diese Effekte zeigen ein kardioprotektives Potential gegenüber einem proapoptotischen Effekt auf undifferenzierte Neurone. Der Nachweis

des Rezeptors für TPO in der Leber impliziert, dass auch in diesem Organ die Auswirkungen der Ischämie/Reperfusion durch TPO beeinflussbar sein könnten.

In der vorliegenden Studie konnte jedoch keine Änderung der Apoptoserate durch die Applikation von TPO erreicht werden. In diesem Zusammenhang ist allerdings zu erwähnen, dass das Ausmaß der Apoptosen sehr gering war. Eine signifikante Senkung ist daher schwierig zu erzielen. Vergleichend kann jedoch im Sinne einer Positivkontrolle die hohe Zahl von Apoptosen im Modell des akuten Leberversagens herangezogen werden. Auch hier kam es nicht zu einer Senkung der Zahl apoptotischer Zellen durch die Applikation von TPO in zwei Dosierungen 24 Stunden vor Induktion des Leberversagens (Eipel et al. 2009).

Im vorliegenden Modell des Ischämie-/Reperfusionsschadens wurde der apoptotische Zelltod intravitalmikroskopisch erfasst. Gujral et al. beschrieben (2001) in einer Studie an Ratten eine konstante Zahl von hepatozellulären und sinusoidalen Apoptosen nach 60- und 120-minütiger Ischämie der Leber. Hingegen stieg die Zahl der nekrotischen Zelluntergänge analog zur Aktivität der Transaminasen mit zunehmender Ischämiedauer. Der nekrotische Zelltod wurde in der vorliegenden Studie nicht erfasst, da insbesondere die antiapoptotische Wirkung von TPO beurteilt werden sollte. Die vorliegenden Ergebnisse belegen weder eine proapoptotische Potenz von TPO in der Leber, wie z. B. auf undifferenzierte Neurone, noch eine antiapoptotische Potenz, wie beispielsweise auf doxorubizingeschädigte Myokardzellen. Dies macht erneut deutlich, dass die Auswirkungen von TPO für jedes Organ und Schadensmodell unabhängig von der Rezeptorexpression einzeln betrachtet werden müssen.

7.3.4 Die durchflusszytometrische Bestimmung der Thrombozytenaktivität

Harker et al. und Peng et al. zeigten 1996, dass TPO die Aktivität der Thrombozyten auf Aggregationsstimuli steigern kann. Somit ist eine Aggravierung der sinusoidalen Perfusionsminderung im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch TPO denkbar. Weiterhin sind Thrombozyten am Inflammationsprozess beteiligt. Für die kalte Ischämie konnte gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten Apoptose der Endothelzellen induzieren können (Sindram et al. 2000). Darüber hinaus setzen Thrombozyten weitere proinflammatorische Mediatoren und membranschädigende ROS frei (Nakano et al. 2008). Ein möglicher protektiver Effekt durch Thrombopoetin könnte durch diese Pathomechanismen überdeckt werden. Daher wurde die Aktivier-

barkeit der Thrombozyten 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von TPO durchflusszytometrisch erfasst. Die Reaktion der Thrombozyten in der mit TPO behandelten Gruppe war identisch mit der Reaktion in der Kontrollgruppe, welche mit NaCl-Lösung vorbehandelt worden war. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Oberflächenrezeptorexpression der TPO- und der Kontroll-Gruppe gemessen werden. Eine Verschlechterung der Perfusion durch eine TPO-induzierte Verstärkung der Thrombozytenaggregation ist im vorliegenden Versuchsaufbau damit unwahrscheinlich.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu denen von Harker et. al (1996), welche eine verstärkte Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch Adenosindiphosphat und Kollagen unter supranormalen TPO-Serumspiegeln über mehrere Tage nachwiesen. Vergleichbar zu unserer Studie wurde keine direkte Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch TPO beobachtet (Harker et al. 1996). Zudem zeigte sich - wie in der vorliegenden Studie - durchflusszytometrisch keine vermehrte Expression der an der Aggregation beteiligten Rezeptoren. Auch Peng et al. (1996) untersuchten am Hundemodell den Effekt von TPO auf die Thrombozytenaktivität. Eine supranormale TPO-Konzentration ex vivo führte ebenfalls nicht zu einer vermehrten Expression von aggregationsfördernden Oberflächenmolekülen auf Thrombozyten. Auch eine verstärkte Fibrinogen-Bindung auf einen Adenosin-Reiz konnte nicht festgestellt werden (Peng et al. 1996), was den vorliegenden Ergebnissen entspricht.

7.3.5 Die Auswirkungen von Thrombopoetin und des Ischämie-/Reperfusionsschaden auf das Blutbild

Nach Abschluss der Intravitalmikroskopie wurden die Versuchstiere entblutet. Das gewonnene Blut wurde anschließend für weitere Untersuchungen asserviert. Ein Teil des Blutes wurde genutzt, um ein Blutbild anzufertigen. Die Relevanz dieser Untersuchung ergibt sich aus vorliegenden Studienergebnissen, welche eine hämatopoetische Wirkung von TPO nachwiesen. Ku et al. (1996) beschrieben eine Potenzierung der Aktivierung von ruhenden polyploiden Progenitorzellen durch TPO in Anwesenheit weiterer stimulierender Faktoren. Somit ist der stimulierende Effekt von TPO nicht ausschließlich auf Megakaryozyten beschränkt. Die potenteste Wirkung erzielt Thrombopoetin jedoch auf die Vorläuferzellen der Thrombozytopoese. Die Größe und Anzahl der Megakaryozyten wird durch TPO erhöht, was nach 5 Tagen zu einem

signifikanten Anstieg der Thrombozytenzahl führt (Kuter 2009). Eine Beschleunigung der Thrombozytenfreisetzung findet jedoch nicht statt (Choi et al. 1996; Kuter 2009). Im Rahmen des Versuchsaufbaus der vorliegenden Studie ist daher nicht mit einer Veränderung der Zellzahlen im Blutbild durch die TPO-Applikation zu rechnen. Der Zeitraum von 24 Stunden zwischen dem Applikationszeitpunkt und der Untersuchung reicht nicht aus, um eine signifikante Erhöhung der Zellzahlen zu erzielen. Die Ergebnisse der Blutbilduntersuchungen bestätigen diese These. Sowohl die Zahl der Erythrozyten als auch der Leukozyten und Thrombozyten war in allen Gruppen sowohl nach 30- als auch nach 60-minütiger Ischämie vergleichbar.

Weiterhin wurde anhand der Untersuchungen eine Verbrauchskoagulopathie ausgeschlossen. Im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens kommt es zur vermehrten Aktivierung der Thrombozyten, welche Konglomerate auch mit Leukozyten bilden und den sinusoidalen Perfusionsausfall aggravieren (Nakano et al. 2008). Eine vermehrte Aktivierung von Leukozyten und Thrombozyten im Rahmen der Ischämie/Reperfusion kann sich entsprechend als Verminderung der Zahl frei zirkulierender Zellen im Vollblut darstellen. Diese These lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse der Blutbilduntersuchungen nicht belegen. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen nach 30 und 60 Minuten andauernder Ischämie. Auch im Vergleich der TPO-Gruppen mit den jeweiligen Kontrollgruppen nach 30- und 60-minütiger Ischämie waren keine signifikanten Unterschiede der Zahl frei zirkulierender Zellen im Vollblut messbar.

7.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie wurde zur Klärung der Auswirkungen von Thrombopoetin auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber durchgeführt. Sie gliedert sich in eine Reihe experimenteller Studien zur Charakterisierung pleiotroper Substanzen, wie zum Beispiel Erythropoietin, GCSF oder Interleukin-6, ein. Die Ergebnisse stützen sich insbesondere auf die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der pathophysiologischen Vorgänge des Ischämie-/Reperfusionsschadens. Weiterhin wurden serologische, immunhistochemische und durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt.

Die vorliegenden Ergebnisse und die anschließende Diskussion führten zu folgenden Schlussfolgerungen:

1. Die Vorbehandlung mit TPO führte zu keiner Verbesserung der durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden ausgelösten Perfusionsstörung. Ebenso zeigte sich keine Reduktion der sinusoidalen Leukozytenakkumulation. In den Venolen reduzierte sich die Anzahl der rollenden und adhärenen Leukozyten nur tendenziell.
2. Das Ausmaß der hepatozellulären Apoptose beim Ischämie-/Reperfusionsschaden der Maus ist sehr gering. Eine Beeinflussung der Apoptoserate durch TPO zeigte sich nicht.
3. Die Freisetzung intrazellulärer Enzyme wurde durch die Applikation von TPO in unterschiedlichem Maße beeinflusst. Während sich eine Tendenz zur verstärkten Freisetzung von GLDH und ALT zeigte, konnte TPO die Freisetzung von AST tendenziell reduzieren.
4. Am Beispiel von IL-6, welches aus Monozyten und Makrophagen sowie Endothelzellen freigesetzt wird, zeigte sich, dass TPO in der Lage ist, die Freisetzung dieses proinflammatorischen Zytokins leicht zu reduzieren.

5. Ein direkt aktivierender Einfluss von TPO auf die Thrombozytenaktivität wurde mittels Thrombozytenisolierung und Durchflusszytometrie nicht nachgewiesen. Eine erhöhte Aktivierbarkeit durch Thrombin zeigte sich ebenfalls nicht.
6. Der Einsatz von TPO 24 Stunden vor Auslösung des Ischämie-/Reperfusionsschadens zeigte zwar tendenziell protektive Ansätze, erbrachte jedoch keine signifikante Reduktion des Schadens.

Die vorliegende Studie konnte somit anhand der erhobenen Parameter und dem zu Grunde liegenden Versuchprotokoll keinen protektiven Effekt von TPO auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden belegen. Damit erscheint TPO als therapeutisches Mittel im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens der Leber zunächst nicht effektiv zu sein. Dazu ist zu erwähnen, dass die Fallzahlen auf Grund des tierexperimentellen Versuchsaufbaus gering waren. Dementsprechend hohe Standardabweichungen erschwerten das Erreichen von signifikanten Unterschieden. Es ergaben sich nur geringe Hinweise auf einen hepatoprotektiven Effekt, welcher durch den Nachweis der TPO-Rezeptorexpression hätte erwartet werden können. Diese Hinweise bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen zur Vervollständigung der Fallzahlen sowie der untersuchten Parameter. Die Variablen „Applikationszeitpunkt“ und „TPO-Dosierung“ wurden in der vorliegenden Studie nicht ausschöpfend untersucht, so dass auch diesbezüglich eine Erweiterung der Datenlage Aufschluss hinsichtlich des hepatoprotektiven Potentials von TPO geben wird.

8 Literaturverzeichnis

1. **Alexander W.S., Roberts A.W., Nicola N.A., Li R. und Metcalf D.**, Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* 87:2162-2170, 1996
2. **Arcasoy M.O.**, The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 141:14-31, 2008
3. **Baatz H., Steinbauer M., Harris A.G. und Krombach F.**, Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 15:85-91, 1995
4. **Baker J.E., Su J., Hsu A., Shi Y., Zhao M., Strande J.L., Fu X., Xu H., Eis A., Komorowski R., Jensen E.S., Tweddell J.S., Rafiee P. und Gross G.J.**, Human thrombopoietin reduces myocardial infarct size, apoptosis, and stunning following ischaemia/reperfusion in rats. *Cardiovasc Res* 77:44-53, 2008
5. **Banga N.R., Homer-Vanniasinkam S., Graham A., Al-Mukhtar A., White S.A. und Prasad K.R.**, Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 92:528-538, 2005
6. **Barton B.E. und Jackson J.V.**, Protective role of interleukin 6 in the lipopolysaccharide-galactosamine septic shock model. *Infect Immun* 61:1496-1499, 1993
7. **Behrns K.E., Tsiotos G.G., DeSouza N.F., Krishna M.K., Ludwig J. und Nagorney D.M.**, Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* 2:292-298, 1998
8. **Berger G., Hartwell D.W. und Wagner D.D.**, P-Selectin and platelet clearance. *Blood* 92:4446-4452, 1998
9. **Bergmeyer H.U., Scheibe P. und Wahlefeld A.W.**, Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem* 24:58-73, 1978
10. **Biberthaler P., Luchting B., Massberg S., Teupser D., Langer S., Leiderer R., Krombach F. und 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 (Berl)* 200:93-105, 2001
11. **Bilzer M. und Gerbes A.L.**, Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 32:508-515, 2000

12. **Bronk S.F. und Gores G.J.**, Efflux of protons from acidic vesicles contributes to cytosolic acidification of hepatocytes during ATP depletion. *Hepatology* 14:626-633, 1991
13. **Broudy V.C., Lin N.L. und Kaushansky K.**, Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 85:1719-1726, 1995
14. **Busam K.J., Bauer T.M., Bauer J., Gerok W. und Decker K.**, Interleukin-6 release by rat liver macrophages. *J Hepatol* 11:367-373, 1990
15. **Calvete J.J.**, On the structure and function of platelet integrin alpha IIb beta 3, the fibrinogen receptor. *Proc Soc Exp Biol Med* 208:346-360, 1995
16. **Camargo C.A., Jr., Madden J.F., Gao W., Selvan R.S. und Clavien P.A.**, Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 26:1513-1520, 1997
17. **Cardenas A.**, Hepatorenal syndrome: a dreaded complication of end-stage liver disease. *Am J Gastroenterol* 100:460-467, 2005
18. **Carini R., Autelli R., Bellomo G. und Albano E.**, Alterations of cell volume regulation in the development of hepatocyte necrosis. *Exp Cell Res* 248:280-293, 1999
19. **Carver-Moore K., Broxmeyer H.E., Luoh S.M., Cooper S., Peng J., Burstein S.A., Moore M.W. und de Sauvage F.J.**, Low levels of erythroid and myeloid progenitors in thrombopoietin-and c-mpl-deficient mice. *Blood* 88:803-808, 1996
20. **Casillas-Ramirez A., Mosbah I.B., Ramalho F., Rosello-Catafau J. und Peralta C.**, Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci* 79:1881-1894, 2006
21. **Choi E.S., Hokom M.M., Chen J.L., Skrine J., Faust J., Nichol J. und Hunt P.**, The role of megakaryocyte growth and development factor in terminal stages of thrombopoiesis. *Br J Haematol* 95:227-233, 1996
22. **Clavien P.A.**, Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 28:281-285, 1998
23. **Clavien P.A., Harvey P.R. und Strasberg S.M.**, Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation* 53:957-978, 1992

24. **Clemens M.G., McDonagh P.F., Chaudry I.H. und Baue A.E.**, Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment. *Am J Physiol* 248:804-811, 1985
25. **Colletti L.M., Remick D.G., Burtch G.D., Kunkel S.L., Strieter R.M. und Campbell D.A., Jr.**, Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest* 85:1936-1943, 1990
26. **Court F.G., Wemyss-Holden S.A., Dennison A.R. und Maddern G.J.**, The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 89:1089-1095, 2002
27. **Cressman D.E., Greenbaum L.E., DeAngelis R.A., Ciliberto G., Furth E.E., Poli V. und Taub R.**, Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 274:1379-1383, 1996
28. **de Sauvage F.J., Hass P.E., Spencer S.D., Malloy B.E., Gurney A.L., Spencer S.A., Darbonne W.C., Henzel W.J., Wong S.C., Kuang W.J. und et al.**, Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369:533-538, 1994
29. **Decker K.**, Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192:245-261, 1990
30. **Eguchi H., McCuskey P.A. und McCuskey R.S.**, Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology* 13:751-757, 1991
31. **Ehrenreich H., Hasselblatt M., Knerlich F., von Ahsen N., Jacob S., Sperling S., Woldt H., Vehmeyer K., Nave K.A. und Siren A.L.**, A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:862-867, 2005
32. **Eipel C., Hardenberg J., Negendank S., Abshagen K. und Vollmar B.**, Thrombopoietin limits IL-6 release but fails to attenuate liver injury in two hepatic stress models. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21:923-931, 2009
33. **Ezaki T., Koyanagi N., Toyomasu T., Ikeda Y. und Sugimachi K.**, Natural history of hepatectomy regarding liver function: a study of both normal livers and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 45:1795-1801, 1998
34. **Febbraio M. und Silverstein R.L.**, Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J Biol Chem* 265:18531-18537, 1990

35. **Fielder P.J., Gurney A.L., Stefanich E., Marian M., Moore M.W., Carver-Moore K. und de Sauvage F.J.**, Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood* 87:2154-2161, 1996
36. **Foster D.C., Sprecher C.A., Grant F.J., Kramer J.M., Kuijper J.L., Holly R.D., Whitmore T.E., Heipel M.D., Bell L.A., Ching A.F. und et al.**, Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:13023-13027, 1994
37. **Gao W., Bentley R.C., Madden J.F. und Clavien P.A.**, Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 27:1652-1660, 1998
38. **Gasbarrini A., Borle A.B., Farghali H., Bender C., Francavilla A. und Van Thiel D.**, Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺i, Ca²⁺i, Mg²⁺i, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 267:6654-6663, 1992
39. **Geddis A.E., Linden H.M. und Kaushansky K.**, Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:61-73, 2002
40. **Gerwig T., Meissner H., Bilzer M., Kiemer A.K., Arnholdt H., Vollmar A.M. und Gerbes A.L.**, Atrial natriuretic peptide preconditioning protects against hepatic preservation injury by attenuating necrotic and apoptotic cell death. *J Hepatol* 39:341-348, 2003
41. **Ghezzi P. und Brines M.**, Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 11 Suppl 1:S37-44, 2004
42. **Gujral J.S., Bucci T.J., Farhood A. und Jaeschke H.**, Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 33:397-405, 2001
43. **Gurney A.L., Carver-Moore K., de Sauvage F.J. und Moore M.W.**, Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* 265:1445-1447, 1994
44. **Gurney A.L., Wong S.C., Henzel W.J. und de Sauvage F.J.**, Distinct regions of c-Mpl cytoplasmic domain are coupled to the JAK-STAT signal transduction pathway and Shc phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5292-5296, 1995
45. **Harker L.A., Hunt P., Marzec U.M., Kelly A.B., Tomer A., Hanson S.R. und Stead R.B.**, Regulation of platelet production and function by megakaryocyte growth and development factor in nonhuman primates. *Blood* 87:1833-1844, 1996
46. **Hochhauser E., Pappo O., Ribakovsky E., Ravid A., Kurtzwald E., Cherporko Y., Lelchuk S. und Ben-Ari Z.**, Recombinant human erythropoietin at-

- tenuates hepatic injury induced by ischemia/reperfusion in an isolated mouse liver model. *Apoptosis* 13:77-86, 2008
47. **Horie Y., Wolf R. und Granger D.N.**, Role of nitric oxide in gut ischemia-reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction. *Am J Physiol* 273:G1007-13, 1997
 48. **Huguet C., Gavelli A. und Bona S.**, Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour. *J Am Coll Surg* 178:454-458, 1994
 49. **Huguet C., Gavelli A., Chieco P.A., Bona S., Harb J., Joseph J.M., Jobard J., Gramaglia M. und Lasserre M.**, Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery* 111:251-259, 1992
 50. **Hurst S.M., Wilkinson T.S., McLoughlin R.M., Jones S., Horiuchi S., Yamamoto N., Rose-John S., Fuller G.M., Topley N. und Jones S.A.**, Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 14:705-714, 2001
 51. **Ikeda T., Yanaga K., Kishikawa K., Kakizoe S., Shimada M. und Sugimachi K.**, Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 16:454-461, 1992
 52. **Jaeschke H.**, Preservation injury: mechanisms, prevention and consequences. *J Hepatol* 25:774-780, 1996
 53. **Jaeschke H.**, Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5:402-408, 1998
 54. **Jaeschke H.**, Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 15:718-724, 2000
 55. **Jaeschke H.**, Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death. *Transplant Proc* 34:2656-2658, 2002
 56. **Jaeschke H. und Farhood A.**, Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 260:355-362, 1991
 57. **Jelkmann W.**, The role of the liver in the production of thrombopoietin compared with erythropoietin. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:791-801, 2001
 58. **Jones S.A.**, Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175:3463-3468, 2005
 59. Juelich. (2009). ["http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz."](http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz.)

60. **Juul S.E., McPherson R.J., Bammler T.K., Wilkerson J., Beyer R.P. und Farin F.M.**, Recombinant erythropoietin is neuroprotective in a novel mouse oxidative injury model. *Dev Neurosci* 30:231-242, 2008
61. **Kaindl A.M., Sifringer M., Koppelstaetter A., Genz K., Loeber R., Boerner C., Stuwe J., Klose J. und Felderhoff-Mueser U.**, Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol* 64:523-534, 2008
62. **Kato M., Sawada T., Kita J., Shimoda M. und Kubota K.**, Erythropoietin ameliorates early ischemia-reperfusion injury following the Pringle maneuver. *World J Gastroenterol* 16:4838-4845, 2010
63. **Kaushansky K., Lok S., Holly R.D., Broudy V.C., Lin N., Bailey M.C., Forstrom J.W., Buddle M.M., Oort P.J., Hagen F.S. und et al.**, Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 369:568-571, 1994
64. **Khandoga A., Biberthaler P., Messmer K. und Krombach F.**, Platelet-endothelial cell interactions during hepatic ischemia-reperfusion in vivo: a systematic analysis. *Microvasc Res* 65:71-77, 2003
65. **Kishimoto T.**, IL-6: from laboratory to bedside. *Clin Rev Allergy Immunol* 28:177-186, 2005
66. **Kohli V., Selzner M., Madden J.F., Bentley R.C. und Clavien P.A.**, Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 67:1099-1105, 1999
67. **Kojima H., Hamazaki Y., Nagata Y., Todokoro K., Nagasawa T. und Abe T.**, Modulation of platelet activation in vitro by thrombopoietin. *Thromb Haemost* 74:1541-1545, 1995
68. **Kooby D.A., Stockman J., Ben-Porat L., Gonen M., Jarnagin W.R., Dematteo R.P., Tuorto S., Wuest D., Blumgart L.H. und Fong Y.**, Influence of transfusions on perioperative and long-term outcome in patients following hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 237:860-870, 2003
69. **Kroemer G., Galluzzi L. und Brenner C.**, Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87:99-163, 2007
70. **Ku H., Yonemura Y., Kaushansky K. und Ogawa M.**, Thrombopoietin, the ligand for the Mpl receptor, synergizes with steel factor and other early acting cytokines in supporting proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. *Blood* 87:4544-4551, 1996
71. **Kuma S., Inaba M., Ogata H., Inaba K., Okumura T., Saito K., Yamamoto M. und Ikehara S.**, Effect of human recombinant interleukin-6 on the prolifera-

- tion of mouse hepatocytes in the primary culture. *Immunobiology* 180:235-242, 1990
72. **Kuter D.J.**, Thrombopoietin and thrombopoietin mimetics in the treatment of thrombocytopenia. *Annu Rev Med* 60:193-206, 2009
 73. **Kuter D.J., Beeler D.L. und Rosenberg R.D.**, The purification of megapoi-
etin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet produc-
tion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11104-11108, 1994
 74. **Kuter D.J. und Rosenberg R.D.**, The reciprocal relationship of thrombopoi-
etin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced
thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* 85:2720-2730, 1995
 75. **Lau W.Y., Lai E.C. und Lau S.H.**, Methods of vascular control technique dur-
ing liver resection: a comprehensive review. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*
9:473-81, 2010
 76. **Lee E.J., Silva S.M., Simoes Mde J. und Montero E.F.**, Effect of N-
acetylcysteine in liver ischemia-reperfusion injury after 30% hepatectomy in
mice. *Acta Cir Bras* 27:346-349, 2012
 77. **Lentsch A.B., Kato A., Yoshidome H., McMasters K.M. und Edwards M.J.**,
Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ische-
mia/reperfusion injury. *Hepatology* 32:169-173, 2000
 78. **Li K., Sung R.Y., Huang W.Z., Yang M., Pong N.H., Lee S.M., Chan W.Y.,
Zhao H., To M.Y., Fok T.F., Li C.K., Wong Y.O. und Ng P.C.**, Thrombopoi-
etin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin.
Circulation 113:2211-2220, 2006
 79. **Lok S., Kaushansky K., Holly R.D., Kuijper J.L., Lofton-Day C.E., Oort
P.J., Grant F.J., Heipel M.D., Burkhead S.K., Kramer J.M. und et al.**, Clon-
ing and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet
production in vivo. *Nature* 369:565-568, 1994
 80. **Mackay F., Loetscher H., Stueber D., Gehr G. und Lesslauer W.**, Tumor
necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial
cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp
Med* 177:1277-1286, 1993
 81. **Makuuchi M., Takayama T., Gunven P., Kosuge T., Yamazaki S. und Ha-
segawa H.**, Restrictive versus liberal blood transfusion policy for hepatecto-
mies in cirrhotic patients. *World J Surg* 13:644-648, 1989
 82. **Man K., Fan S.T., Ng I.O., Lo C.M., Liu C.L. und Wong J.**, Prospective
evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a random-
ized study. *Ann Surg* 226:704-711; discussion 711-713, 1997

83. **Matsumata T., Ikeda Y., Hayashi H., Kamakura T., Taketomi A. und Sugimachi K.**, The association between transfusion and cancer-free survival after curative resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 72:1866-1871, 1993
84. **McKeown C.M., Edwards V., Phillips M.J., Harvey P.R., Petrunka C.N. und Strasberg S.M.**, Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 46:178-191, 1988
85. **McLoughlin R.M., Hurst S.M., Nowell M.A., Harris D.A., Horiuchi S., Morgan L.W., Wilkinson T.S., Yamamoto N., Topley N. und Jones S.A.**, Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. *J Immunol* 172:5676-5683, 2004
86. **Menger M.D., Marzi I. und Messmer K.**, In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 23:158-169, 1991
87. **Menger M.D., Richter S., Yamauchi J. und Vollmar B.**, Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 46 Suppl 2:1452-1457, 1999
88. **Michelson A.D.**, Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 87:4925-4936, 1996
89. **Michelson A.D., Barnard M.R., Hechtman H.B., MacGregor H., Connolly R.J., Loscalzo J. und Valeri C.R.**, In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11877-11882, 1996
90. **Modur V., Li Y., Zimmerman G.A., Prescott S.M. und McIntyre T.M.**, Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest* 100:2752-2756, 1997
91. **Morita T., Togo S., Kubota T., Kamimukai N., Nishizuka I., Kobayashi T., Ichikawa Y., Ishikawa T., Takahashi S., Matsuo K., Tomaru Y., Okazaki Y., Hayashizaki Y. und Shimada H.**, Mechanism of postoperative liver failure after excessive hepatectomy investigated using a cDNA microarray. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 9:352-9, 2002
92. **Nagata Y. und Todokoro K.**, Thrombopoietin induces activation of at least two distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 377:497-501, 1995
93. **Nagino M., Kamiya J., Uesaka K., Sano T., Yamamoto H., Hayakawa N., Kanai M. und Nimura Y.**, Complications of hepatectomy for hilar cholangiocarcinoma. *World J Surg* 25:1277-1283, 2001
94. **Nakano Y., Kondo T., Matsuo R., Hashimoto I., Kawasaki T., Kohno K., Myronovych A., Tadano S., Hisakura K., Ikeda O., Watanabe M., Murata**

- S., Fukunaga K. und Ohkohchi N.**, Platelet dynamics in the early phase of postischemic liver in vivo. *J Surg Res* 149:192-198, 2008
95. **Nickels R.M., Seyfert U.T., Wenzel E., Menger M.D. und Vollmar B.**, A simple and reproducible method to reliably assess platelet activation. *Thromb Res* 110:53-56, 2003
96. **Pachter H.L. und Spencer F.C.**, Recent concepts in the treatment of hepatic trauma: facts and fallacies. *Ann Surg* 190:423-429, 1979
97. **Pachter H.L., Spencer F.C., Hofstetter S.R., Liang H.G. und Coppa G.F.**, Significant trends in the treatment of hepatic trauma. Experience with 411 injuries. *Ann Surg* 215:492-502, 1992
98. **Peng J., Friese P., Wolf R.F., Harrison P., Downs T., Lok S., Dale G.L. und Burstein S.A.**, Relative reactivity of platelets from thrombopoietin- and interleukin-6-treated dogs. *Blood* 87:4158-4163, 1996
99. **Peralta C., Bulbena O., Bargallo R., Prats N., Gelpi E. und Rosello-Catafau J.**, Strategies to modulate the deleterious effects of endothelin in hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation* 70:1761-1670, 2000
100. **Peralta C., Closa D., Hotter G., Gelpi E., Prats N. und Rosello-Catafau J.**, Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 229:264-270, 1996
101. **Pringle J.H.**, V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg* 48:541-549, 1908
102. **Rasko J.E., O'Flaherty E. und Begley C.G.**, Mpl ligand (MGDF) alone and in combination with stem cell factor (SCF) promotes proliferation and survival of human megakaryocyte, erythroid and granulocyte/macrophage progenitors. *Stem Cells* 15:33-42, 1997
103. **Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G. und Mantovani A.**, Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6:315-325, 1997
104. **Rosser B.G. und Gores G.J.**, Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108:252-275, 1995
105. **Rotter R., Menshykova M., Winkler T., Matziolis G., Stratos I., Schoen M., Bittorf T., Mittlmeier T. und Vollmar B.**, Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *J Orthop Res* 26:1618-1626, 2008

106. **Rouleau C., Cui K. und Feldman L.**, A functional erythropoietin receptor is necessary for the action of thrombopoietin on erythroid cells lacking c-mpl. *Exp Hematol* 32:140-148, 2004
107. **Rudiger H.A., Graf R. und Clavien P.A.**, Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury. *J Invest Surg* 16:149-159, 2003
108. **Rudiger H.A., Kang K.J., Sindram D., Riehle H.M. und Clavien P.A.**, Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 235:400-407, 2002
109. **Saetzler R.K., Jallo J., Lehr H.A., Philips C.M., Vasthare U., Arfors K.E. und Tuma R.F.**, Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45:505-513, 1997
110. **Santiago Delpin E.A., Figueroa I., Lopez R. und Vazquez J.**, Protective effect of steroids on liver ischemia. *Am Surg* 41:683-685, 1975
111. **Scheding S., Bergmann M., Shimosaka A., Wolff P., Driessen C., Rathke G., Jaschonek K., Brugger W. und Kanz L.**, Human plasma thrombopoietin levels are regulated by binding to platelet thrombopoietin receptors in vivo. *Transfusion* 42:321-327, 2002
112. **Schindler G., Kincius M., Liang R., Backhaus J., Zorn M., Flechtenmacher C., Gebhard M.M., Buchler M.W. und Schemmer P.**, Fundamental efforts toward the development of a therapeutic cocktail with a manifold ameliorative effect on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Microcirculation* 16:593-602, 2009
113. **Schmeding M., Hunold G., Ariyakhagorn V., Rademacher S., Boas-Knoop S., Lippert S., Neuhaus P. und Neumann U.P.**, Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transpl Int* 22:738-746, 2009
114. **Schmeding M., Neumann U.P., Boas-Knoop S., Spinelli A. und Neuhaus P.**, Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Eur Surg Res* 39:189-197, 2007
115. **Seiler C.A., Redaelli C., Schmied B.M., Baer H.U. und Buchler M.W.**, [Liver resection for liver metastases--1998 Bern Symposium]. *Swiss Surg* 6:164-168, 2000
116. **Selzner N., Rudiger H., Graf R. und Clavien P.A.**, Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 125:917-936, 2003
117. **Serracino-Inglott F., Habib N.A. und Mathie R.T.**, Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 181:160-166, 2001

118. **Shattil S.J.**, Signaling through platelet integrin alpha IIb beta 3: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb Haemost* 82:318-325, 1999
119. **Shattil S.J., Hoxie J.A., Cunningham M. und Brass L.F.**, Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb.IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 260:11107-11114, 1985
120. **Sindram D., Porte R.J., Hoffman M.R., Bentley R.C. und Clavien P.A.**, Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 118:183-191, 2000
121. **Sitnicka E., Lin N., Priestley G.V., Fox N., Broudy V.C., Wolf N.S. und Kaushansky K.**, The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87:4998-5005, 1996
122. **Skoda R.C., Seldin D.C., Chiang M.K., Peichel C.L., Vogt T.F. und Leder P.**, Murine c-mpl: a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. *Embo J* 12:2645-2653, 1993
123. **Sohma Y., Akahori H., Seki N., Hori T., Ogami K., Kato T., Shimada Y., Kawamura K. und Miyazaki H.**, Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene. *FEBS Lett* 353:57-61, 1994
124. **Souyri M., Vigon I., Penciolelli J.F., Heard J.M., Tambourin P. und Wendling F.**, A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 63:1137-1147, 1990
125. **Steinbauer M., Harris A.G., Abels C. und Messmer K.**, Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385:290-298, 2000
126. **Stoffel R., Wiestner A. und Skoda R.C.**, Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets. *Blood* 87:567-573, 1996
127. **Takeda K., Togo S., Kunihiro O., Fujii Y., Kurosawa H., Tanaka K., Endo I., Takimoto A., Sekido H., Hara M. und Shimada H.**, Clinicohistological features of liver failure after excessive hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 49:354-358, 2002
128. **Teoh N.C. und Farrell G.C.**, Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 18:891-902, 2003
129. **Toledo-Pereyra L.H., Simmons R.L. und Najarian J.S.**, Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am J Surg* 129:513-517, 1975

130. **Tucker O.N. und Heaton N.**, The 'small for size' liver syndrome. *Curr Opin Crit Care* 11:150-155, 2005
131. **Vigon I., Mornon J.P., Cocault L., Mitjavila M.T., Tambourin P., Gisselbrecht S. und Souyri M.**, Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5640-5644, 1992
132. **Vollmar B., Glasz J., Leiderer R., Post S. und Menger M.D.**, Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 145:1421-1431, 1994
133. **Vollmar B., Menger M.D., Glasz J., Leiderer R. und Messmer K.**, Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 267:786-793, 1994
134. **Vollmar B., Richter S. und Menger M.D.**, Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 270:798-803, 1996
135. **Wagner C.L., Mascelli M.A., Neblock D.S., Weisman H.F., Collier B.S. und Jordan R.E.**, Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88:907-914, 1996
136. **Weiss S.J.**, Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365-376, 1989
137. **Yang C., Li Y.C. und Kuter D.J.**, The physiological response of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to thrombocytopenia in the rat. *Br J Haematol* 105:478-485, 1999
138. **Yilmaz S., Ates E., Tokyol C., Pehlivan T., Erkasap S. und Koken T.**, The protective effect of erythropoietin on ischaemia/reperfusion injury of liver. *HPB (Oxford)* 6:169-173, 2004
139. **Yis U., Kurul S.H., Kumral A., Tugyan K., Cilaker S., Yilmaz O., Genc S. und Genc K.**, Effect of erythropoietin on oxygen-induced brain injury in the newborn rat. *Neurosci Lett* 448:245-249, 2008
140. **Zwacka R.M., Zhang Y., Halldorson J., Schlossberg H., Dudus L. und Engelhardt J.F.**, CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 100:279-289, 1997

Anhang

Publikation:

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 21:923-931, 2009

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, die vorliegende Arbeit „Der Einfluss von Thrombopoetin auf den postischämischen Leberschaden“ selbständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst sowie keine außer von den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet zu haben. Die benutzten Werke sowie inhaltlich und wörtlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Hamburg, 04. Dezember 2012

Steffen Negendank

Danksagung

Ich möchte mich beim gesamten Team des Instituts für Experimentelle Chirurgie mit der angeschlossenen Zentralen Versuchstierhaltung bedanken. Allen voran gilt mein Dank der Leiterin, meiner Doktormutter, Frau Professor Brigitte Vollmar, die mir die Dissertation an ihrem Institut ermöglichte und mir mit ihrem fundierten Fachwissen und ihrer Erfahrung zur Seite stand. Weiterhin bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. Christian Eipel, der mich einarbeitete und mich unter anderem durch die praktische Arbeit begleitete. Zudem danke ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen, die mich stets hilfsbereit unterstützten: Frau Berit Blendow, Frau Doris Butzlaff, Frau Dorothea Franz, Frau Maren Nerowski, Frau Dr. Kerstin Abshagen, Herr Dr. Helmut Stein, Frau Anja Gellert.

Meinen Mitdoktoranden möchte ich insbesondere für die flexiblen Absprachen zur Nutzung der Arbeitsplätze und die Teilhabe an ihrer Erfahrung danken.

Thesen zur Dissertation

1. Die Leberteileresektion nimmt eine wichtige Rolle in der Therapie von Tumorerkrankungen ein und stellt beim hepatozellulären Karzinom als auch bei Metastasen kolorektaler Karzinome den Goldstandard dar.
2. Ungefähr ein Drittel der postoperativen Komplikationen ist durch eine Leberdysfunktion im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens verursacht.
3. Durch die Weiterentwicklung der chirurgischen Techniken konnte die Komplikationsrate im Sinne des postoperativen Leberversagens gesenkt werden. Die therapeutischen Möglichkeiten bei Auftreten einer Leberdysfunktion sind jedoch weiterhin begrenzt.
4. In zahlreichen Studien wurden verschiedene Substanzen hinsichtlich ihres hepatoprotektiven Potentials untersucht. Es zeigten sich vielversprechende Ergebnisse für Glukokortikoide und Erythropoietin.
5. In der vorliegenden Arbeit wurde das dem Erythropoietin nahe verwandte Thrombopoetin, welches der Hauptregulator der Thrombopoese ist, auf sein hepatoprotektives Potential untersucht.
6. Am Mausmodell wurde der linke Leberlappen 24 Stunden nach der intraperitonealen Applikation von TPO einer 30- oder 60-minütige Ischämie mit anschließender Reperfusion ausgesetzt. Der linke Leberlappen wurde anschließend intravital fluoreszenzmikroskopisch untersucht.
7. Erst nach 60-minütiger Ischämie zeigte sich im Vergleich zur Sham-Gruppe anhand der erhobenen Parameter ein signifikanter hepatozellulärer Schaden mit einer sinusoidalen Perfusionsminderung, vermehrter Leukozyten-Endothelzellinteraktion, Anstieg der Transaminasen und der IL-6-Konzentration im Plasma.

8. Die Applikation von TPO in einer Dosierung von 12,5 µg/kg KG 24 Stunden vor Induktion der Ischämie verbesserte die sinusoidale Perfusion nicht.
9. Die Leukozyten-Endothelzellinteraktion wurde durch die Vorbehandlung mit TPO nur geringfügig, jedoch nicht signifikant, vermindert.
10. Die Apoptoserate im geschädigten Leberparenchym war insgesamt gering und wurde durch die Gabe von TPO ebenso nicht beeinflusst.
11. Die Transaminasen zeigten durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden einen von der Dauer der Ischämie abhängigen deutlichen Anstieg. TPO konnte diesen Anstieg nicht signifikant vermindern. Während die AST-Konzentration nach 60-minütiger Ischämie durch TPO um 50% reduziert werden konnte, war die ALT-Konzentration in der TPO-Gruppe sogar höher als in der Kontrollgruppe. Der damit niedrigere deRitis-Quotient als mögliches Zeichen der geringeren Schädigung kann jedoch nur tendenziell belegt werden, da die Ergebnisse nicht signifikant waren.
12. Durch die Inflammationsreaktion als Folge der Ischämie und der anschließenden Reperfusion kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration in den Versuchstieren. Diese konnte durch TPO nahezu halbiert werden. Jedoch erreichten auch diese Ergebnisse keine statistische Signifikanz. Diese Daten können aber ein Hinweis auf einen negativen „Feedback-Mechanismus“ von TPO auf die Freisetzung von IL-6 sein.
13. Trotz des Nachweises des TPO-Rezeptors cMPL in der Leber, welcher beim Ischämie-/Reperfusionsschaden vermehrt exprimiert wird, hatte TPO somit keinen Einfluss auf die hepatozelluläre Apoptose. Ebenso zeigten die Ergebnisse keine signifikanten Hinweise auf ein hepatoprotektives Potential von TPO. Dies steht im Widerspruch zur Wirkung des nahe verwandten EPO auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber.