

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

**AUSWIRKUNG LEUKOZYTENSTIMULIERENDER
UND –DEPLETIERENDER AGENZIEN
AUF DEN MIKROVASKULÄREN UND
PARENCHYMATÖSEN
REPERFUSIONSSCHADEN DER LEBER**

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

vorgelegt von:

Mathias Jung

Geboren am 27.08.1980 in Quierschied

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	4
2 ABSTRACT	6
3 EINLEITUNG	7
3.1 Ischämie und Reperfusion	7
3.2 Ischämie	7
3.3 Reperfusion	8
3.4 Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	12
3.5 Nitrogen Mustard	15
4. ZIEL DER STUDIE	16
5 MATERIAL UND METHODEN	17
5.1 Versuchstiere	17
5.2 Modell	17
5.2.2 Ischämie und Reperfusion (I/R) der Leber	18
5.2.3 Mikrozirkulationsmodell der Leber	18
5.2.4 Vorbehandlung	19
5.3 Untersuchungstechniken	19
5.3.1 Makrohämodynamik	19
5.3.2 Intravitale Fluoreszenz-Mikroskopie	20
5.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter	22
5.3.3.1 Sinusoidales Perfusionsversagen	22
5.3.3.2 Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit	22
5.3.3.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	22
5.3.3.4 Hepatozelluläre Apoptose	23
5.3.3.5 Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität	24
5.3.4 Hepatozelluläre Exkretionsfunktion	25
5.3.5 Vollblut-Analytik	25
5.3.5.1 Arterielle Blutgase und Zellzahl	25
5.3.5.2 Serumkonzentration leberspezifischer Enzyme und Zytokine	26
5.3.6 Gewebeasservierung	26
5.3.7. Lichtmikroskopie	26
5.3.7.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung	27
5.3.7.2 Chlorazetatesterase Färbung	27
5.3.8 Proteinbiochemische Analysen	28
5.3.8.1 Immunhistochemie	28
5.3.8.2 Western Blot	29
5.4 Experimentelles Protokoll	31
5.5 Datenerfassung und Statistik	33

6 ERGEBNISSE	35
6.1 Makro- und Mikrohäodynamik	35
6.1.1 Blutbild	35
6.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz	37
6.1.3 Blutgasanalyse	38
6.1.4 Mikrozirkulation	39
6.1.4.1 Sinusoidales Perfusionsversagen	39
6.1.4.2 Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit	41
6.1.4.3 Sinusoidale Leukostase	42
6.1.4.4 Venuläre Leukozytenadhäsion	43
6.1.4.5 Hepatozelluläre Apoptose	44
6.1.4.6 Kupffer-Zell-Phagozytose-Aktivität	45
6.2 Leberfunktion und –integrität	46
6.2.1 Galleexkretion	46
6.2.2 Plasma-Enzymaktivitäten	47
6.2.2.1 Alanin-Aminotransferase (ALT)	47
6.2.2.2 Aspartat-Aminotransferase (AST)	48
6.2.2.3 Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)	50
6.2.2.4 Laktatdehydrogenase (LDH)	51
6.3 Morphologie und Entzündung	52
6.3.1 Histomorphologie	52
6.3.1.1 Zytoplasmatische Vakuolisierung	52
6.3.1.2 Zytoplasmatische Grobscholligkeit	53
6.3.1.3 Sinusoidale Kongestion	54
6.3.1.4 Leukozyteninfiltration	56
6.3.2 Entzündungsmediatoren	57
6.3.2.1 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α)	57
6.3.2.2 Interleukin-6 (IL-6)	57
6.3.2.3 Interleukin-10 (IL-10)	58
6.4 Proteinbiochemische Analysen	58
6.4.1 Immunhistochemie	58
6.4.2 Western Blot	59
7 DISKUSSION	62
7.1 Diskussion von Material und Methoden	62
7.1.1 Diskussion der Modelle	62
7.1.2 Ischämie und Reperfusion (I/R) der Leber	63
7.1.3 Diskussion der Untersuchungstechniken	65
7.2 Diskussion der Ergebnisse	70
7.2.1 Schädigung des linken Leberlappens durch Ischämie und Reperfusion	70
7.2.2 Wirkungen von G-CSF auf das Lebergewebe nach Ischämie und Reperfusion	73
7.2.3 Wirkungen von Nitrogen Mustard auf das Lebergewebe nach Ischämie und Reperfusion	77
7.2.4 Mechanismen	78
7.3 Schlussfolgerung	81
8 LITERATUR	83
9 DANKSAGUNG UND PUBLIKATION	96

1 Zusammenfassung

Eine Reihe experimenteller und klinischer Studien der letzten Jahre konnte nachweisen, dass Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) sowohl die Sepsis-induzierte Organdysfunktion und Sterblichkeit, als auch den Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R) von Herz und Gehirn signifikant reduzieren kann. Das Ziel der vorliegenden Studie war zu klären, inwieweit G-CSF auch den I/R-Schaden der Leber beeinflusst, und ob diese Protektion über eine Reduktion der postischämischen Mikrozirkulationsstörung vermittelt wird.

An weiblichen, mit Pentobarbital (50 mg/kg KG) narkotisierten Sprague Dawley Ratten wurde nach Laparotomie eine 90 min selektive Ischämie des linken Leberlappens durchgeführt. Die Mikrozirkulation der Leber wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie zu Ausgangsbedingungen, sowie direkt nach Ischämie und nach 90 min Reperfusion untersucht. G-CSF (50 µg/kg KG) wurde 16 h, sowie 1 h vor Ischämie oder 1 h vor Reperfusion des linken Leberlappens verabreicht. I/R-Kontrolltiere erhielten ein vergleichbares Volumen an NaCl. Sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen. Einer weiteren Gruppe wurde Nitrogen Mustard (1,75 mg/kg KG) injiziert. Der mikrovaskuläre Reperfusionsschaden wurde anhand des sinusoidalen Perfusionsversagens und der intrahepatischen Leukozytenrekrutierung quantitativ analysiert. Der Leberparenchymschaden wurde durch Bestimmung der hepatozellulären Apoptose, der Gallesekretion, der Plasmakonzentration von ALT und AST, sowie anhand histomorphologischer und proteinbiochemischer Analysen quantifiziert.

I/R bewirkte ein signifikantes sinusoidales Perfusionsversagen und eine massive sinusoidale Leukostase. Des Weiteren war I/R mit einem deutlichen Anstieg der venulären Leukozytenadhäsion und der hepatozellulären Apoptose assoziiert.

Die Injektion von G-CSF 16 h vor Ischämie reduzierte das I/R-induzierte sinusoidale Perfusionsversagen. Weiterhin führte G-CSF 16 h vor Ischämie zur verstärkten sinusoidalen Leukostase, wohingegen die venuläre Leukozytenadhäsion und Plasmakonzentrationen hepatischer Enzyme unbeeinflusst blieben. Die hepatozelluläre Apoptoserate wurde reduziert. Die histomorphologischen Untersuchungen wiesen eine verminderte zytoplasmatische Grobscholligkeit und sinusoidale Kongestion nach.

G-CSF 1 h vor Ischämie bewirkte eine Reduktion des sinusoidalen Perfusionsversagens und eine Zunahme der venulären Leukozytenadhäsion. Keinen Effekt hatte die Gabe von G-CSF 1 h vor Ischämie auf die sinusoidale Leukostase, wohingegen die Anzahl hepatozellulärer Apoptosen reduziert wurde und die Plasmakonzentrationen von AST und ALT anstiegen. Histomorphologisch war eine Reduktion der sinusoidalen Kongestion nachweisbar. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Reperfusion bewirkte eine signifikante Reduktion des

sinusoidalen Perfusionsversagens, sowie eine deutliche Abnahme der sinusoidalen Leukostase, als auch der venulären Leukozytenadhäsion. Keinen Einfluss zeigte G-CSF 1 h vor Reperfusion auf das Ausmaß der hepatozellulären Apoptose, bewirkte allerdings eine signifikante Reduktion der Plasmakonzentration von AST und ALT als Indikatoren für nekrotischen Zelltod. Die quantitative Analyse der Gallesekretion zeigte, dass die I/R-bedingte Reduktion der Gallesekretion durch G-CSF wieder hergestellt werden konnte. Die histomorphologische Untersuchung zeigte nach G-CSF Behandlung eine Reduktion von Kongestion, zytoplasmatischer Grobscholligkeit und hepatozellulärer Vakuolisierung.

Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie zur Leukozytendepletion hatte keine protektiven Auswirkungen auf den Ischämie-Reperfusionsschaden, sondern führte zu einer Verschlechterung des Reperfusionsschadens.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der mikrovaskuläre und parenchymatöse Reperfusionsschaden der Leber durch die Gabe von G-CSF 1 h vor Reperfusion signifikant reduziert werden kann. Damit könnte die Applikation von G-CSF 1 h vor Freigabe der Reperfusion eine neue Therapiestrategie zu Verhinderung des postischämischen Reperfusionssyndroms sein.

2 Abstract

Microvascular hepatic reperfusion injury and post-ischemic organ dysfunction are the main causes for mortality and morbidity after hepatic ischemia. The objective of the present *in vivo* study was to investigate beneficial effects of G-CSF on microvascular and parenchymal hepatic ischemia-reperfusion injury.

Pentobarbital sodium anesthetized (50 mg/kg bw) female Sprague Dawley rats (220-280 g) were laparotomized. Subsequently, warm ischemia of the left liver lobe was induced for 90 min, followed by 90 min of reperfusion. Hepatic microcirculation was analyzed after I/R by means of intravital fluorescence microscopy. Animals were injected intravenously with 50 µg/kg bw G-CSF either 16 h or 1 h before ischemia or 1 h before reperfusion, or an equivalent volume of 0.9% NaCl. Sham-operated animals served as non-ischemic controls. For investigation of the impact of leukocyte depletion on I/R injury, additional rats received 1.75 mg/kg bw nitrogen mustard 48 h before ischemia.

I/R caused significant sinusoidal perfusion failure as well as massive sinusoidal leukostasis, venular leukocyte adhesion and hepatocellular apoptosis.

Injection of G-CSF 16 h before ischemia reduced sinusoidal perfusion failure and increased sinusoidal leukostasis. Venular leukocyte adhesion and plasma hepatic enzyme activities remained unchanged. Hepatocellular apoptosis decreased. Histomorphological analysis showed a reduction of I/R-induced parenchymal damage. G-CSF 1 h before ischemia caused a reduction of sinusoidal perfusion failure and hepatocellular apoptosis and increased venular leukocyte adhesion. Sinusoidal leukostasis remained unaffected. AST and ALT plasma activities were increased by G-CSF 1 h before ischemia and sinusoidal congestion was diminished. Application of G-CSF 1 h before reperfusion significantly reduced sinusoidal perfusion failure and caused a marked reduction of sinusoidal leukostasis and venular leukocyte adhesion. Hepatocellular apoptosis remained unaffected. Bile secretion was found significantly restored upon treatment by G-CSF 1 h before reperfusion. Histomorphological analysis revealed a marked reduction of the I/R-induced hepatocellular damage which was associated with a significant attenuation of plasma AST and ALT activities.

The application of nitrogen mustard 48 h before ischemia was not capable of preventing hepatocellular damage, but rather aggravated I/R-induced liver injury.

Our results demonstrate for the first time that G-CSF reduces hepatic microvascular injury after warm I/R and prevents cellular disintegration. Therefore, G-CSF may represent a novel approach to prevent I/R-induced liver injury.

3 Einleitung

3.1 Ischämie und Reperfusion

Die Ischämie von Organen und die darauf folgender Wiederherstellung der Durchblutung ist in der heutigen chirurgischen Therapie ein weit verbreitetes Verfahren. Die Unterbrechung der Durchblutung ist bei einer Vielzahl leberchirurgischer Eingriffe notwendig, wie z.B. bei der Behandlung des Lebertraumas oder bei der Resektion intrahepatischer Tumoren [HUGUET et al., 1992a; DELVA et al., 1989].

Als Mittel der Wahl zur Sicherung der Perfusionsunterbrechung und zur Vermeidung größerer Blutverluste gilt auch heute noch das 1908 von J.H. Pringle zum ersten Mal beschriebene „Pringle-Manöver“. Hierbei wird das *ligamentum hepatoduodenale* abgeklemmt, die arterielle und portalvenöse Versorgung der Leber kommt zum Erliegen. Der Operateur erhält ein blutungsarmes und gut überblickbares Arbeitsgebiet [BELGHITI et al., 1999]. Neben der lokalen Ischämie zeigen auch systemische Blutdruckabfälle im Rahmen von Schockzuständen bei Volumenmangel [CORSO et al., 1999; HAMANO et al., 1993], bei kardiogenem Schock [NUNES et al., 1970] und bei Sepsis [CHAUDRY et al., 1979; TOWNSEND et al., 1986] eine für die Organfunktion bedeutsame Reduktion der Perfusion vital essentiell notwendiger Organe. Die Folgen der Unterbrechung der Leberdurchblutung mit anschließender Wiederherstellung der Blutversorgung sind Organschäden auf zellulärer Ebene, die eine Dysfunktion mit Ausfall der entgiftenden [HASSELGREN, 1987] und exkretorischen Leistungen [BOWERS et al., 1987] der Leber zur Folge haben. Dies verursacht eine eingeschränkte Funktion von Lebertransplantaten [HENDERSON, 1999] und erhöht massiv die Sterblichkeit von Patienten mit Multiorganversagen [MARSHALL et al., 1988].

3.2 Ischämie

Der Ausfall der Blutversorgung und des aeroben Metabolismus in einem Gewebe führt im Organismus zu wesentlich ineffektiveren anaeroben Stoffwechselfvorgängen. Die Folge ist der Abfall des intrazellulären ATP-Gehalts, da die Zelle nicht mehr in der Lage ist, den Energiebedarf ihrer Enzyme zu decken [BOUTILIER, 2001]. In der Folge kommt die membranständige Na^+/K^+ -ATPase zum Erliegen, die bis zu 80% der zellulären Energiegewinnung benötigt [BOUTILIER, 2001]. Das Membranpotential bricht zusammen und Natrium, Calcium und Wasser strömen entlang des osmotischem Gradienten in die Zellen [DE

GREEF et al., 1998]. Das intrazelluläre Calcium aktiviert calciumabhängige Enzyme (Phospholipasen und Proteasen), welche ihrerseits die Degradation von Membran-Phospholipiden induzieren und die Zelldepolarisation beschleunigen [STEIMLE et al., 1992]. In den Mitochondrien findet sich während der Ischämie eine Umkehr der Aktivität der F1F0ATP-Synthetase: unter Verbrauch von ATP pumpt diese zur Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials H^+ -Ionen in den intermembranösen Spalt [BOUTILIER, 2001] und beschleunigt den Abfall energiereicher Phosphate in der Zelle [DI LISA et al., 1998]. Der Abbau von ATP zu AMP führt zu einer Akkumulation von Adenosin, das durch den Sauerstoffmangel nicht wieder phosphoryliert wird und dem Purinbasenabbau zugeführt wird [KHANDOGA, 2002]. Als Folge dieser intrazellulären Mechanismen schwellen Parenchym- und Endothelzellen unkontrolliert an [HOCHACHKA, 1986; CLEMENS et al., 1985; SILVER, 1977] und engen damit angrenzende versorgende Kapillaren ein [MAZZONI et al., 1990], was letztlich den nekrotischen Zelltod zur Folge hat. Dieses beeinträchtigt bei Wiederaufnahme der Perfusion aufgrund der Widerstandserhöhung im kapillären Endstomgebiet die suffiziente Blutversorgung des ischämischen Gewebes [MENGER et al., 1992], was durch die verlängerte Hypoxiezeit einen irreversiblen Gewebeschaden zur Folge haben kann [MENGER et al., 1989; MENGER et al., 1991a]. Das Resultat dieser durch Ischämie/Reperfusion im Gewebe induzierten Mechanismen wurde als „no-reflow“-Phänomen beschrieben [MENGER et al., 1992a].

3.3 Reperfusion

Das Wiedereinsetzen der Perfusion bewahrt noch intakte Parenchymverbände vor dem nekrotischen Zelltod, setzt aber auch weitere Schädigungsmechanismen in Gang, die sich im kapillären Perfusionsversagen, in der Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten und somit in der Induktion einer Entzündungsreaktion manifestieren [TERAMOTO et al., 1993].

Während der Reoxygenierung konvertiert die Xantindehydrogenase, die unter ischämischen Bedingungen im mikrovaskulären Endothel mit Beteiligung der Kofaktoren p38, MAPK und der Caseinkinase II phosphoryliert wird [KAYYALI et al., 2001], zur Oxidase, was im Rahmen der Metabolisierung von Hypoxanthin zu einer vermehrten Produktion von H_2O_2 und Sauerstoffradikalen (O_2^-) führt [PARKS und GRANGER, 1986; DE GREEF et al., 1998]. Wasserstoffperoxid hemmt die membranständige Na^+/K^+ -ATPase, was in der Folge die osmotische Regulation der Zellen erschwert. Folgen sind weiteres Anschwellen der Zellen, die Ausbildung von Vakuolen im Zytoplasma und letztlich die Zytolyse [KAKO et al., 1988]. Durch

die Applikation von freien-Radikal-Fängern wie Superoxiddismutase, oder die Hemmung der Xantinoxidase mittels Allopurinol, kann eine signifikante Reduktion des Gewebeschadens auf mikrovaskulärer Ebene erzielt werden [GRANGER et al., 1989; PERLER et al., 1990], was die zentrale Bedeutung der Radikale in der Pathogenese des zellulären Schadens beweist.

Als bedeutender Faktor der Gewebsschädigung während der frühen Phase der Reperfusion wurden die Kupferzellen identifiziert [JAESCHKE und FARHOOD, 1991; JAESCHKE et al., 1992]. Kupferzellen sind gewebständige Makrophagen der Leber, die durch Hypoxie aktiviert werden und Sauerstoffradikale und Zytokine freisetzen [SERRACINO-INGLOTT et al., 2001]. Sauerstoffradikale und Zytokine tragen maßgeblich zum kapillären Perfusionversagen und der Adhäsion von Granulozyten bei [DECKER 1990; CLEMENS et al., 1997; JAESCHKE et al., 1996; WANNER et al., 1996]. Weiterhin aktivieren die gebildeten O_2^- -Radikale redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B und AP-1 in Endothelzellen und Hepatozyten [BAEUERLE und HENKEL, 1994; ESSANI et al., 1996] und induzieren somit die Transkription entzündungsfördernder Gene [BELL et al., 1997]. Die zentrale Bedeutung von Kupferzellen für die Induktion des parenchymatösen Reperfusionsschadens konnte durch Hemmung beziehungsweise der Aktivierung der Kupferzellen nachgewiesen werden. Die Applikation von Gadoliniumchlorid, das die Kupferzell-Aktivität unterdrückt, führte zur Reduktion des Reperfusionsschadens [SERRACINO-INGLOTT et al., 2001]. Die Gabe von Latexpartikel während der Reperfusionsphase zur Aktivitätssteigerung [SERRACINO-INGLOTT et al., 2001] führte zur verstärkten Schädigung des Lebergewebes [SHIRATORI et al., 1994]. Nach Aktivierung der Kupferzellen durch Retinol konnte zudem eine erhöhte Plasmakonzentration von Glutathiondisulfid als Ausdruck des gesteigerten oxidativen Stresses während der Reperfusion nachgewiesen werden, während nach Kupferzellanaktivierung mit Gadoliniumchlorid die Glutathiondisulfidkonzentration im Plasma signifikant reduziert war [JAESCHKE und FARHOOD, 1991].

Die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) in der Pathogenese des Reperfusionsschadens wird kontrovers diskutiert. NO wird durch die induzierbare Isoform der Stickstoffoxid-Synthetase (iNOS) und die endotheliale Stickstoffoxid-Synthetase (eNOS) gebildet. Erstere kommt in der Leber ubiquitär vor, letztere wird nur von sinusoidalen Endothelzellen exprimiert [ZHANG et al., 1997]. Beide Enzyme werden durch Hypoxämie induziert [LI und JACKSON, 2002]. NO einerseits ist ein potenter Vasodilatator, der durch Zellmembranen diffundieren kann [JAESCHKE 2003] und intrazellulär cGMP-abhängige Kaskaden aktiviert. Das cGMP reguliert als second Messenger die Aktivität spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle, was zur Reduktion des intrazellulären Ca^{2+} führt. Die Folgen sind Relaxation glatter Muskelzellen und Vasodilatation [SAENZ DE TEJADA, 2002; BURNETT 2006]. Die gefäßerweiternden Eigenschaften antagonisieren die Wirkung des vasokonstriktorischen Endothelins, das während der Reperfusion freigesetzt wird [GOTO et al., 1994; NAKAMURA et al., 1995].

Versuche mit Gabe von NOS-Inhibitoren zeigten eine verminderte Leberperfusion und somit einen verstärkten Leberschaden nach Ischämie und Reperfusion [HARBRECHT et al., 1995; WANG et al., 1995].

Auf der anderen Seite trägt Stickstoffmonoxid auch zur Zellschädigung bei [LI und JACKSON, 2002]. NO reagiert spontan mit gleichzeitig gebildetem O_2^- zu Peroxynitrit ($OO\cdot NO$) [LI und JACKSON, 2002; SQUADRITO et al., 1998]. Das hochreaktive $OO\cdot NO$ führt zur Nitrifizierung und Inaktivierung der Prostacyclin (PGI_2)-Synthetase. Die Akkumulation von Prostaglandin H_2 (PGH_2) [LI und JACKSON, 2002] verursacht Vasospasmen, Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung durch die Stimulation des Thromboxan-Rezeptors $A_2(TXA_2)/PGH_2$ [ZOU und BACHSCHMID, 1999]. Darüber hinaus haben erhöhte NO-Konzentrationen selbst zytotoxische Effekte [KIM und KIM, 1998]. NO interagiert mit intrazellulären und mitochondrialen Enzymen und hemmt die Zellatmung durch die Bindung an den Cytochrom-Oxidase-Komplex [LI und JACKSON, 2002]. Die Produktion von NO erfolgt durch mehrere Isoenzyme (NO-Synthasen). Die Hauptvertreter sind die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Die iNOS wird in verschiedenen Zelltypen Zytokin-vermittelt induziert, zum Beispiel im Rahmen der Sepsis oder Endotoxämie [ALDERTON et al., 2001; PARRATT, 1998].

Die von Kupferzellen freigesetzten Zytokine, wie z.B. Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-1 induzieren und unterhalten die Entzündungsreaktion, die kritisch zum Organschaden und -dysfunktion beiträgt [FONG et al., 1990; COLLETTI et al., 1990; SUZUKI und TOLEDO-PEREYRA, 1994; THORNTON et al., 1990; WANNER et al., 1996]. TNF- α und IL-1 induzieren die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die die Interaktion von Leukozyten mit dem sinusoidalen Endothel vermitteln und zu einer leukozytären Akkumulation führen [POBER 1998]. Über die Induktion von Protein-78 wirkt TNF- α zudem chemotaktisch und aktivierend auf die rekrutierten neutrophilen Granulozyten [COLLETTI et al., 1996a] und induziert die Produktion von Superoxidradikalen in Kupferzellen [SHIBUYA et al., 1998]. Darüber hinaus induziert TNF- α apoptotischen Zelltod [LEIST et al., 1994]. IL-1 vermittelt die Produktion von TNF- α in den Kupferzellen und vermehrt die Radikalbildung in Neutrophilen [SHIRASUGI et al., 1997; SHITO et al., 1997]. Beide Mediatoren stimulieren die Rekrutierung von T-Lymphozyten, die ebenfalls pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- β und Interferon (IFN)- γ produzieren und durch Sezernierung von Granulocyte colony-stimulating Factor (G-CSF) zur Akkumulation der Leukozyten während der frühen Reperusionsphase beitragen [JAESCHKE 2003; ZWACKA et al., 1997]. Durch die verstärkte Expression von Mac-1-Molekülen auf der Zelloberfläche der Neutrophilen kommt es zur vermehrten Adhärenz und Akkumulation von Leukozyten in der hepatischen Mikrozirkulation [BAJT et al., 2001; WITTHAUT et al., 1994]. Die Plasmakonzentrationen von TNF- α und IL-1 steigen nach Beginn der Reperfusion an [SUZUKI und TOLEDO-PEREYRA, 1994]. Die Reduktion des

Reperfusionsschadens durch die Antagonisierung dieser Zytokine wurde in mehreren Studien nachgewiesen [SHIRASUGI et al., 1997; THORNTON et al., 1990].

Die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten ist für die Manifestation des frühen Reperfusionsschadens von entscheidender Bedeutung [JAESCHKE et al., 1990] und wird in der Lebermikrozirkulation maßgeblich durch Selektine vermittelt [KUBES et al., 2002]. Diese werden auf dem Endothel von Sinusoiden und postsinusoidalen Venulen [VOLLMAR et al., 1994a] exprimiert und interagieren mit den komplementären Rezeptoren der Leukozyten [GRANGER et al., 1994]. Auch Leukozyten und Thrombozyten sind zur Selektinexpression in der Lage (L- und P-Selektine) [LAWRENCE et al., 1991; CARLOS und HARLAN, 1994]. Die anschließende Aktivierung von leukozytären β 1- und β 2-Integrinen und die erhöhte Präsentation von ICAM-1 und VCAM-1 auf der Endotheloberfläche führt dann zur Adhäsion und Extravasation der weißen Blutkörperchen und schlussendlich zur Migration in das umliegende Gewebe [GRANGER et al., 1994].

Die venulären Endothelzellen mobilisieren P-Selektine aus „Weibel-Palade“-Körperchen, während sinusoidale Endothelzellen kein präformiertes P-Selektin speichern [JAESCHKE 1997]. Durch die vaskuläre Schädigung während der Reperfusion kommt es zum Zusammenbruch der Endothelzellbarriere und die Leukozyten haben direkten Zugang zu den Hepatozyten [CALDWELL-KENKEL et al., 1991; FISHER et al., 1997; McKEOWN et al., 1988]. Die Interaktion der Mac-1-Membranmoleküle mit β 2-Integrinen während der Adhäsion führt zur Degranulation mit Freisetzung von Proteasen, die direkt hepatozytotoxisch wirken [MAVIER et al., 1988; LI et al., 1993]. Über die NADPH-Oxidase produzieren aktivierte Leukozyten Radikale, die das umliegende Gewebe zusätzlich oxidativem Stress aussetzen [LENTSCH et al., 2000]. Die Ansammlung von Leukozyten in den Sinusoiden, das sogenannte „plugging“, verlangsamt den Blutfluss durch die Gefäße, bringt ihn jedoch nicht durch Okklusion der Sinusoide zum Erliegen [VOLLMAR et al., 1996b]. Demnach konnte kein Nachweis der Korrelation zwischen Anzahl der Leukozyten, postischämischem Gewebeschaden, oxidativem Stress [JAESCHKE et al., 1990] und kapillärem „no-reflow“ [VOLLMAR et al., 1996b] erbracht werden. Die intravasale Akkumulation von Leukozyten ist vielmehr Folge der organspezifischen Mikroarchitektur. Der schmale periportale Durchmesser der Sinusoide, die Tortuosität des Blutflusses, das fenestrierte Endothel und die Aktivierung von Kupffer- und Itozellen resultieren in einem zonalen Gradienten des Leukozytenfließverhaltens mit vermehrten Endothelkontakten im periportalen und midzonalen Gewebe, verglichen mit perizentralen Abschnitten [VOLLMAR et al., 1996b]. Durch die geringe Verformbarkeit der Leukozyten wird der Durchfluss beeinträchtigt [LICHTMAN, 1990]. An Gefäßbifurkationen, die besonders periportal schmaler sind als das eigentliche Gefäß, kommt es zur Stagnation von Leukozyten, da die Sinusoide Stauungseffekten nicht durch Erweiterung des Durchmessers entgehen können [VOLLMAR et al., 1996b]. Somit ist der Reperfusionsschaden durch die Antagonisierung dieser Zytokine wurde in mehreren Studien nachgewiesen [SHIRASUGI et al., 1997; THORNTON et al., 1990].

onsschaden die Folge der Interaktion von Leukozyten, Kupfferzellen, Zytokinen und anderen Mediatoren. Für die Gewebeschädigung nach Wiederherstellung der Perfusion, bestehend aus kapillärem Perfusionsversagen, Fortschreiten der Entzündungsreaktion, Gewebsuntergang und Zelltod, wurde der Terminus „reflow paradox“ geprägt [MENGER et al., 1992b].

3.4 Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)

G-CSF ist ein polypeptidischer Wachstumsfaktor, der die Produktion von neutrophilen Granulozyten reguliert. Dieser physiologische Prozess ist Teil der Grundlage des Immunsystems eines Organismus. So bildet ein erwachsener Mensch ungefähr 120 Milliarden Granulozyten am Tag nur um den physiologischen Verlust zu decken.

In immunologischen Stresssituationen kann die Produktionskapazität leicht auf das Zehnfache ansteigen. Neben der proliferativen und entzündungsmodulierenden Aktivität reguliert G-CSF auch Funktionen und Verteilung von Neutrophilen und Progenitorzellen im Organismus [DEMETRI et al., 1991].

Die Identifizierung von Wachstumsfaktoren gelang nach der Etablierung von Zellkultur-assays für hämatopoetische Progenitorzellen durch Metcalf, Sachs und Mitarbeiter [DEMETRI et al., 1991] Mitte der 1960er Jahre. Diese Versuche zeigten die Abhängigkeit von Überleben, Proliferation und Differenzierung hämatogenetischer Progenitorzellen von der Anwesenheit humoraler Faktoren, die „colony-stimulating activity“ genannt wurden [DEMETRI et al., 1991]. In weiteren Studien wurde G-CSF zuerst als Differenzierungsfaktor identifiziert und erhielt den Namen „granulocyte-macrophage differentiation factor (GM-DF)“ [BURGESS und METCALF, 1980; METCALF, 1980]. 1983 beschrieben Nicola et al. die biochemischen Charakteristika von murinem G-CSF an Mäusen [NICOLA et al., 1983]. G-CSF ist ein hydrophobes Glycoprotein mit einem molekularen Gewicht von 24-25 kDa, das zur Hälfte aus Neuraminsäure besteht und für die biologische Aktivität eine interne Disulfidbrücke benötigt. Nach der Identifikation des murinen G-CSF folgte die Entdeckung eines menschlichen Moleküls mit äquivalenten Eigenschaften. Pluripoietin und CSF- β , zwei zuvor beschriebene Mediatoren, erwiesen sich als identisch zu G-CSF [STRIFE et al., 1987; DEMETRI und GRIFFIN, 1991]. 1986 gelangen Souza et al. die Klonierung von humanes G-CSF codierender cDNA aus einer cDNA-Bibliothek [SOUZA et al., 1986]. Als Genlocus wurde Chromosom 17q11-22 identifiziert [DEMETRI und GRIFFIN, 1991]. Dies unterscheidet G-CSF von anderen menschlichen hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, IL-3, IL-4 oder IL-5, welche auf dem langen Arm von Chromosom 5 codiert sind [NICOLA, 1989]. Die Organisation des G-CSF-Gens im Genom besteht aus insgesamt fünf Exons über eine

Länge von 2500 Basenpaaren [DEMETRI und GRIFFIN, 1991]. Die Sekundärstruktur von G-CSF besteht zu zwei Dritteln aus Alphahelices und zu circa einem Fünftel aus Beta-Faltblattstrukturen. Die Tertiärstruktur zeigt deutliche Parallelen zu IL-6, bis hin zu gleich positionierten Disulfidbrücken zwischen den Proteinsträngen, was die Hypothese der Entstehung beider Genen durch Genduplikation mit anschließender unterschiedlicher Entwicklung untermauert [DEMETRI und GRIFFIN, 1991]. Die Regulation der Expression von G-CSF erfolgt durch transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen [TANIGUCHI 1988]. Transkribierte G-CSF mRNA, die von Monozyten, Fibroblasten und Mesenchymzellen, gebildet wird, hat in der Regel eine Halbwertszeit von circa 15 Minuten [KOEFFLER et al., 1988; ERNST et al., 1989; DEMETRI et al., 1990]. Nach Auftreten verschiedener Stimulanzien wie IL-1 oder TNF- α , deren Konzentrationen bei einer Entzündungsreaktion ansteigen, gewinnt die mRNA an Stabilität [ERNST et al., 1989] und akkumuliert im Zytoplasma. Ursächlich hierfür wird die Interaktion dieser Mediatoren mit RNAsen vermutet, die spezielle Instabilität verursachende Sequenzen im G-CSF-Transkript binden [SHAW und KAMEN, 1986; BAGBY et al. 1988]. Der Einfluss von Protoonkogenen und Onkogenen auf diese Regulationsprozesse ist noch nicht vollständig verstanden. So finden sich diese mRNA-Instabilität verursachenden Sequenzen auch in Protoonkogenen [DEMETRI und GRIFFIN, 1991] und Mutationen im ras-Onkogen können mit verstärkter Stabilität des G-CSF mRNA-Transkripts einhergehen [DEMETRI et al., 1990].

Die Anzahl der G-CSF-Rezeptoren auf der Plasmamembranoberfläche neutrophiler Granulozyten steigt mit dem Reifungsgrad der Zellen [DEMETRI und GRIFFIN, 1991]. Monozyten sind befähigt, G-CSF in geringem Maße zu binden [NICOLA und METCALF, 1985]. Die Zellen der erythropoetischen und der megakaryozytischen Stammzelllinie bilden keine Rezeptoren aus. Menschliche Neutrophile besitzen ein Spektrum von 700 bis 1500 Rezeptoren pro Zelle [NICOLA et al., 1986]. Jeder Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 100-150 Kilodalton [FUKUNAGA et al., 1990a] besteht entweder aus 759 oder 812 Aminosäuren [LARSEN et al., 1990]. Davon unabhängig bindet der Rezeptor G-CSF mit zwei unterschiedlichen Affinitäten. In oligomerischer Form mehrerer Kopien des Rezeptorproteins zeigt dieser eine hohe Bindungsaffinität, in der monomerischen Form lediglich eine mittlere Bindungsaffinität [FUKUNAGA et al., 1990a]. Die Zahl der Rezeptoren aus der Zelloberfläche wird nach vorangegangener Exposition mit G-CSF, GM-CSF und Entzündungsmediatoren wie TNF- α verringert [NICOLA et al., 1986; ELBAZ et al., 1991]. Nach Aktivierung des G-CSF-Rezeptors, der selbst keine Tyrosinkinaseaktivität besitzt [DEMETRI und GRIFFIN, 1991; DE FIGUEIREDO et al., 2004], kommt es zur Freisetzung von Arachnoidensäure aus Zellmembranphospholipiden, zur Aktivierung von Phospholipasen [DEMETRI und GRIFFIN, 1991] und Aktivierung von Transkriptionsproteinen (STAT1, STAT3 und STAT 5) [DE FIGUEIREDO et al., 2004]. Die Konzentration von intrazellulärem cAMP steigt rapide an [MAT-

SUDA et al., 1989]. G-CSF hat synergistische hämatopoetische Wirkung mit anderen Zytokinen. Die Gabe von rekombinantem humanem G-CSF stimuliert die Granulopoese und erhöht die Zahl der Neutrophilen im Blut [COHEN et al., 1987], was mit der Erhöhung der Zellzahl im Knochenmark und der Anzahl der Progenitorzellen einhergeht [DEMETRI und GRIFFIN, 1991]. Des Weiteren verstärkt G-CSF bei nachfolgender Exposition eines chemotaktischen Stimulus die Effektorfunktionen von reifen Neutrophilen, indem es die Zellen zur Superoxidproduktion veranlasst [KITAGAWA et al., 1987 YUO et al., 1990]. Die Morphologie der zirkulierenden Neutrophilen ändert sich in Folge der G-CSF-Exposition. Das Resultat ist eine mäßige Linksverschiebung im Differentialblutbild und die Bildung von Dohle-Körperchen und zytotoxischer Granula [GABRILOVE et al., 1988a; 1988b]. Weitere Wirkungen von G-CSF sind die Stimulation der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität [LOPEZ et al., 1983] und die *in vitro*-Induktion der Expression und Sekretion von INF- α durch neutrophile Granulozyten [SHIRAFUJI et al., 1990].

Neben den bekannten hämatopoetischen Effekten konnten in neueren Studien auch anti-inflammatorische Effekte von G-CSF nachgewiesen werden [BUSCH et al., 2004]. Die klinische Anwendung von G-CSF beschränkt sich nicht nur auf die Therapie hämatologischer Grunderkrankungen [OTTMANN et al., 2007], wobei jedoch die hämatopoetischen Wirkungen des Stammzellfaktors im Vordergrund stehen. Die Therapie mit G-CSF umfaßt heute auch die Behandlung ischämisch-infarzierter Organe wie Herz [HASEGAWA et al., 2006] oder Hirn [YANQING et al., 2006], wodurch die Regeneration betroffener Gewebe verbessert wird. Des Weiteren konnte eine entzündungshemmende Wirkung der Vorbehandlung mit G-CSF bei Sepsis nachgewiesen werden [BUSCH et al., 2004]. Die Freisetzung von TNF- α und IL-6 sanken um über 80%, die von IL-1 β um mehr als die Hälfte. Ebenso wurde die Produktion beider Mediatoren in den Kupfferzellen signifikant reduziert [BUSCH et al., 2004]. Hierbei zeigt die G-CSF-Vorbehandlung keine unmittelbaren Effekte auf die Makrophagen, sondern wirkt als negatives Feedbacksignal auf die Makrophagen-abhängige TNF- α -Produktion [GORGEN et al., 1992]. Am Herzen hat G-CSF durch die Phosphorylierung von Signalkaskaden wie Akt, ERK und Jak2 protektive Einflüsse auf das Myokard [UEDA et al., 2006]. Die Aktivierung von signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) führt zur vermehrten Bildung antiapoptotischer Proteine [HARADA et al., 2005]. Bei ischämischer Infarzierung schützt G-CSF das Herz auch durch nicht-genomische Effekte. Die Produktion von Stickstoffmonoxid steigt in reperfundierten Organen durch Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) signifikant an und die Infarktgröße wird reduziert [UEDA et al., 2006]. Die myokardiale Regeneration nach einem Infarkt wird durch die Abräumung nekrotischen Gewebes durch mobilisierte Neutrophile und Makrophagen [MINATOGUCHI et al., 2004] und die Einwanderung von Stammzellen aus dem Knochenmark beschleunigt [ORLIC et al., 2001]. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen bewirkt die Applikation von G-CSF

nach ischämischem Hirninfarkt eine Halbierung des Infarktvolumens bei vermehrter Expression von STAT3 und damit einen signifikanten neuroprotektiven Effekt [SCHABITZ et al., 2003]. Im Rahmen der durch Endotoxämie ausgelösten Leberschädigung konnte durch die Gabe von G-CSF der hepatozelluläre Schaden reduziert werden. G-CSF führte hierbei zur Reduktion der Transkripte von CINC-Genen und verringerte dadurch den durch Leukozyten vermittelten Parenchymschaden [VOLLMAR et al., 1998].

3.5 Nitrogen Mustard

Nitrogen Mustard ist eine alkylierende Substanz mit anti-neoplastischen Eigenschaften [VARGAS et al., 2000]. In den 1960er und 70er Jahren wurde Nitrogen Mustard zur Therapie von Lymphomen [MUBASHIR et al., 1973; VAN SCOTT und KALMANSON, 1973] und zur Immunsuppression [DILLARD et al., 1973] eingesetzt.

Nitrogen Mustard, auch als Mechlorethamin bezeichnet, wurde bei verschiedenen neoplastischen Erkrankungen, wie Hodgkin Lymphom, Leukämie, Lymphosarkom, Mycosis fungoides, Bronchialkarzinom und anderen metastasierenden Tumoren, als Monotherapie oder Bestandteil einer Kombinationstherapie eingesetzt. Da jedoch Nitrogen Mustard seinerseits stark kanzerogen wirkt, löst es je nach Applikationsart im Tierversuch unterschiedliche Tumore aus [SUBSTANCE PROFILES, 1985] und wurde durch andere Chemotherapeutika in der Tumorbehandlung ersetzt. Heute steht die topische Anwendung von Nitrogen Mustard bei kutanen Lymphomen im Vordergrund [PIELOP et al., 2003].

Nitrogen Mustard zeigt nach systemischer Applikation anti-mitotische Wirkungen. Es hat starke elektrophile Eigenschaften und bildet kovalente Bindungen mit verschiedenen nukleophilen Molekülen aus. Die zytotoxische Eigenschaften erklären sich aus der Alkylierung von DNA. Als bifunktionales alkylierndes Agens mit zwei 2-Chlorethyl-Seitenketten bildet es mit Guanin-Resten der DNA kovalente Bindungen aus [KIM, 2003]. In der Folge resultieren nach Aufnahme in die Zelle Schäden an der DNA, RNA und Proteinen und schlussendlich der Zelltod [PANASCI et al., 2002]. Des Weiteren vermutet man die Modulation von Immunmechanismen und die Interaktion mit der Keratinozyten-Langerhans-Zell-T-Zell-Achse bei topischer Anwendung [KIM, 2003]. Nitrogen Mustard ist extrem toxisch und während der Behandlung treten unerwünschte Nebenwirkungen neurologischer, dermatologischer und hepatologischer Art auf. Es verursacht Übelkeit, Erbrechen und Schäden am Immunsystem durch Knochenmarksdepression mit Panzytopenie und Hämorrhagie [REYNOLDS et al., 1993].

4. Ziel der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung, ob und in wie weit G-CSF beziehungsweise Nitrogen Mustard den mikrovaskulären und parenchymatösen Reperfusionsschaden der Leber reduziert.

Dazu wurde nach Applikation von G-CSF der durch Ischämie und Reperfusion induzierte Leberschaden anhand intravitalmikroskopischer Parameter wie sinusoidales Perfusionsversagen, intrahepatischer Leukozytenakkumulation und Kupfferzellaktivität analysiert. Bestimmung der Galleexkretion und hepatozellulärer Enzyme im Plasma ermöglichten die Quantifizierung von Leberfunktion und –integrität.

Histomorphologische Untersuchungen des Lebergewebes erlaubten die Beurteilung des I/R-induzierten Reperfusionsschadens auf das Leberparenchym. Das Ausmaß der I/R begleitende Inflammationsreaktion wurde durch Messung von Entzündungsmediatoren bestimmt. Mit Hilfe proteinbiochemische Analysen wurden I/R-induzierte Veränderungen der Expression von hepatozellulären Proteinen quantifiziert.

5 Material und Methoden

5.1 Versuchstiere

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

5.2 Modell

5.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation

Die Tiere wurden mit Pentobarbital (50 mg/kg KG i.p., Narcoren, Merial, Deutschland) anästhesiert. Nach Rasur von Hals- und Bauchregion (Electra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch mit integrierter Heizplatte (Fa. Effenberger, München, Deutschland) fixiert. Eine Temperatursonde erlaubte durch Rücksteuerung zur Heizplatte eine Konstanthaltung der Körpertemperatur zwischen 36 °C und 37 °C. Nach medianer Hautschnittführung und der stumpfen Präparation durch die Halsmuskulogen erfolgte die Darstellung der Trachea. Die darauffolgende durchgeführte Tracheotomie mit Einlage eines Polyäthylenkatheters (Portex Polythene Tubing, Innendurchmesser 1,67 mm, Außendurchmesser 2,42 mm, Portex LTD., Hythe, Kent, GB) in die Luftröhre erleichterte die Spontanatmung der Versuchstiere.

Im Anschluss daran erfolgte die Präparation und Freilegung der Arteria carotis communis sinistra und der Vena jugularis dextra. Beide Gefäße wurden mit Seidenfäden angeschlungen und nach Inzision wurden Polyäthylenkatheter (PE-50, Innendurchmesser 0,58 mm, Außendurchmesser 0,96 mm, Portex LTD., GB) im Gefäßlumen platziert und mit den vorgelegten Fäden fixiert. Der Katheter in der Arterie wurde über einen Dreiwegehahn mit

einem Druckabnehmer (Statham Typ P23 ID, Gould INC., Oxnard, California, USA) zur Ermittlung von Herzfrequenz und mittlerem arteriellen Blutdruck verbunden. Des Weiteren diente der arterielle Katheter zur Blutentnahme für Blutgasanalyse und Blutbildbestimmung sowie zur Applikation von Latexpartikeln. An den venösen Katheter wurde ein weiterer Dreiwegehahn angeschlossen, der zur Volumensubstitution, zum Ausgleich der *Perspiratio insensibilis* (NaCl 0,9% 3 ml/h) und der Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen und G-CSF diente.

Der operative Zugang zur Leber erfolgte durch mediane Laparatomie, die entstehenden Bauchwandlappen wurden cranialwärts mit an Magneten befestigten Haken fixiert. Die Blutstillung geschah mittels bipolarem Elektrokauter (Bipolator 50 F.L. Fischer).

Nach Durchtrennung der Haltebänder der Leber zum Zwerchfell und Retroperitoneum erfolgte die Darstellung und Kanülierung des *Ductus choledochus* (PE-50). Zur Vermeidung von Austrocknung und Abkühlung der Baueingeweide wurde das komplette Intestinum mit feuchten Mullkompressen abgedeckt und regelmäßig mit 37 °C warmer Kochsalzlösung (B.Braun) superfundiert.

Zum Schutz der Leber vor Austrocknung und Oxidation wurde diese während der chirurgischen Präparation mit Sauerstoff-impermeabler Folie abgedeckt und ebenfalls mit 37 °C warmer Kochsalzlösung regelmäßig benetzt.

5.2.2 Ischämie und Reperfusion (I/R) der Leber

Die Ischämie des linken Leberlappens wurde nach Abklemmen des Pedikels des linken Leberlappens mit Hilfe eines Gefäßclips (Yasargil-Clip, Verschlusskraft 0,39-0,49 N, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) herbeigeführt. Bei korrekter Positionierung des Clips blasste der gesamte linke Leberlappen sofort ab, der Stillstand der Perfusion wurde des Weiteren intravitalmikroskopisch kontrolliert.

Die Reperfusion der Leber wurde nach 90 Minuten Ischämie durch Wiedereröffnen und Entfernen des Gefäßclips eingeleitet.

5.2.3 Mikrozirkulationsmodell der Leber

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation wurden die Tiere um 45° in ihrer Längsachse nach links geneigt. Auf dem Operationstisch wurde der linke Leberlappen um 180° um den Gefäßstil rotiert und auf einem mit Knetmasse anmode-

lierten Magnetstativ gelagert. Die Verstellbarkeit des Stativs in drei Ebenen erlaubte die horizontale Positionierung des linken Leberlappens und die Verringerung der Atembewegungen in der Fokusebene des Mikroskops. Der Leberlappen wurde hiernach mit 37 °C warmer 0,9%iger Kochsalzlösung superfundiert und mit einem Deckglas (24 x 32 mm) abgedeckt. Mit dieser Art der Auslagerung war durch die Intravitalmikroskopie die Visualisierung einer Fläche von etwa 2 x 3 cm möglich. Dies entspricht morphologisch einem Äquivalent von circa 2000 Leberazini.

5.2.4 Vorbehandlung

Zur Untersuchung der Effekte von G-CSF auf die Leber erhielten die Versuchstiere eine Dosis von 50 µg/kg KG zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten, entweder 16 h bzw. 1 h vor Ischämie oder 1 h vor Reperfusion.

Die Depletion von Leukozyten im Blut der Versuchstiere erfolgte durch eine intravenöse Bolusinjektion von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie. Das Medikament wurde vor der Applikation in steriler physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Nach Präparation der *Vena jugularis sinistra* unter Ketamin-Rompun-Narkose (80 mg Ketamin/kg KG + 3,8 mg Xylazin/kg KG i. p.) erfolgte die Injektion in einer Dosierung von 1,75 mg/kg KG 48 Stunden vor Beginn der Ischämie. Anschließend wurde die Wunde mit Nahtmaterial verschlossen. Zur Feststellung der Leukozytendepletion wurde den Versuchstieren vor Versuchsbeginn arteriell Blut entnommen und die Anzahl der Leukozyten mittels Coulter Counter Act diff (Coulter Electronics LTD, Luton Beds, GB) überprüft. Als obere Grenze der Zellzahl wurden weniger als 900 Leukozyten/µl Vollblut der Versuchstiere festgelegt.

5.3 Untersuchungstechniken

5.3.1 Makrohämodynamik

Der arterielle Blutdruck wurde über einen druckstabilen Katheter (PE-50) in der Arteria carotis auf einen Druckabnehmer (Statham Typ P23 ID, Gould INC., Oxnard, California, USA) übertragen, von Vorverstärkern aufgenommen und analog (Hellige Freiburg, Deutschland) angezeigt. Die Herzfrequenz der Versuchstiere wurde anhand der arteriellen Blutdruckamplituden über einen vorbestimmten Zeitraum ermittelt.

5.3.2 Intravitale Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur Visualisierung der Mikrozirkulation der Leber wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt [MENGER et al., 1991b]. Diese erlaubt die Darstellung individueller Segmente des Gewebes und die quantitative Analyse verschiedener hämodynamischer Parameter auf mikroskopischer Ebene, sowie der Heterogenität mikrovaskulärer Flussphänomene und dynamischer Prozesse.

Zur Bestimmung der Ausgangsparameter („baseline“) sowie der Untersuchung der Mikrozirkulation nach 30 und 60 Minuten Reperfusion wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie unter Verwendung eines modifizierten Zeiss-Axiotech Mikroskops (Zeiss Axiotech, Jena, Deutschland) durchgeführt [MENGER et al., 1991b; VOLLMAR et al., 1993a-c]. Als Lichtquelle diente eine an ein Ploemopak-Illuminator System angeschlossene 100 W Quecksilberdampf-Lampe (HBO 100 Fluoarc, Leistungselektronik GmbH, Jena, Deutschland). Die in den Strahlengang eingebrachten Filterblöcke erlaubten die Trennung des Exzitations- und Emissionslichts. Die intravitalkroskopischen Bilder wurden mit Hilfe einer CCD-Videokamera (FK 6990, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA) aufgezeichnet. Diese Bilder wurden nach Zwischenschaltung eines Videozeitgenerators (VTG 33, FOR.A Company Ltd., Tokyo, Japan) an einen S-VHS Videorecorder (AG-7350, Panasonic, Ratingen, Deutschland) übertragen und auf einem Monitor (PVM-1442 QM, (diagonal: 330 mm), Sony GmbH, München, Deutschland) wiedergegeben (Abb.1).

Für sämtliche Aufnahmen wurde ein 20x Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss Achromplan x20/0,75) verwendet. Es wurde hiermit eine 465fache Gesamtvergrößerung erreicht.

Zur Messung der basalen Parameter wurden Natrium-Fluoreszein (2 $\mu\text{mol/kg KG}$, Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Kontrastverstärkung und Rhodamin 6G (1 $\mu\text{mol/kg KG}$, Merck, Darmstadt, Deutschland) zur *in vivo* Färbung von Leukozyten intravenös injiziert. Nach einigen Minuten erfolgte die Aufzeichnung von 12 zufällig ausgewählten Lobuli im Blaulicht- (450-490/>520 nm) und Grünlichtfilter (530-560/>580 nm) für jeweils 30 Sekunden.

Dieses Prozedere wurde nach einer Reperfusiondauer von 30 und 60 Minuten wiederholt. Am Ende der 90 minütigen Reperfusion erfolgte zusätzlich eine intravenöse Injektion von Bisbenzimid (H33342, 2 $\mu\text{mol/kg KG}$, Sigma, Deutschland) zur intravitale Analyse der hepatozellulären Apoptosen. Dazu wurden sieben zufällig ausgewählte Gesichtsfelder im UV-Filter (330-380/>415 nm) für 30 Sekunden aufgenommen. Anschließend wurden intraarteriell fluoreszenzmarkierte Latexpartikel zur *in vivo*-Analyse der Kupferzell-Phagozytoseaktivität im Bolus (3 x 10⁸ Partikel/kg KG, Durchmesser 1,1 μm , YG plain, Po-

lyscience Inc., Warrington, PA, USA) injiziert. Während fünf Minuten erfolgte die Aufzeichnung ihrer zonalen Verteilung und Adhärenz im Blaulichtfilter in zufällig ausgewählten Lobuli in jeweils zehn Sekunden-Intervallen.

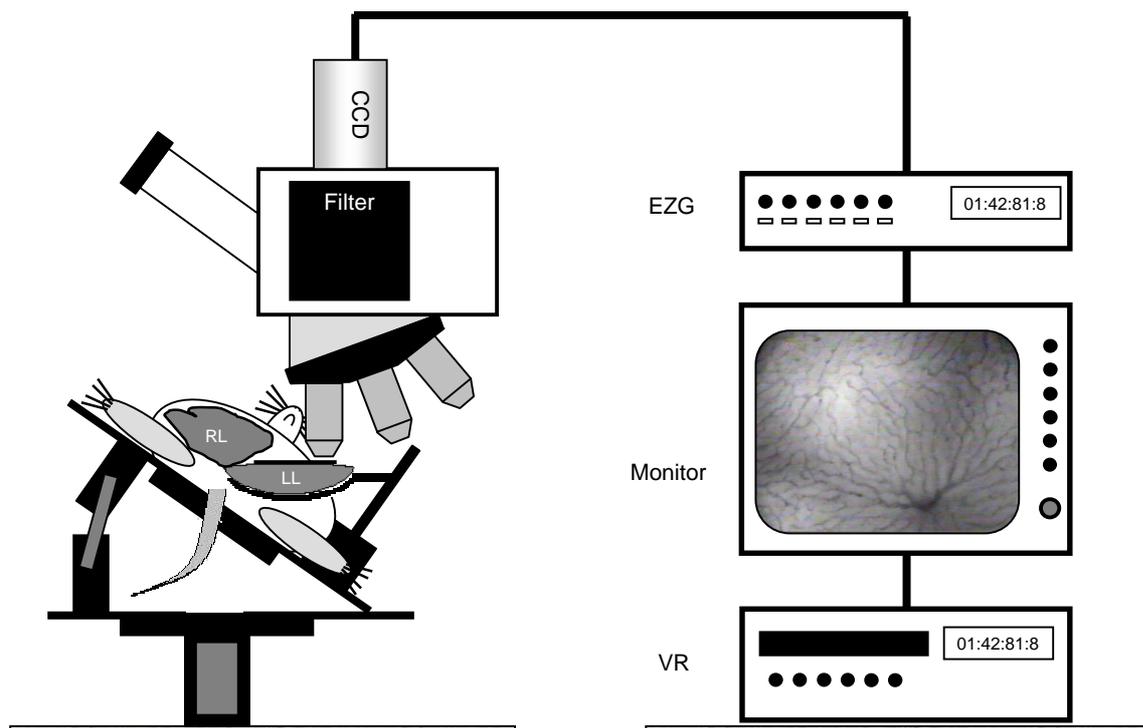


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Die Versuchsanordnung umfasst ein Mikroskop mit CCD-Kamera, unter das der linke Leberlappen ausgelagert ist. Die Kamera ist über einen Echtzeitgenerator an einen Monitor mit Videorecorder angeschlossen; RL = rechter Leberlappen, CCD = CCD-Videokamera, EZG = Einzelzeitgenerator, VR = S-VHS-Videorecorder.

5.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Die quantitative Analyse der intravitale Fluoreszenzmikroskopie erfolgte nach Abschluss der Versuche „off-line“ an einer computergestützten Auswerteeinheit (Cap Image, Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Zur Abgrenzung der aufgezeichneten Lobuli dienten optimierte Schablonen, innerhalb derer folgende mikrozirkulatorische Parameter analysiert wurden: sinusoidaler Perfusionsausfall sowie Blutzell-Fließgeschwindigkeit in post-sinusoidalen Venulen. Des Weiteren wurden die Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen, die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und die Anzahl hepatozelluläre Apoptosen analysiert.

5.3.3.1 Sinusoidales Perfusionsversagen

Der Ausfall der sinusoidalen Perfusion wurde im Blaulichtfilter innerhalb der midzonalen Zone von 12 Lobuli bestimmt. Innerhalb dieser Zone wurde die Anzahl der nicht-perfundierten Sinusoide gezählt und mit der Anzahl aller sichtbaren Sinusoide ins Verhältnis gesetzt. Der Ausfall der Perfusion wurde als Anteil nicht-perfundierter Sinusoide in % aller sichtbaren Sinusoide angegeben (Abb. 2A).

5.3.3.2 Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit

Die Bestimmung der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit erfolgte computergestützt. Hierzu wurde mithilfe der line-shift Software (cap image) eine virtuelle Linie von 100 µm innerhalb einer Venule gelegt. Innerhalb eines Zeitraumes von 10 Sekunden wurde durch die Software die Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten entlang dieser Linie in mm/s erfasst und wiedergegeben.

5.3.3.3 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Quantifizierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfolgte in 12 Lobuli innerhalb der auf den Bildschirm aufgelegten Schablonen. Es wurde die Anzahl stagnierender Leukozyten erfasst, definiert als intrasinusoidal liegende Leukozyten, die sich über eine Beobachtungszeit von 30 Sekunden nicht bewegten. Die sinusoidale Leukozyten-Stase gibt die

Anzahl stagnerender Leukozyten innerhalb der periportalen, midzonalen und perizentralen Zonen des Lobulus wieder (Abb. 2B).

Des Weiteren wurden die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in sieben postsinusalen Venulen gezählt. Über einem definierten Gefäßabschnitt (L) von 100 µm wurde jeweils die Anzahl adhärenter Leukozyten ausgezählt. Diese waren definiert als intravasal liegende Leukozyten die sich während einer Beobachtungszeit von mindestens 30 Sekunden nicht bewegten. Die venuläre Leukozyten-Adhärenz wurde als Anzahl adhärenter Zellen pro mm² Endotheloberfläche (A) gemäß der Formel:

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

mit D als Durchmesser, der computergestützt bestimmt wurde, des untersuchten Gefäßsegments errechnet.

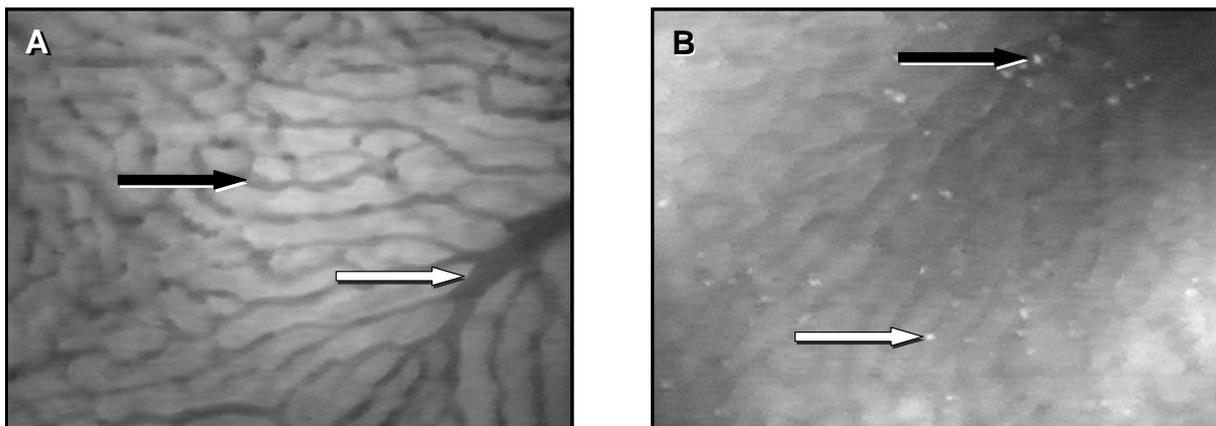


Abbildung 2: (A) Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der hepatischen Mikrozirkulation. Darstellung mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (x465-fache Vergrößerung). Nach Kontrastverstärkung mit Natrium-Fluoreszein stellt sich die Lebermikrozirkulation in Form hexagonaler Leberlobuli dar. Der Blutfluss erfolgt vom Periportalfeld durch die Sinusoide (schwarzer Pfeil) in die Zentralvenule (weißer Pfeil). (B) Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Leberoberfläche mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (x465-fache Vergrößerung) nach Injektion von Rhodamin 6G. Es stellen sich gefärbte Leukozyten in Sinusoiden (weißer Pfeil) und post-sinusoidalen Venulen (schwarzer Pfeil) dar.

5.3.3.4 Hepatozelluläre Apoptose

Am Ende des Versuchs wurde den Versuchstieren intravenös Bisbenzimid (H33342, 2 µmol/kg KG, Sigma, Deutschland) injiziert und sieben Lobuli pro Tier im UV-Filter aufgezeichnet. Apoptosen imponierten als hell leuchtende Zellkerne, und zeigten typische Apopto-

se-assoziierte morphologische Kernveränderungen. Innerhalb der drei Zonen wurde die Anzahl der Apoptosen pro Lobulus analysiert (Abb. 3A).

5.3.3.5 Kupferzell-Phagozytose-Aktivität

Die Kupferzell-Phagozytose-Aktivität wurde anhand der Elimination der Latexpartikel in jeweils für zehn Sekunden aufgezeichneten Gesichtsfeldern zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten nach der Injektion ausgewertet, indem pro Gesichtsfeld die Zahl der sich in den Sinusoiden frei fließenden Latexpartikel gezählt wurde. Der Anteil der frei fließenden Partikel wurde in Prozent der Gesamtzahl der im jeweiligen Gesichtsfeld sichtbaren Partikel pro Beobachtungszeitpunkt angegeben. Die Verwendung dieser Technik erlaubte die Quantifizierung der Phagozytoseaktivität der Kupferzellen (Abb. 3B).

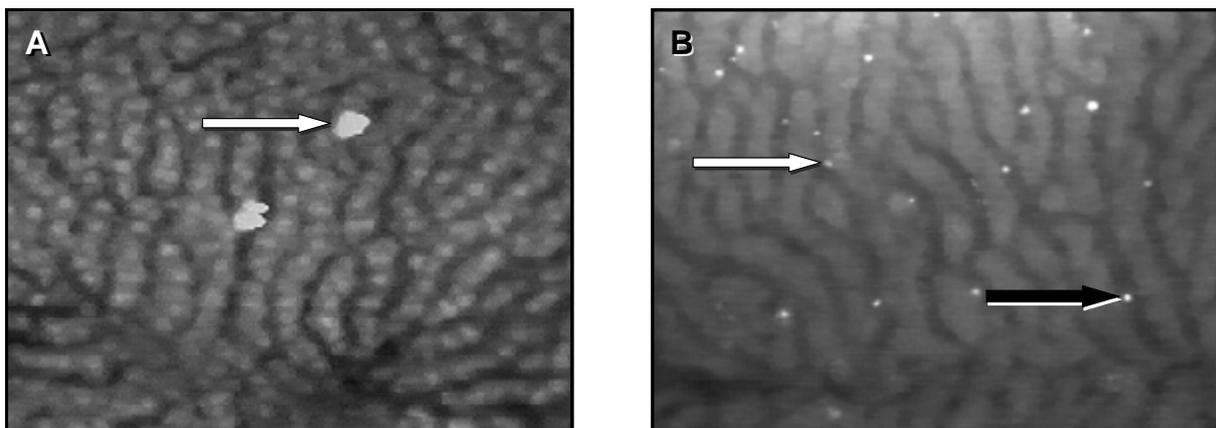


Abbildung 3: (A) Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Leberoberfläche mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (x465-fache Vergrößerung) nach Injektion von Bisbenzimid. Es stellen sich die Kerne von Hepatozyten dar. Man achte auf die Kerne apoptotisch veränderter Hepatozyten (weißer Pfeil). (B) Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Leberoberfläche mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (x465-fache Vergrößerung) nach Injektion der Latexpartikel. Darstellung frei fließender Latexpartikel in den Sinusoiden (schwarzer Pfeil) und adhärenter Latexpartikel (weißer Pfeil.)

5.3.4 Hepatozelluläre Exkretionsfunktion

Zur Beurteilung der hepatozellulären Exkretionsfunktion wurde der Gallefluss bestimmt, welcher als sicherer Parameter zur Beurteilung des Ausmaßes einer ischämischen Leberfunktionsstörung gilt [BOWERS et al., 1987].

Die Galle wurde über den Katheter im *Ductus choledochus* kontinuierlich in eine 1 ml Spritze abgeleitet und gewogen. Es wurde ein spezifisches Gewicht von 1 g/ml angenommen [SUMIMOTO et al., 1988]. Der Gallefluss wurde unter Ausgangsbedingungen (30 Minuten), während Ischämie (90 Minuten) und Reperfusion (nach 30 und nach 90 Minuten) gemessen. Nach Bestimmung des Leberfeuchtgewichtes am Ende der Untersuchungen wurde die Galleexkretion pro Gramm Lebergewicht und Zeiteinheit kalkuliert (Einheit: $\mu\text{l}/\text{min} \times \text{g}$).

5.3.5 Vollblut-Analytik

Nach Abschluß des Versuchs nach 90-minütiger Reperfusion wurden die Tiere durch Exsanguination getötet. Das entnommene Vollblut diente zum einen Teil zur sofortigen Durchführung der arteriellen Blutgasanalyse und der Erstellung eines Blutbildes, zum anderen Teil wurde es zur Serumgewinnung drei Minuten bei 3000 Umdrehungen/min und 21 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorfpipetten abpipettiert und bis zum Tag der Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

5.3.5.1 Arterielle Blutgase und Zellzahl

Im Rahmen der arteriellen Blutgasanalyse (BGA) wurde mit Hilfe eines Blood Gas Analyser Model 348 ph (Chiron Diagnostics, Malstead Essex, England) pH-Wert, Kohlendioxidpartialdruck (PaCO_2), Sauerstoffpartialdruck (PaO_2), Standardbicarbonat (HCO_3^-) und Sauerstoffsättigung (O_2 -Sätt.) sowie der Basenüberschuss (base excess, BE) und Hämatokrit (Hkt) gemessen. Die Analyse des Blutbildes mit systemischer Leukozyten- und Thrombozytenzahl, sowie der Bestimmung des Hämoglobins erfolgte mittels Coulter Counter Act diff (Coulter Electronics LTD., Luton Beds, England).

5.3.5.2 Serumkonzentration leberspezifischer Enzyme und Zytokine

Zur Messung der leberspezifischen Enzyme ALT, AST, LDH und GLDH, die als Marker der Leberzellschädigung in Erscheinung treten, wurde im asservierten Serum die Serumkonzentrationen spektrophotometrisch bestimmt.

Zudem erfolgte die Analyse der Serumkonzentrationen von Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin(IL)-6 und Interleukin(IL)-10 mittels ELISA-Assay (R und D Systems, Wiesbaden, Deutschland).

5.3.6 Gewebeasservierung

Zu Versuchsende wurde die gesamte Leber mit einem sterilen Operationsbesteck explantiert. Nach Ermittlung des Feuchtgewichtes mit einer Feinwaage erfolgte die Entnahme zweier Gewebeproben aus dem linken Leberlappen. Eine Probe wurde für zwei bis drei Tage in 4%iger Formalinlösung fixiert, die zweite Probe wurde in einem Einbettmedium (tissue tech, Jung tissue freezing medium for frozen tissue, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren um eine spätere histologische Untersuchung zu ermöglichen. Der Rest des linken Leberlappens wurde zur späteren proteinbiochemischen Analyse in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

5.3.7. Lichtmikroskopie

Aus dem in 4%iger Formalinlösung fixierten Lebergewebe wurden nach dessen Einbettung in Paraffin, 5 μm dicke Schnitte hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) zur histomorphologischen Analyse des I/R-induzierten Leberschadens untersucht. Zur Quantifizierung infiltrierter neutrophiler Granulozyten wurden Gewebeschnitte mit AS-D Chlorazetateterase (CAE) gefärbt. Diese Histologiepräparate wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Olympus BX 60F, Olympus opticalCO. LTD., Japan) unter Verwendung eines x40-Objektivs (Olympus UplanFI, ∞ /0,17, Japan; x400-fache Vergrößerung) ausgewertet.

5.3.7.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

In 25 HPF pro Gewebsschnitt wurde der I/R-induzierte Leberschaden anhand der Parameter Kongestion, Vakuolisierung und Grobscholligkeit quantitativ analysiert (Abb. 4A). Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Suzuki-Scores (Tab. 1) und wird in arbiträren Einheiten (aE) angegeben [SUZUKI et al., 1993].

Vakuolisierung		Grobscholligkeit		Kongestion	
0	0%	0	keine	0	keine
1	0-10 %	1	gering	1	gering
2	10-30 %	2	moderat	2	moderat
3	30-50 %	3	stark	3	stark
4	> 50 %				

Tabelle 1: Suzuki-Scoresystem für die semiquantitative histomorphologische Analyse des Leberschadens.

5.3.7.2 Chlorazetatesterase Färbung

In 25 HPF wurde die Anzahl eingewanderter Leukozyten analysiert (Abb. 4B). Diese wurden anhand positiver Färbung und Morphologie identifiziert und in n/Gesichtsfeld angegeben.

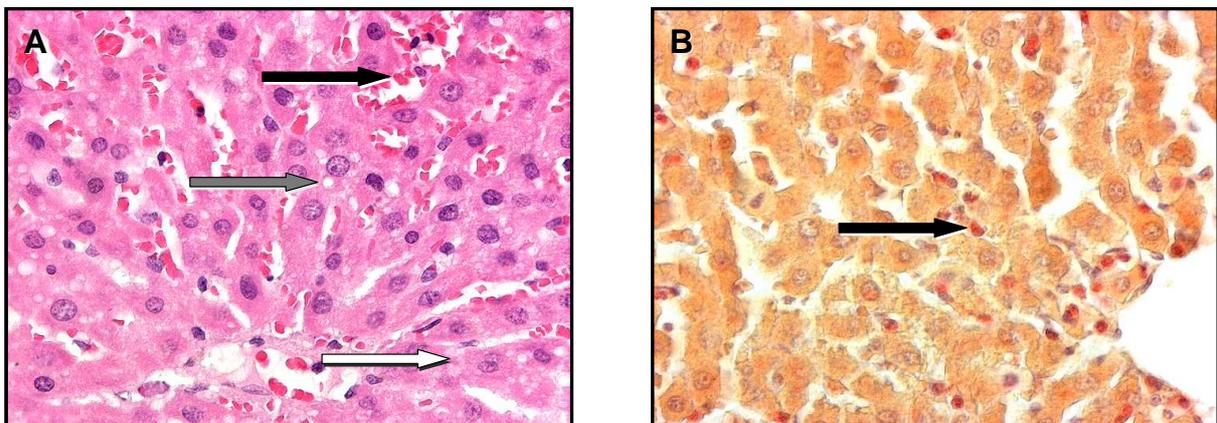


Abbildung 4: (A) Repräsentativer HE-Schnitt einer Kontroll-Leber nach I/R. Man beachte die ausgeprägte Vakuolisierung (grauer Pfeil), Kongestion (schwarzer Pfeil) und Grobscholligkeit (weißer Pfeil); 40x Objektiv (x400 fache Vergrößerung). (B) Repräsentative CAE-Färbung einer Kontroll-Leber nach I/R. Man beachte die rot angefärbten Leukozyten (schwarzer Pfeil); 40x Objektiv (x400 fache Vergrößerung).

5.3.8 Proteinbiochemische Analysen

5.3.8.1 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Quantifizierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und pSTAT-5, der Stickstoffmonoxidsynthase iNOS und der Anzahl G-CSF-Rezeptor-positiver Zellen wurden aus den nach Versuchsende asservierten und mit Gewebemedium eingefrorenen Gewebeproben Gefrierschnitte von 5 μ m Dicke hergestellt und direkt nach dem Schneiden bei 4 $^{\circ}$ C in Aceton fixiert. Nach Blockierung der endogenen Phosphatase und Peroxidase erfolgte zunächst die Inkubation mit den Primärantikörpern (pSTAT-5 1:50, NF- κ B 1:25, iNOS 1:25, G-CSF-Rezeptor 1:200 (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) (Tab.2). Darauf wurden die Proben mit dem entsprechenden Peroxidase-markierten Sekundärantikörper inkubiert. Alle Schnitte wurden anschließend mit aktiviertem Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid inkubiert. Nach Gegenfärben mit Hämalaun nach Meyer wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% Ethanol) entwässert, mit Xylol entparaffiniert und eingedeckt.

Mit einem Olympus BX 60 Lichtmikroskop wurden je Versuchstier ein Gewebsschnitt pro Färbung analysiert. Dabei erfolgte die Auswertung anhand 25 Gesichtsfelder bei einer x400-fachen Vergrößerung. Es wurden alle pSTAT-5 und NF- κ B positiven Zellen in jedem Gesichtsfeld gezählt (Abb. 5A und 5B). Die Expression des G-CSF-Rezeptors und der iNOS wurden mittels eines Scores semiquantitativ ausgewertet.

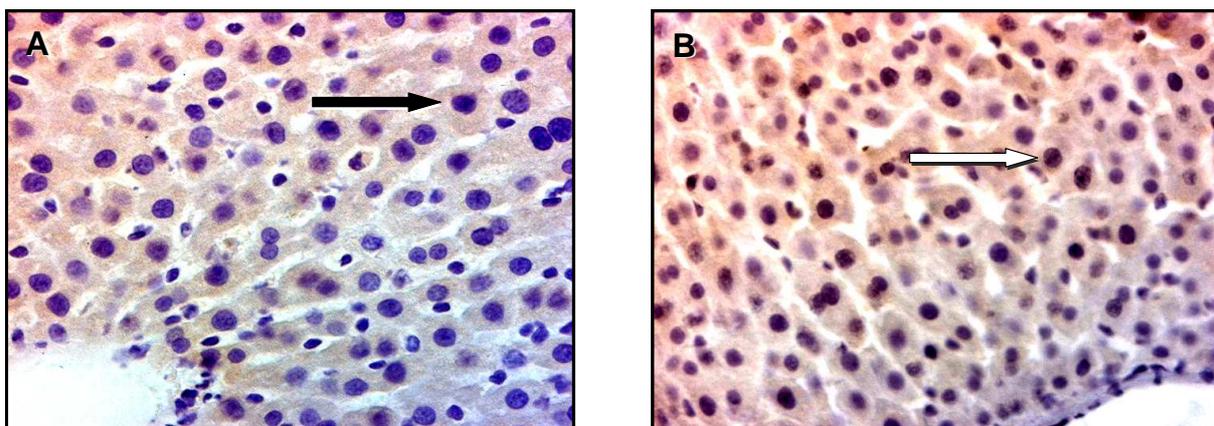


Abbildung 5: (A) Repräsentativer Schnitt einer Kontroll-Leber nach I/R und Färbung iNOS-exprimierender Leberzellen. Man beachte die iNOS-exprimierenden Hepatozyten (schwarzer Pfeil); 40x Objektiv (x400 fache Vergrößerung). (B) Repräsentativer Schnitt einer Kontroll-Leber nach I/R und Färbung NF- κ B-positiver Zellkerne. Man beachte die NF- κ B-positiven Zellkerne der Hepatozyten (weißer Pfeil); 40x Objektiv (x400 fache Vergrößerung).

Primär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
NF-κB	rabbit	1:25	Santa Cruz	goat-anti-rabbit	1:100	Dianova
iNOS	mouse	1:25	Santa Cruz	goat-anti-mouse	1:100	Dianova
G-CSF Rezeptor	rabbit	1:200	Santa Cruz	goat-anti-rabbit	1:100	Dianova
pSTAT-5	goat	1:50	Santa Cruz	rabbit-anti-goat	1:100	Dianova

Tabelle 2: Auflistung der für die immunhistochemischen Analysen verwendeten Antikörper.

5.3.8.2 Western Blot

Von den kryokonservierten Leberproben wurden 100 bis 200 mg Gewebe mit einem Low Salt-Lysepuffer, bestehend aus 10 mM TRIS, pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Triton X 100, 0,02% NaN₃, unter Zusatz eines Proteinaseinhibitor-Cocktails (1:50; Sigma) und PSMF (1:100; Roth) mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 (IKA Labortechnik) homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann 30 Minuten bei 4 °C mit 16000 g zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, Deutschland) und der Überstand als Gesamtzell-Extrakt abpipettiert. Die so gewonnenen Aliquots wurden auf Eis gelagert und sofort zur Proteinbestimmung verwendet.

Die Konzentration der Proteinextrakte wurde spektrophotometrisch mit der Methode nach Lowry [LOWRY et al., 1951] bestimmt und durch Verdünnen mit destilliertem Wasser auf den gleichen Proteingehalt eingestellt. Die eingestellten Extrakte wurden nach Zusatz von 2x „Sample buffer“ nach Lämmli (Sigma) 5 Minuten im kochenden Wasserbad denaturiert und anschließend in einer Konzentration von 60 µg/Bande in die Geltaschen transferiert.

Die Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (Sammegel 5%, Trenngel 10%) elektrophoretisch bei einer konstanten Spannung von 100 V im Sammelgel (15 Minuten) und von 140 V im Trenngel (1 Stunde) nach ihrem Molekulargewicht ge-

trennt. Als Molekulargewichts-Standard diente der Rainbow high range Marker (Amersham). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in einem Transferpuffer-Bad für das anschließende Membran-Blotting equilibriert. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend während einer Dauer von 2 Stunden in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad) bei einer angelegten Spannung von 50 V auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2 μm , BioRad) transferiert.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen mit einer 5%-igen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry Milk, BioRad) in TBS-T für 30 Minuten inkubiert. Nach Waschen mit TBS-T wurden die Membranen mit den entsprechenden Primär-Antikörper für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 3).

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

Zur Kontrolle der Protein-Beladung und des –Transfers wurde ein monoklonaler β -Aktin-Antikörper als interner Standard eingesetzt. In sämtlichen Western Blot-Analysen wurde die densitometrisch ermittelte Dichte rechnerisch auf die entsprechende β -Aktinkonzentrationen korrigiert. Die Analyse der Röntgenfilme erfolgte mit einem Gel-Dokumentationssystem (Geldoc) und einem Quantifizierungsprogramm (Quantity One – Geldoc, BioRad).

Primär-Antikörper	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
β-Aktin	mouse	1:20000	Sigma	sheep-anti-mouse-IgG-POD	1:10000	Amersham
cleaved Caspase-3	rabbit	1:500	Cell Signaling	donkey - anti-rabbit-IgG-POD	1:5000	Amersham
HO-1	rabbit	1:500	Stress Gene	donkey-anti-rabbit-IgG-POD	1:5000	Amersham
NF-κB	rabbit	1:250	Santa Cruz	donkey-anti-rabbit-IgG-POD	1:5000	Amersham
pSTAT-5	goat	1:500	Santa Cruz	rabbit-anti-goat-IgG-POD	1:2000	DIANO

Tabelle 3: Auflistung der für die Western Blot-Analysen verwendeten Antikörper.

5.4 Experimentelles Protokoll

Ziel dieser Untersuchungen war die Analyse des Einflusses von G-CSF beziehungsweise Nitrogen Mustard auf den mikrovaskulären und parenchymatösen Reperfusionsschaden der Leber.

Hierzu erfolgte bei insgesamt 44 Tieren die Anästhesie und chirurgische Präparation wie unter 5.2.1 beschrieben. Nach 15-minütiger Stabilisierungsphase, die der Gewährleistung physiologischer Kreislaufbedingungen diente, wurden die basalen Messungen durchgeführt. Diese beinhalteten die Bestimmung der systemischen Hämodynamik mit Blutdruck und Herzfrequenz und die intravitalmikroskopische Untersuchung von sinusoidalem Per-

fusionsausfall und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Mikrozirkulation des linken Leberlappens.

Ebenso wurde eine arterielle Blutentnahme zur Blutgasanalyse und Blutbildbestimmung und die Messung des Galleflusses über 30 Minuten durchgeführt.

Anschließend erfolgte die selektive Ischämie des linken Leberlappens für 90 Minuten und die darauffolgende 90-minütige Reperfusionphase. Nach 45 Minuten Ischämie und 45 Minuten Reperfusion erfolgte jeweils eine weitere Messung der Hämodynamik der Versuchstiere. Nach 90 Minuten Reperfusion wurden mit Hilfe der Intravitalmikroskopie folgende Parameter untersucht:

1. Sinusoidaler Perfusionsausfall
2. Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit
3. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
4. Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität
5. hepatozelluläre Apoptose

Der Gallefluss wurde von Reperfusionbeginn über einen Zeitraum von 30 Minuten und dann wiederum bis zum Ende des Versuchs während 60 Minuten gemessen. Nach 90-minütiger Reperfusion erfolgte die letzte arterielle Blutentnahme, die Tötung des Tieres durch Entbluten und die Entnahme der Leber wie unter 5.3.5.3 beschrieben.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von G-CSF und Nitrogen Mustard auf den mikrovaskulären und funktionellen Reperfusionsschaden der Leber wurden die Tiere im Vorfeld eines jeden Versuchs verschiedenen Gruppen zugeordnet:

sham:

7 Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen; es wurden intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Vollblutanalysen zu den oben genannten Zeitpunkten durchgeführt.

I/R und NaCl:

8 Tieren wurde der linke Leberlappen einer 90-minütigen Ischämie sowie einer 90-minütigen Reperfusion unterzogen. Intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Vollblutanalysen erfolgten zu den oben genannten Zeitpunkten.

I/R und G-CSF 16 h vor Ischämie:

6 Tiere wurden 16 h vor Beginn der Ischämie mit einer einmaligen subcutanen Injektion G-CSF (50 µg/kg KG) vorbehandelt. Der linke Leberlappen wurde einer 90-minütigen Ischämie sowie einer 90-minütiger Reperfusion unterzogen. Intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Vollblutanalysen erfolgten zu den oben genannten Zeitpunkten.

I/R und G-CSF 1 h vor Ischämie:

Die Vorbehandlung von 8 Tieren mit G-CSF (50 µg/kg KG) erfolgte 1 h vor Beginn der Ischämie. Der linke Leberlappen wurde einer 90-minütigen Ischämie sowie einer 90-minütiger Reperfusion unterzogen. Intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Vollblutanalysen erfolgten zu den oben genannten Zeitpunkten.

I/R und G-CSF 1 h vor Reperfusion:

Die Vorbehandlung mit G-CSF (50 µg/kg KG) erfolgte 1 h vor Reperfusion des linken Leberlappens; n=6. Der linke Leberlappen wurde einer 90-minütigen Ischämie sowie einer 90-minütiger Reperfusion unterzogen. Intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Vollblutanalysen erfolgten zu den oben genannten Zeitpunkten.

I/R und Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie:

In dieser Gruppe mit 9 Tieren wurde nach Präparation wie unter 5.2.4 beschrieben die Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard (1,75 mg/kg KG i.v.) 48 Stunden vor Beginn der Ischämie durchgeführt. Der linke Leberlappen wurde einer 90-minütigen Ischämie sowie einer 90-minütiger Reperfusion unterzogen. Intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen und Vollblutanalysen erfolgten zu den oben genannten Zeitpunkten.

5.5 Datenerfassung und Statistik

Die primäre Datenerfassung erfolgte während der Auswertung der Videobänder auf Erhebungsbögen. Die so gewonnenen Daten wurden in einem zweiten Schritt in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Corporation) zur elektronischen Datenverarbeitung eingegeben. Die statistische und graphische Auswertung erfolgte unter der Verwendung der Programme SigmaStat und SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Sämtliche Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (Mittelwert \pm SEM) angegeben.

Für den paarweisen Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen wurde im Falle normal verteilter Werte und bei Varianzgleichheit der Student's t-Test für unverbundene Stichproben verwendet, ansonsten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant betrachtet.

6 Ergebnisse

6.1 Makro- und Mikrohämodynamik

6.1.1 Blutbild

Die Analyse der Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen im peripheren Blut zu Beginn der Versuche und nach 90 min Ischämie / 90 min Reperfusion zeigten keine signifikanten Unterschiede in der NaCl- und sham-Gruppe. Der Hämatokritwert beider Gruppen wies keine signifikanten Unterschiede auf. Zum Zeitpunkt der Basalmessung war der Hb der NaCl-Gruppe signifikant höher als der Hb der sham-Gruppe, fiel jedoch zum Zeitpunkt der zweiten Messung auf Werte der sham-Gruppe ab (Tab. 4).

In der Gruppe mit G-CSF Vorbehandlung 16 h vor Ischämie zeigte sich eine signifikant erhöhte Leukozytenzahl und signifikant reduzierte Thrombozytenzahl zum Zeitpunkt der Anfangsmessung. Nach I/R ergab die Analyse beider Parameter keine signifikanten Unterschiede. Die Injektion von G-CSF 1 h vor Ischämie hatte keine signifikanten Veränderungen des Blutbildes zu Folge. Die mit G-CSF 1 h vor Reperfusion behandelten Tiere zeigten eine signifikante Reduktion der Erythrozytenzahl, des Hämoglobins und des Hämatokrits und Steigerung der Leukozytenzahl im Vergleich zur NaCl-Gruppe unter Ausgangsbedingungen. Nach I/R war eine signifikante Steigerung der Leukozytenzahl am Ende der Reperfusion zu verzeichnen.

Die Injektion von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie führte zu beiden Messzeitpunkten zur signifikanten Depletion der Leukozyten und zur Senkung des Hämatokritwertes bei Versuchsende.

	baseline	Reperfusion
<i>Leukozytenzahl [x10³/μl]</i>		
sham	5,44 ± 0,81	5,49 ± 0,82
I/R & NaCl	5,46 ± 0,43	5,57 ± 1,03
I/R & G-CSF 16 h vor I	13,74 ± 2,02*	8,86 ± 1,44
I/R & G-CSF 1 h vor I	4,92 ± 0,27	6,70 ± 0,74
I/R & G-CSF 1 h vor R	7,12 ± 0,50*	9,98 ± 1,14*
I/R & NM 48 h vor I	0,93 ± 0,14*	0,48 ± 0,12*

Thrombozytenzahl [$\times 10^9/\mu\text{l}$]

sham	892,4 \pm 61,1	640,4 \pm 157,2
I/R & NaCl	1034,6 \pm 56,5	728,6 \pm 113,9
I/R & G-CSF 16 h vor I	830,1 \pm 57,9*	734,8 \pm 74,8
I/R & G-CSF 1 h vor I	916,5 \pm 32,9	820,0 \pm 44,0
I/R & G-CSF 1 h vor R	882,2 \pm 56,1	762,1 \pm 69,1
I/R & NM 48 h vor I	944,7 \pm 28,5	638,0 \pm 66,6

Erythrozytenzahl [$\times 10^6/\mu\text{l}$]

sham	7,29 \pm 0,20	7,28 \pm 0,40
I/R & NaCl	7,75 \pm 0,12	6,77 \pm 1,02
I/R & G-CSF 16 h vor I	7,66 \pm 0,51	7,53 \pm 0,43
I/R & G-CSF 1 h vor I	8,10 \pm 0,13	7,78 \pm 0,20
I/R & G-CSF 1 h vor R	7,07 \pm 0,10*	7,52 \pm 0,20
I/R & NM 48 h vor I	7,42 \pm 0,17	6,67 \pm 0,23

Hämatokrit [%]

sham	38 \pm 2	33 \pm 3
I/R & NaCl	37 \pm 3	35 \pm 3
I/R & G-CSF 16 h vor I	36 \pm 3	30 \pm 3
I/R & G-CSF 1 h vor I	35 \pm 2	32 \pm 2
I/R & G-CSF 1 h vor R	32 \pm 1*	33 \pm 2
I/R & NM 48 h vor I	35 \pm 1	27 \pm 2*

Hämoglobin [g/dl]

sham	13,4 \pm 0,5	13,4 \pm 0,9
I/R & NaCl	14,7 \pm 0,2 [#]	12,9 \pm 1,9
I/R & G-CSF 16 h vor I	15,0 \pm 1,0	14,8 \pm 0,9
I/R & G-CSF 1 h vor I	15,4 \pm 0,3	14,7 \pm 0,5
I/R & G-CSF 1 h vor R	13,7 \pm 0,2*	14,6 \pm 0,4
I/R & NM 48 h vor I	14,2 \pm 0,4	12,4 \pm 0,5

Tabelle 4: Systemische Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahl, sowie Hämatokrit und Hämoglobin zu Versuchsbeginn (baseline), sowie nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion im peripheren Blut von Versuchstieren. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG G-CSF 16 h vor Ischämie ($n=6$), 1 h vor Ischämie ($n=8$) oder 1 h vor Reperfusion ($n=6$) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie ($n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen ($n=8$), sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen ($n=7$). Mittelwert \pm SEM, [#] $p < 0,05$ vs. sham, * $p < 0,05$ vs. I/R & NaCl.

6.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz

Zu Ausgangsbedingungen sowie während 90 Minuten Ischämie waren mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz in ischämischen Kontrolltieren im Vergleich zu sham-Tieren unverändert. Nach 90 Minuten Reperfusion hingegen war ein geringerer Blutdruck und eine niedrigere Herzfrequenz der NaCl-behandelten Tiere festzustellen (Tab. 5).

G-CSF 16 h vor Ischämie führte zu einer weiteren Blutdruckabsenkung und Herzfrequenzsteigerung nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu ischämischen Kontrolltieren. Die Gabe von G-CSF 1 h vor Ischämie hatte eine weitere Reduktion des arteriellen Mitteldrucks und eine Steigerung der Herzfrequenz nach 90 Minuten Ischämie und die Herzfrequenzsteigerung nach 90 Minuten Reperfusion zur Folge. Der Blutdruck fand sich insbesondere nach Reperfusion erhöht.

Die Applikation von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie hatte eine Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks nach Ischämie und eine Steigerung der Herzfrequenz nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu NaCl-Kontrolltieren zur Folge.

	baseline	Ischämie	Reperfusion
<i>mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]</i>			
sham	101 ± 4	131 ± 4	134 ± 4
I/R & NaCl	101 ± 5	132 ± 14	109 ± 9 [#]
I/R & G-CSF 16 h vor I	97 ± 8	123 ± 6	91 ± 18
I/R & G-CSF 1 h vor I	92 ± 5	120 ± 5	116 ± 3
I/R & G-CSF 1 h vor R	107 ± 6	119 ± 4	134 ± 4 [*]
I/R & NM 48 h vor I	107 ± 3	118 ± 5	115 ± 8
<i>Herzfrequenz [min⁻¹]</i>			
sham	271 ± 17	310 ± 4	323 ± 4
I/R & NaCl	267 ± 9	303 ± 9	296 ± 14
I/R & G-CSF 16 h vor I	268 ± 16	342 ± 14 [*]	327 ± 11
I/R & G-CSF 1 h vor I	269 ± 11	354 ± 13 [*]	340 ± 18
I/R & G-CSF 1 h vor R	273 ± 17	292 ± 31	305 ± 24
I/R & NM 48 h vor I	281 ± 13	329 ± 13	333 ± 8 [*]

Tabelle 5: Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz zu Versuchsbeginn (baseline), sowie nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (n=6), 1 h vor Ischämie (n=8) oder 1 h vor Reperfusion (n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48h vor Ischämie (n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (n=8); sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (n=7). Mittelwert ± SEM, [#]p<0,05 vs. sham, ^{*}p<0,05 vs. I/R & NaCl.

6.1.3 Blutgasanalyse

Die Messungen des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2), des Kohlendioxidpartialdrucks (pCO_2) und des pH-Wertes ergaben einen signifikant höheren Sauerstoffpartialdruck und einen niedrigeren pH-Wert in der NaCl-Gruppe zum Zeitpunkt der basalen Messung. Sowohl in der sham- als auch in der NaCl-Gruppe war nach 90 Minuten Ischämie und 90 Minuten Reperfusion die Reduktion des pH-Wertes und eine Steigerung des Sauerstoffpartialdruckes festzustellen. In der sham-Gruppe war der Kohlendioxidpartialdruck nach Reperfusion reduziert (Tab. 6).

Die Applikation von G-CSF 16 h vor Ischämie hatte eine Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks zu Ausgangsbedingungen zur Folge und führte sowohl zu einem signifikant höheren pH-Wert als auch zu einem höheren Sauerstoff- und einem niedrigerem Kohlendioxidpartialdruck am Versuchsende. Die Gabe von G-CSF 1 h vor Ischämie und G-CSF 1 h vor Reperfusion führte zu einer signifikanten pH-Werterhöhung und Senkung des Kohlendioxidpartialdrucks zu Versuchsende. Bei den Tieren, die G-CSF 1 h vor Reperfusion erhielten, war zu Beginn der Experimente eine signifikante pH-Wert Erhöhung und ein erniedrigter Sauerstoffpartialdruck messbar. Bei der finalen Blutentnahme zeigten sich ein signifikant erhöhter pH-Wert und ein signifikant erniedrigter Kohlendioxidpartialdruck.

Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie hatte eine signifikante Steigerung des pH-Wertes und Erniedrigung des Sauerstoff-Partialdrucks in den Basalmessungen und die Senkung des Kohlendioxid-Partialdrucks zu Versuchsende zur Folge.

	baseline	Reperfusion
<i>pO₂ [mmHg]</i>		
sham	79,37 ± 4,55	113,03 ± 8,81
I/R & NaCl	96,28 ± 3,18 [#]	101,78 ± 9,33
I/R & G-CSF 16 h vor I	80,28 ± 7,87	131,10 ± 6,48*
I/R & G-CSF 1 h vor I	93,07 ± 5,38	122,36 ± 6,39
I/R & G-CSF 1 h vor R	74,65 ± 3,49*	114,85 ± 9,49
I/R & NM 48 h vor I	82,37 ± 3,11*	107,61 ± 7,15
<i>pCO₂ [mmHg]</i>		
sham	47,76 ± 2,17	29,40 ± 3,91
I/R & NaCl	47,68 ± 5,43	48,99 ± 10,61
I/R & G-CSF 16 h vor I	49,05 ± 3,61	18,86 ± 4,14*
I/R & G-CSF 1 h vor I	43,32 ± 2,52	17,95 ± 3,74*
I/R & G-CSF 1 h vor R	39,70 ± 2,19	21,35 ± 5,16*
I/R & NM 48 h vor I	44,06 ± 1,67	20,96 ± 3,89*
<i>pH-Wert</i>		
sham	7,368 ± 0,012	7,298 ± 0,044
I/R & NaCl	7,309 ± 0,015 [#]	7,251 ± 0,043
I/R & G-CSF 16 h vor I	7,289 ± 0,031	7,412 ± 0,035*
I/R & G-CSF 1 h vor I	7,273 ± 0,017	7,416 ± 0,060*
I/R & G-CSF 1 h vor R	7,369 ± 0,018*	7,452 ± 0,071*
I/R & NM 48 h vor I	7,362 ± 0,015*	7,355 ± 0,024

Tabelle 6: Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und pH-Wert zu Versuchsbeginn (baseline) sowie nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 μ g/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie ($n=6$), 1 h vor Ischämie ($n=8$) oder 1 h vor Reperfusion ($n=6$) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie ($n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen ($n=8$); sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen ($n=7$). Mittelwert \pm SEM, [#] $p < 0,05$ vs. sham, * $p < 0,05$ vs. I/R & NaCl.

6.1.4 Mikrozirkulation

6.1.4.1 Sinusoidales Perfusionsversagen

Intravitalmikroskopisch wurde nach Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Natrium-Fluoreszein das sinusoidale Perfusionsversagen quantifiziert. I/R führte zu einer signifikanten Zunahme des sinusoidalen Perfusionsversagens (Abb. 6).

Die Vorbehandlung mit G-CSF 16 h vor Ischämie führte zu einer 46 %igen Reduktion des I/R-induzierten mikrovaskulären Perfusionsversagens. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie reduzierte das sinusoidale Perfusionsversagen signifikant. Durch Injektion von

G-CSF 1 h vor Beginn der Reperfusion konnte das Perfusionsversagen sogar unter sham-Niveau reduziert werden.

Die Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie hingegen führte zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl nicht perfundierter Sinusoide.

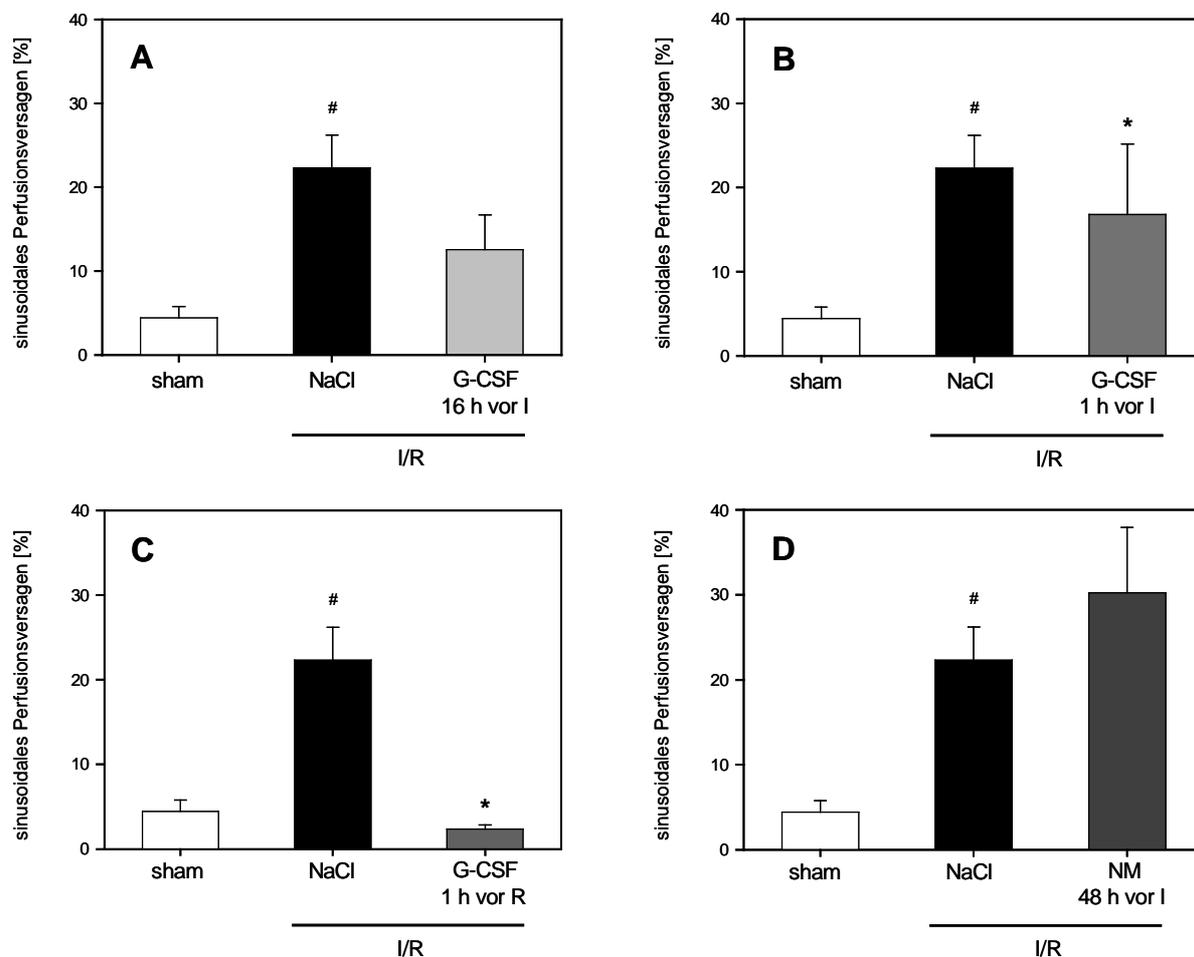


Abbildung 6: Sinusoidales Perfusionsversagen nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (**A**; graue Säule; n=6), 1 h vor Ischämie (**B**; graue Säule; n=8) und 1 h vor Reperfusion (**C**; graue Säule; n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48h vor Ischämie (**D**; graue Säule; n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, [#]p<0,05 vs. sham, ^{*}p<0,05 vs. I/R & NaCl.

6.1.4.2 Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit

I/R hatte ein signifikantes Absinken der venulären Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten zur Folge (Abb 7) das durch Vorbehandlung mit G-CSF 16 h vor Ischämie nicht verhindert werden konnte (Abb. 7A).

Ebenso hatte die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie keinen Effekt auf die I/R-induzierte Reduktion der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Reperfusion führte zu einer deutlichen Steigerung der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit um 62 % ($p= 0,058$) im Vergleich zur NaCl-Kontrolle.

Nitrogen Mustard steigerte die Fließgeschwindigkeit um circa 25 %.

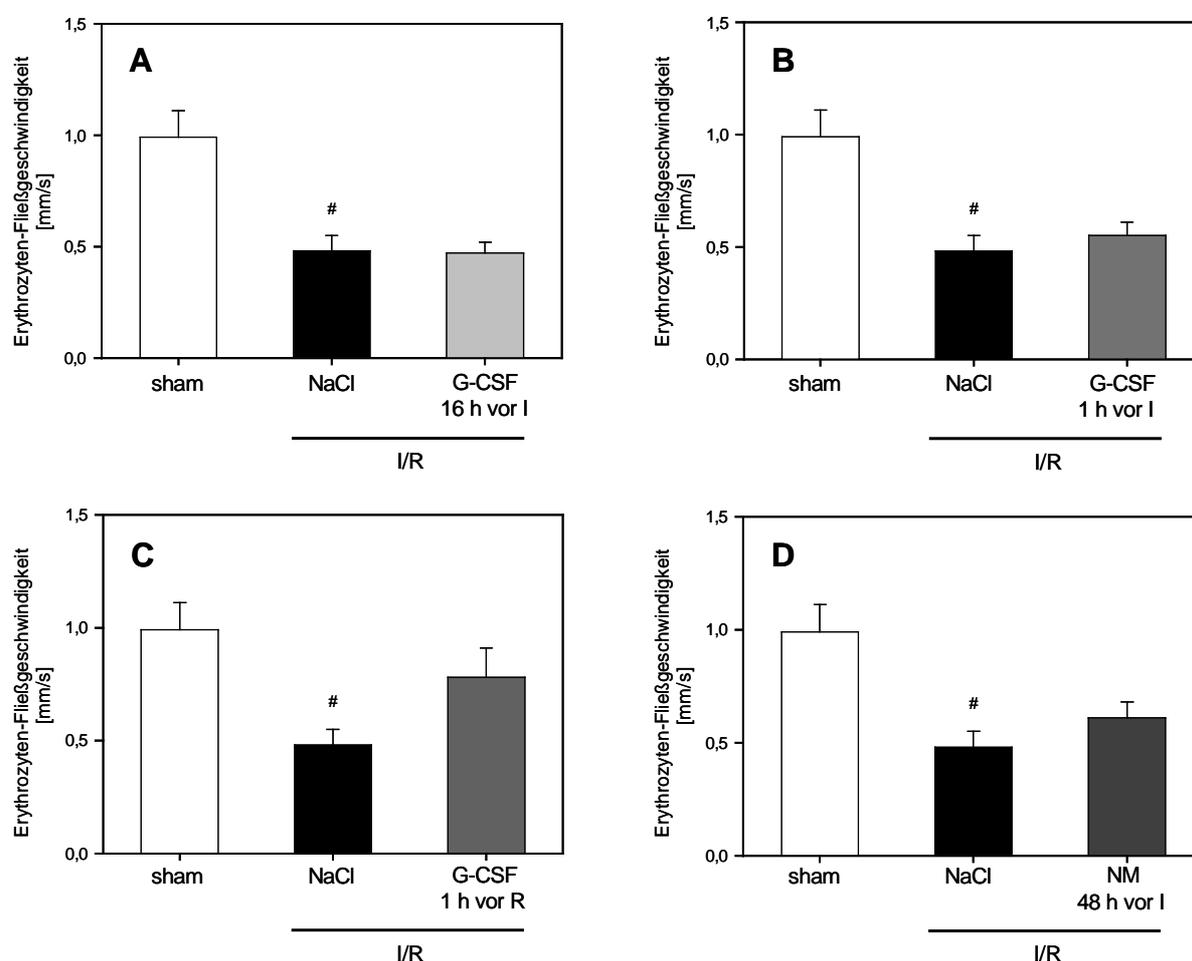


Abbildung 7: Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; $n=6$), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; $n=8$) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; $n=6$) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; $n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; $n=8$); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; $n=7$). Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ vs. sham.

6.1.4.3 Sinusoidale Leukostase

Die quantitative Analyse der sinusoidalen Leukostase nach *in vivo*-Färbung mit Rhodamin-6G zeigte eine signifikante Zunahme stagnierender Leukozyten in den Sinusoiden nach 90 Minuten Ischämie und 90 Minuten Reperfusion (Abb. 8).

G-CSF 16 h vor Ischämie steigerte die Leukostase um ~40 % ($p=0,109$). Die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie hatte keinen Effekt auf die sinusoidale Leukostase, während die Injektion von G-CSF 1 h vor Reperfusion die Akkumulation von Leukozyten in hepatischen Sinusoiden drastisch reduzierte (Abb. 8C; $p=0,035$).

Nach Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard zeigte die quantitative Analyse der sinusoidalen Leukostase erwartungsgemäß eine signifikante Reduktion der Anzahl stagnierender Leukozyten im Vergleich zu NaCl-behandelten Tieren.

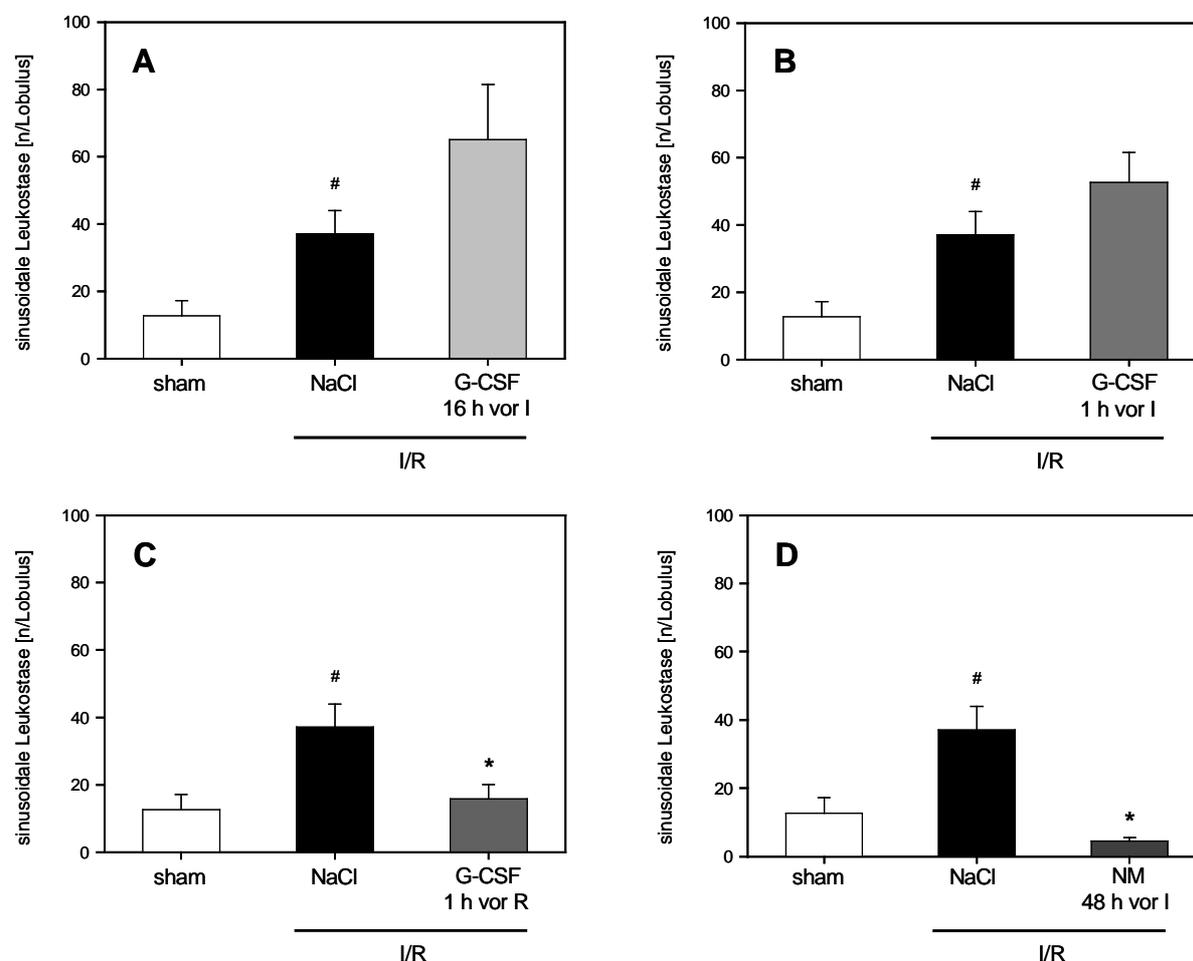


Abbildung 8: Sinusoidale Leukostase nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; $n=6$), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; $n=8$) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; $n=6$) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; $n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; $n=8$); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; $n=7$). Mittelwert \pm SEM, # $p<0,05$ vs. sham, * $p<0,05$ vs. I/R & NaCl.

6.1.4.4 Venuläre Leukozytenadhäsion

Die quantitative Analyse der Leukozytenadhäsion in post-sinusoidalen Venulen zeigte eine signifikante Zunahme der Anzahl fest adhärenter Leukozyten nach I/R (Abb. 9A; $p=0,003$).

Die Vorbehandlung mit G-CSF 16 h vor Ischämie hatte keinen Effekt auf die I/R-induzierte venuläre Leukozytenadhäsion. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie steigerte diese um 77 %. Im Gegensatz dazu führte die Injektion von G-CSF 1 h vor Reperfusion zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten-Adhäsion in den Venulen.

Die Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie führte zu einer vollständigen Aufhebung der venulären Leukozytenadhäsion.

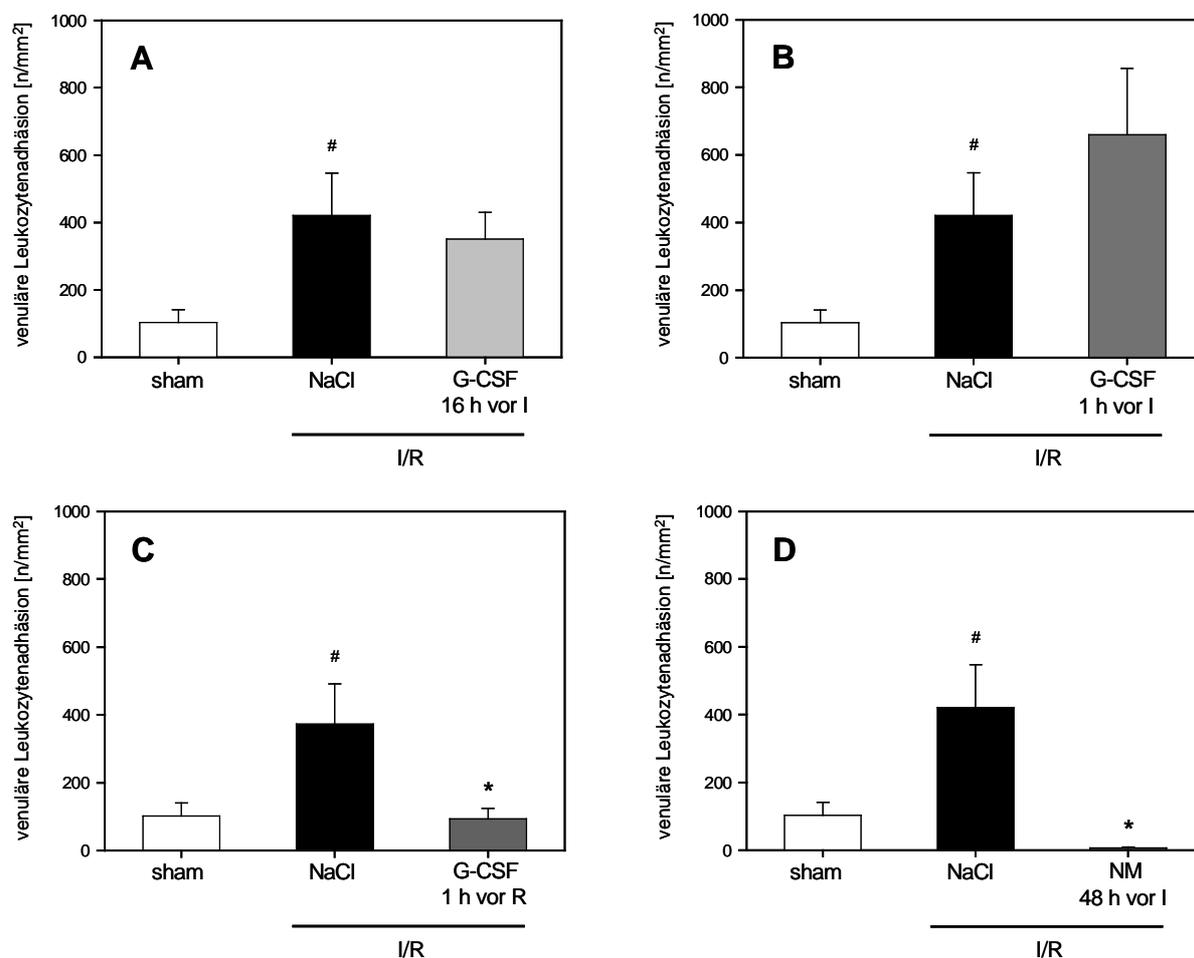


Abbildung 9: Venuläre Leukozytenadhäsion nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16h vor Ischämie (A; graue Säule; $n=6$), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; $n=8$) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; $n=6$) sowie nach mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; $n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; $n=8$); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; $n=7$). Mittelwert \pm SEM, # $p<0,05$ vs. sham, * $p<0,05$ vs. I/R & NaCl.

6.1.4.5 Hepatozelluläre Apoptose

Die Injektion des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid ermöglichte die intravital-mikroskopische Quantifizierung der hepatozellulären Apoptose. Ischämie und Reperfusion verursachten eine geringe aber nachweisbare hepatozelluläre Apoptose (Abb. 10).

Bei Versuchstieren, die mit G-CSF behandelt wurden, reduzierte sich die Anzahl der Apoptosen unabhängig vom Zeitpunkt der Applikation des Medikaments circa 40 %.

Die Gabe von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie senkte die Anzahl apoptotischer Zellen auf die Hälfte.

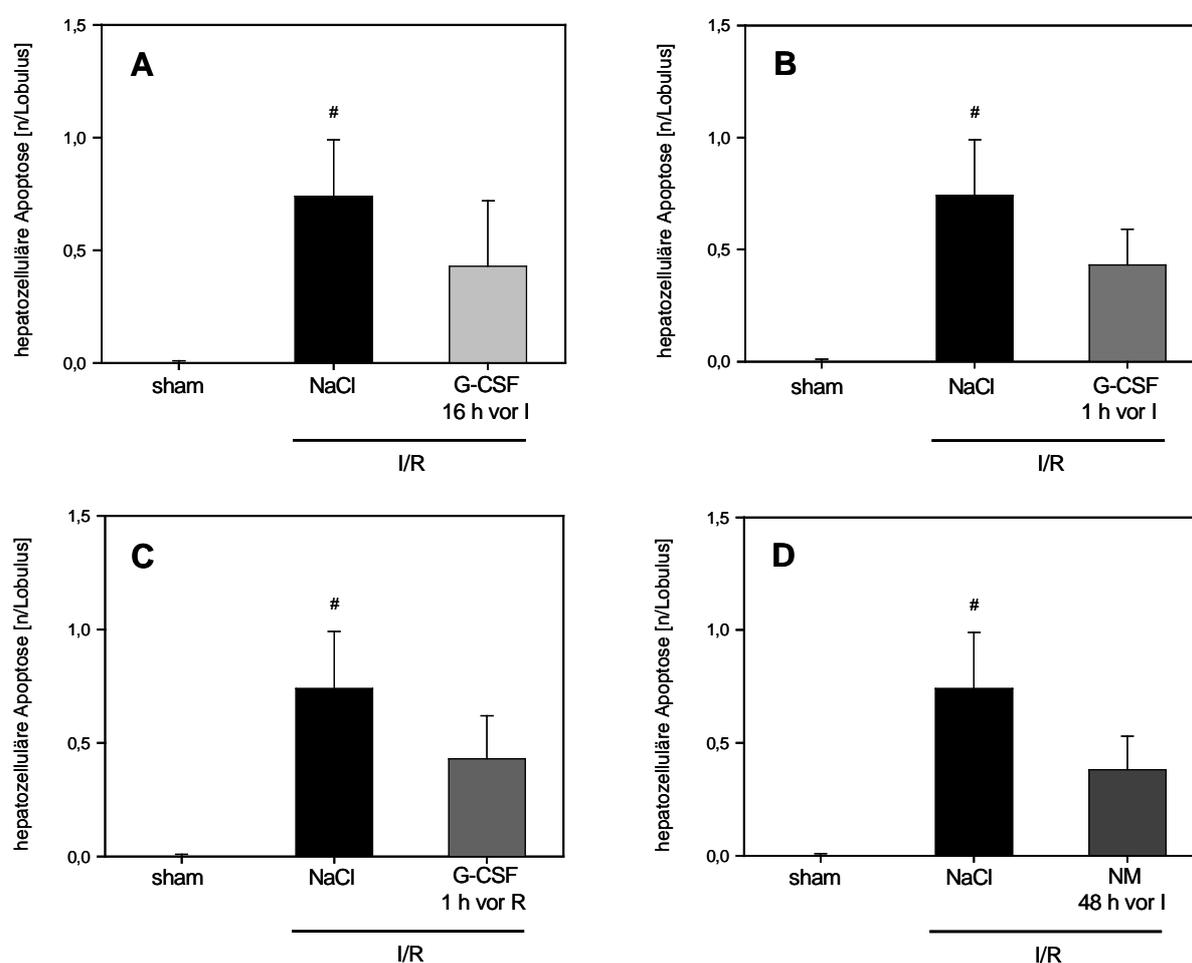


Abbildung 10: Hepatozelluläre Apoptose nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16h vor Ischämie (A; graue Säule; n=6), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; n=8) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, #p<0,05 vs. sham.

6.1.4.6 Kupfer-Zell-Phagozytose-Aktivität

Die Aktivität der Kupferzellen wurde nach intraarterieller Injektion von Latexpartikeln intravitalmikroskopisch quantifiziert. Durch die Kinetik der Elimination der Partikel aus der hepatischen Mikrozirkulation lassen sich Rückschlüsse auf die Phagozytose-Aktivität der Kupferzellen ziehen. Die Analyse der Adhärenzkinetik ergab einen exponentiellen Abfall der frei fließenden Latexpartikel in den Sinusoiden. Nach 5 Minuten waren nahezu alle Latexpartikel phagozytiert, was eine physiologische Aktivität der Kupferzellen widerspiegelt. I/R führte zu einer massiven Beeinträchtigung der Phagozytose-Aktivität, was durch 25 % frei zirkulierender Latexpartikel 5 Minuten nach Injektion reflektiert wird.

Die Vorbehandlung mit G-CSF 16 h vor Ischämie vermochte die Beeinträchtigung der Kupferzell-Phagozytose-Aktivität nach 2 Minuten signifikant zu reduzieren. Auch nach einem 5 Minuten Beobachtungsintervall war die I/R-induzierte Störung der Kupferzell-Phagozytose-Aktivität nicht signifikant vermindert (Abb. 11A).

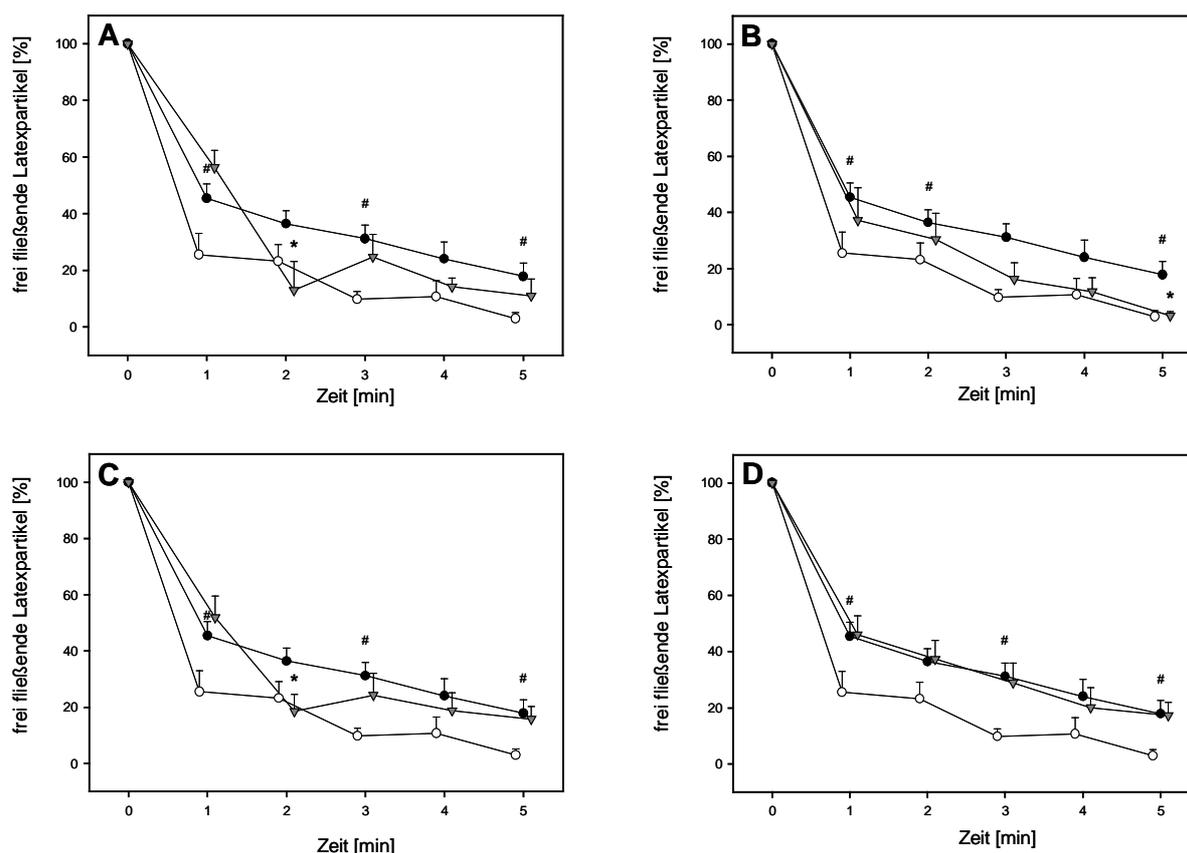


Abbildung 11: Frei fließende Latexpartikel nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graues Dreieck; $n=6$), 1h vor Ischämie (B; graues Dreieck; $n=8$) und 1 h vor Reperfusion (C; graues Dreieck; $n=6$) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graues Dreieck; $n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Kreise; $n=8$); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Kreise; $n=7$). Mittelwert \pm SEM, # $p<0,05$ vs. sham, * $p<0,05$ vs. I/R & NaCl.

Die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie führte bereits nach einer Minute zur Verbesserung der Phagozytose-Aktivität der Kupfferzellen. Nach fünf Minuten war der Anteil der frei fließenden Partikel signifikant auf Werte nahezu vergleichbar denen der sham-Gruppe gesunken (Abb. 11B). G-CSF 1 h vor Reperfusion verminderte die Anzahl frei fließender Latexpartikel nach zwei Minuten im Vergleich zu ischämischen Kontrolltieren (Abb. 11C). Im weiteren Verlauf zeigte sich keine signifikante Veränderung der Phagozytose-Aktivität der Kupfferzellen. Nach einem 5 Minuten Beobachtungsintervall war die I/R-induzierte Störung der Kupfferzell-Phagozytose-Aktivität nicht signifikant verändert.

Die Applikation von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie hatte keine Auswirkungen auf die I/R-induzierte Paralyse der Kupfferzellen (Abb. 11D).

6.2 Leberfunktion und –integrität

6.2.1 Galleexkretion

Zur Beurteilung der hepatozellulären Exkretionsfunktion diente der Gallenfluss pro Gramm Leberfeuchtgewicht und Minute. 90 Minuten Ischämie und 90 Minuten Reperfusion bewirkten eine deutliche Reduktion der Galleexkretion während der postischämischen Reperfusion ($p=0,06$) (Abb. 12).

Die Injektion von G-CSF 16 h vor Ischämie konnte die Exkretionsfunktionseinschränkung um 24 % vermindern. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie hatte keinen Einfluss auf den Gallenfluss, während die Injektion von G-CSF 1 h vor Reperfusion die Galleexkretion um 41 % im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe steigerte.

Die Leukozytendepletion mit Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie bewirkte ebenfalls eine mäßige Steigerung der hepatozellulären Exkretion.

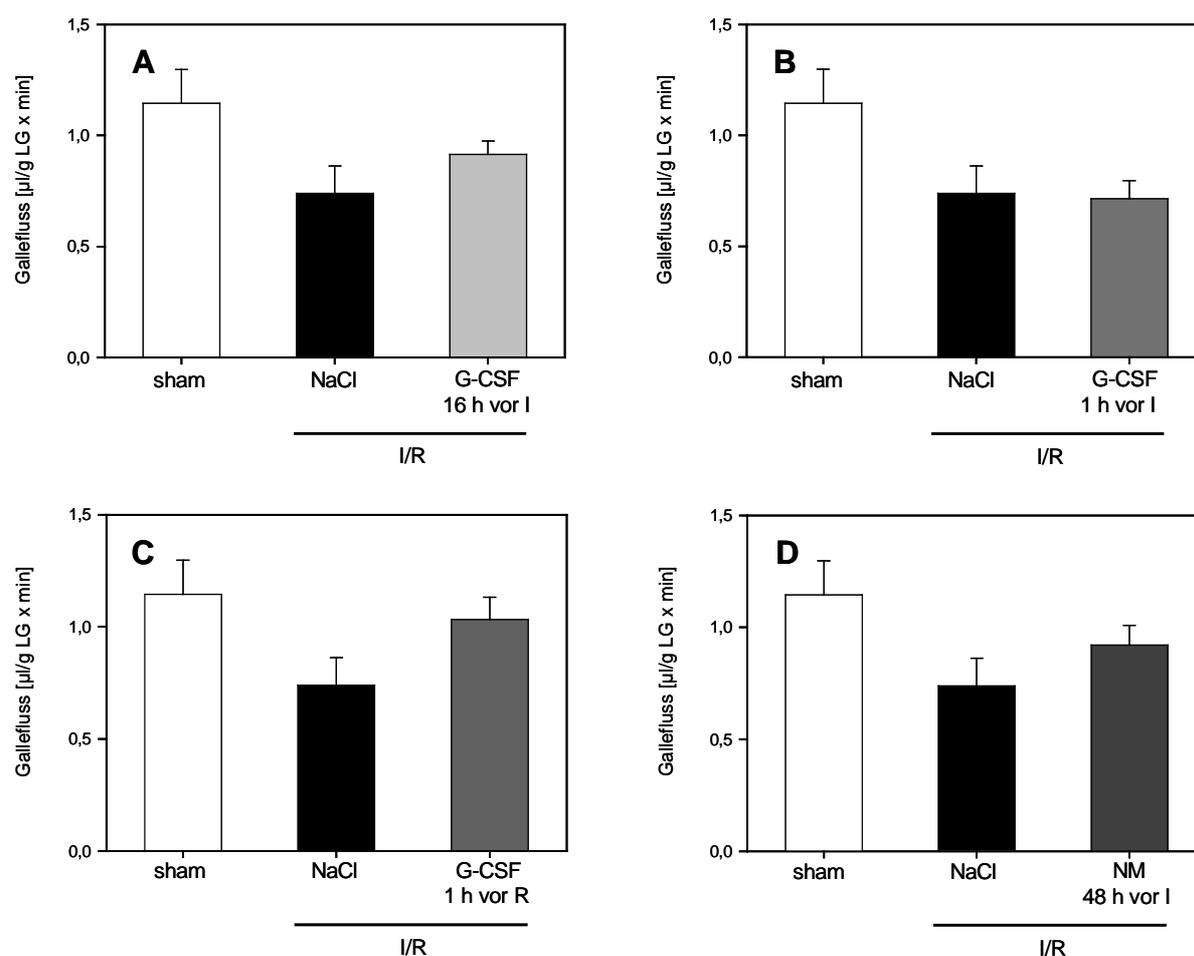


Abbildung 12: Gallefluss nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 $\mu\text{g/kg KG}$ G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; $n=6$), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; $n=8$) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; $n=6$) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; $n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; $n=8$); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; $n=7$). Mittelwert \pm SEM.

6.2.2 Plasma-Enzymaktivitäten

6.2.2.1 Alanin-Aminotransferase (ALT)

I/R führte zu einer signifikanten Erhöhung der Plasmakonzentration der Alanin-Aminotransferase (Abb. 13).

G-CSF 16 h vor Ischämie hatte keinen Einfluss auf Plasmaaktivität der ALT. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie führte zu einer drastischen Steigerung der ALT-

Aktivität im Plasma. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Reperfusion hingegen reduzierte die Enzymkonzentration signifikant um über 63 %.

Die Injektion von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie hatte eine signifikante Erhöhung der Plasma-ALT-Aktivität nach der Reperfusion zur Folge.

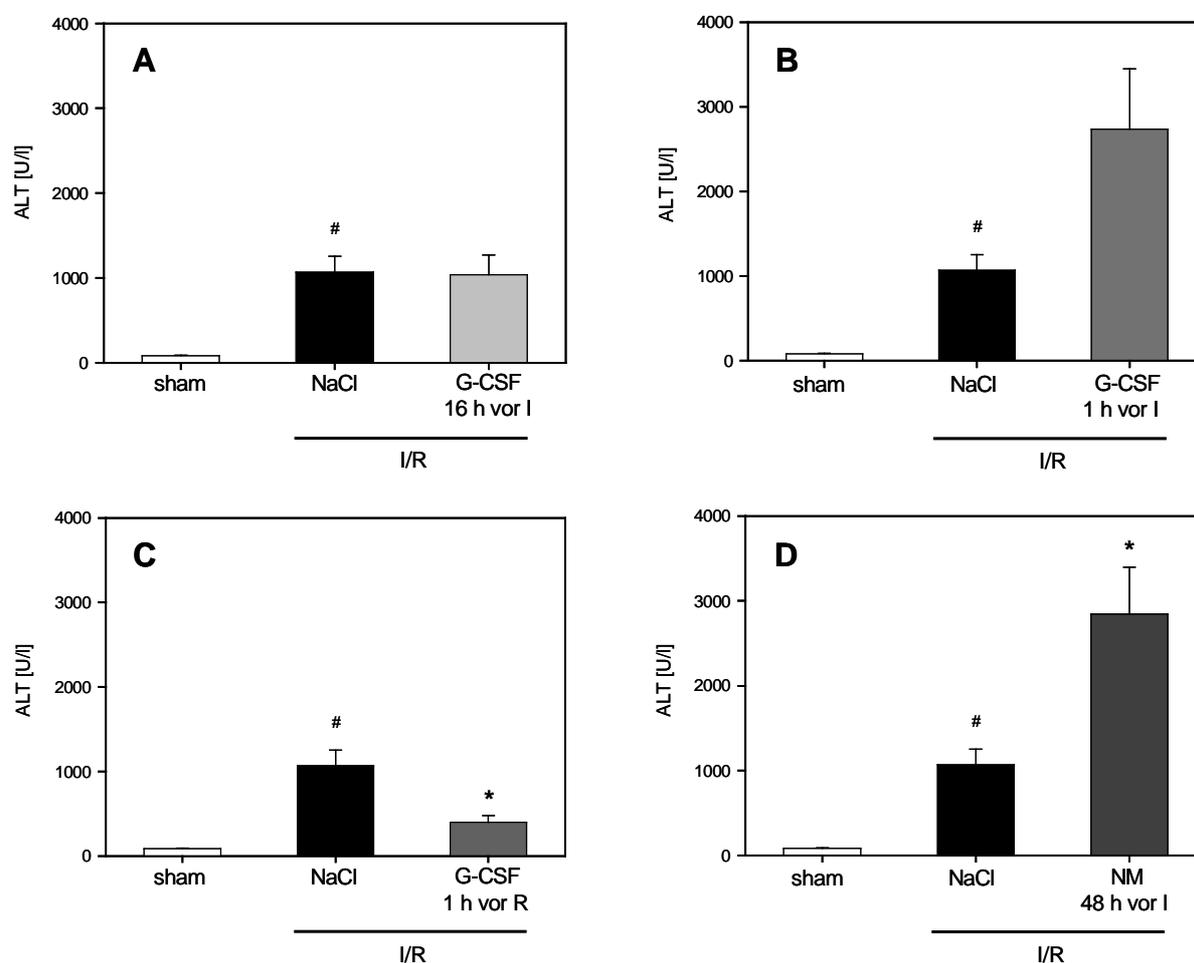


Abbildung 13: Plasma-ALT-Konzentration nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; n=6), 1h vor Ischämie (B; graue Säule; n=8) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, #p<0,05 vs. sham, *p<0,05 vs. I/R & NaCl.

6.2.2.2 Aspartat-Aminotransferase (AST)

Die spektrophotometrische Messung der Aspartat-Aminotransferase zeigte eine signifikante Erhöhung der Plasmakonzentration in der NaCl-Kontrollgruppe im Vergleich zu sham-Gruppe (Abb. 14).

Die Applikation von G-CSF 16 h vor Ischämie hatte keinen Einfluss auf die AST-Konzentration im Plasma.

Die Injektion von G-CSF 1 h vor Ischämie verursachte einen dramatischen Anstieg der AST-Konzentration, während die Gabe von G-CSF 1 h vor Reperfusion die Enzymaktivität deutlich reduzierte ($p=0,073$).

Nach Applikation von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie konnte ein signifikanter Anstieg der Plasma-AST-Konzentration nach I/R nachgewiesen werden.

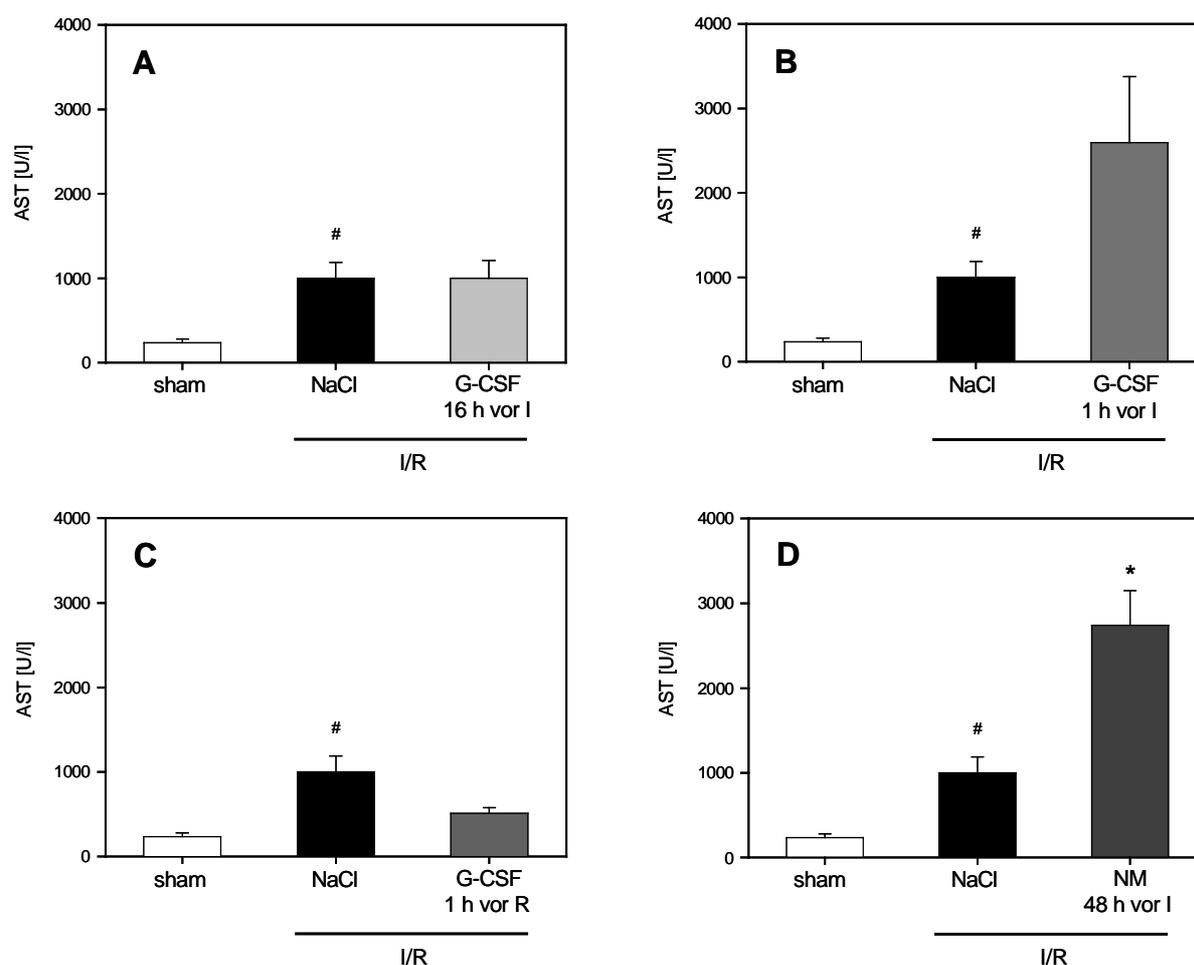


Abbildung 14: Plasma-AST-Konzentration nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (**A**; graue Säule; $n=6$), 1 h vor Ischämie (**B**; graue Säule; $n=8$) und 1 h vor Reperfusion (**C**; graue Säule; $n=6$) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (**D**; graue Säule; $n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; $n=8$); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; $n=7$). Mittelwert \pm SEM, [#] $p<0,05$ vs. sham, ^{*} $p<0,05$ vs. I/R & NaCl.

6.2.2.3 Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

Ischämie und Reperfusion verursachten eine Versechsfachung der GLDH-Plasmakonzentration im Vergleich zur sham-Gruppe ($p=0,060$; Abb. 15).

Die Applikation von G-CSF 16 h vor Ischämie konnte diesen Enzym-Anstieg um 70 % vermindern.

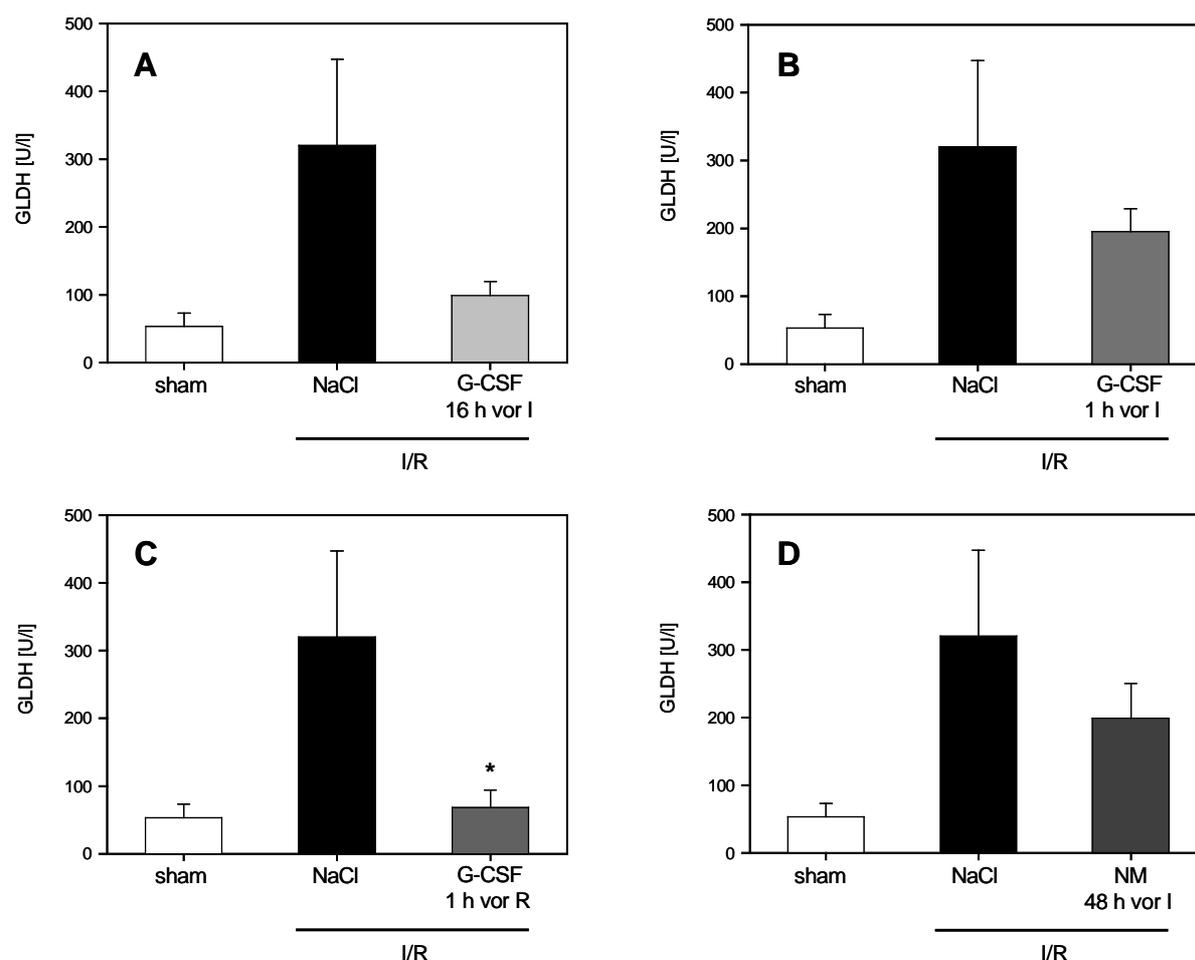


Abbildung 15: Plasma-GLDH-Konzentration nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; $n=6$), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; $n=8$) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; $n=6$) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; $n=9$). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; $n=8$); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; $n=7$). Mittelwert \pm SEM, * $p<0,05$ vs. I/R & NaCl.

Die Gabe von G-CSF 1 h vor Ischämie führte ebenfalls zu einer Reduktion der Plasma-GLDH-Konzentration. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Reperfusion konnte die GLDH-Aktivität signifikant auf sham-Niveau reduzieren.

Nach Applikation von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie zeigte sich ebenfalls eine reduzierte Freisetzung der Glutamatdehydrogenase aus dem Lebergewebe nach 90 Minuten Ischämie und 90 Minuten Reperfusion.

6.2.2.4 Laktatdehydrogenase (LDH)

Die spektrophotometrische Messung der Laktatdehydrogenase zeigte nach I/R eine 7-fach höhere Plasmakonzentration im Vergleich zur sham-Gruppe (Abb. 16).

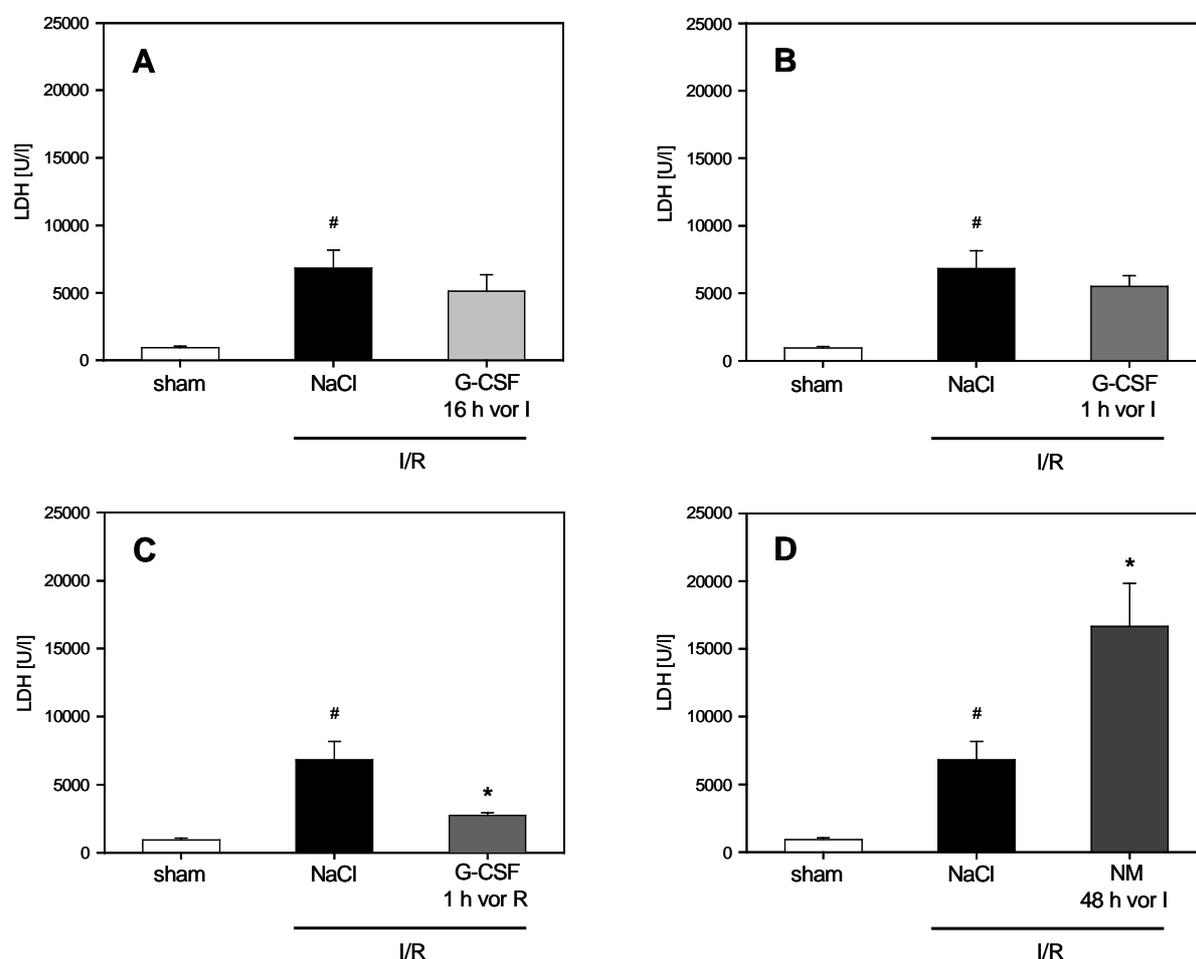


Abbildung 16: Plasma-LDH-Konzentration nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; n=6), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; n=8) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, #p<0,05 vs. sham, *p<0,05 vs. I/R & NaCl.

Die Behandlung mit G-CSF 16 h vor Ischämie und G-CSF 1 h vor Ischämie konnte die LDH-Plasmakonzentration nach 90 Minuten Ischämie und 90 Minuten Reperfusion nur minimal reduzieren. Die Gabe von G-CSF 1 h vor Reperfusion führte zu einer signifikanten Reduktion der LDH-Plasmaaktivität.

Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie führte zu einer signifikanten Zunahme der Konzentration der Laktatdehydrogenase im Plasma.

6.3 Morphologie und Entzündung

6.3.1 Histomorphologie

6.3.1.1 Zytoplasmatische Vakuolisierung

Ischämie und Reperfusion verursachten einen massiven Gewebeschaden und eine Störung der hepatozellulären Integrität, die sich in der deutlich erhöhten zytoplasmatischen Vakuolisierung widerspiegeln (Abb. 17).

Die Vorbehandlung mit G-CSF 16 h vor Ischämie konnte die Vakuolisierung nur geringfügig reduzieren. Die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie führte gar zu einer weiteren Verstärkung der zytoplasmatische Vakuolisierung. G-CSF 1 h vor Reperfusion führte zu einer deutlichen Protektion des Lebergewebes und reduzierte die zytoplasmatische Vakuolisierung um 43 %.

Die Injektion von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie führte zu einem massiven Leberzellschaden und verstärkte die I/R-induzierte zytoplasmatische Vakuolisierung um 90%.

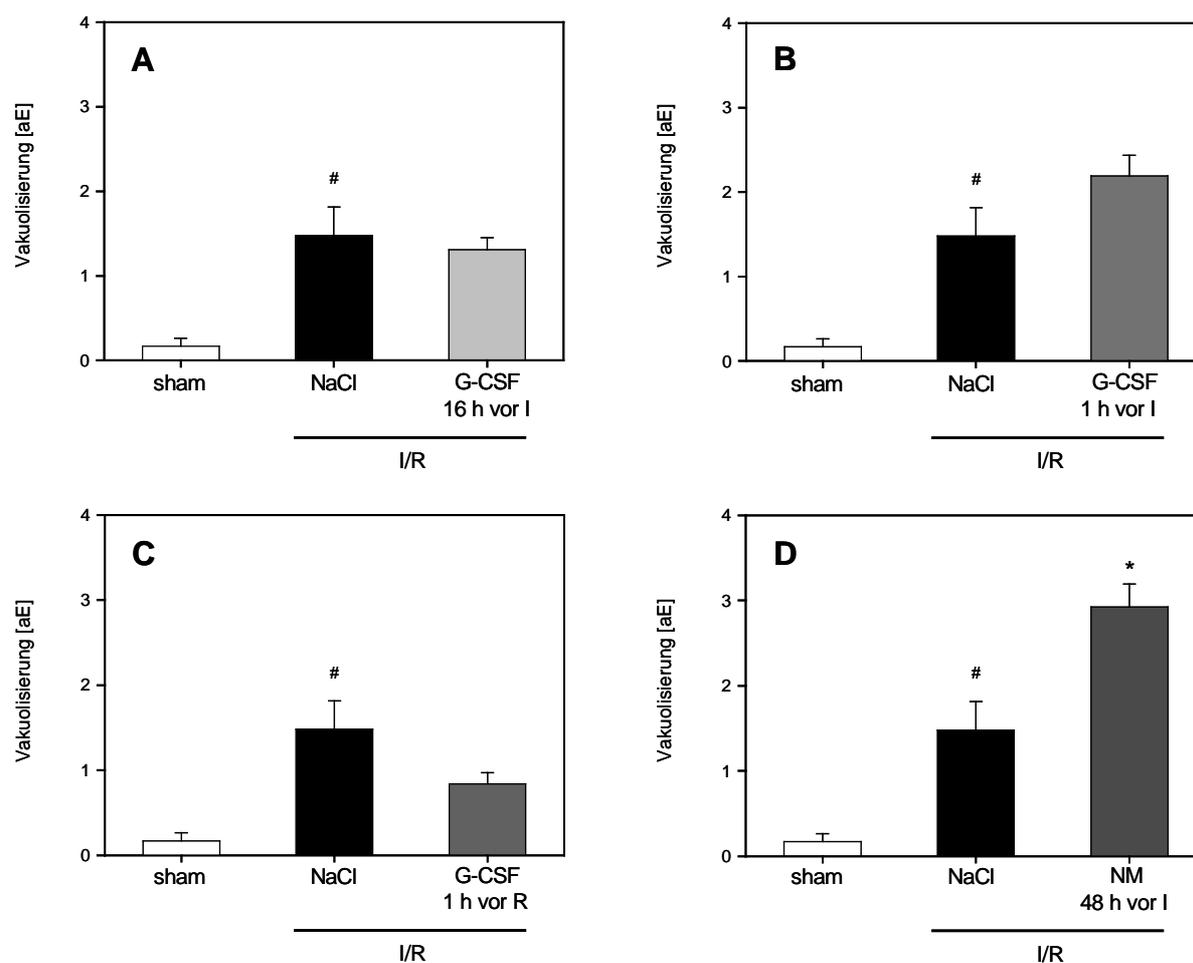


Abbildung 17: Zytoplasmatische Vakuolisierung nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (**A**; graue Säule; n=6), 1 h vor Ischämie (**B**; graue Säule; n=8) und 1 h vor Reperfusion (**C**; graue Säule; n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (**D**; graue Säule; n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, #p<0,05 vs. sham, *p<0,05 vs. I/R & NaCl.

6.3.1.2 Zytoplasmatische Grobscholligkeit

I/R verursachte weiterhin eine massive zytoplasmatische Grobscholligkeit (Abb. 18).

Die Vorbehandlung mit G-CSF 16 h vor Ischämie konnte die Grobscholligkeit signifikant vermindern.

Hingegen hatte die Applikation von G-CSF 1 h vor Ischämie keinen Einfluss auf die zytoplasmatische Grobscholligkeit. Die Injektion von G-CSF 1 h vor Reperfusion verringerte das Ausmaß der Vergrößerung des Cytoplasmas signifikant um knapp 50 %.

Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie hingegen führte zu einer signifikanten Zunahme der I/R-bedingten zytoplasmatischen Grobscholligkeit.

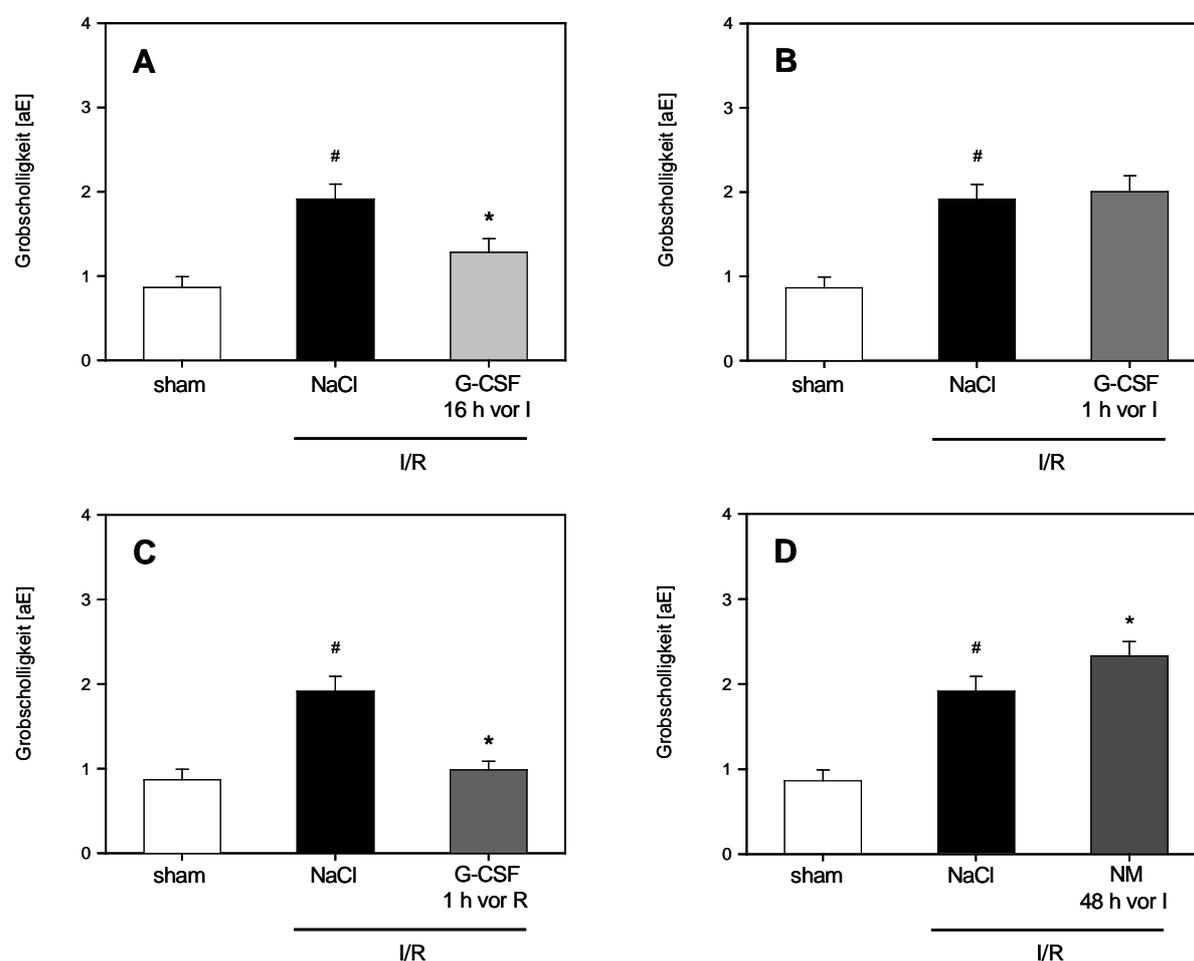


Abbildung 18: Zytoplasmatische Grobscholligkeit nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; n=6), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; n=8) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; n=6), sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, #p<0,05 vs. sham, *p<0,05 vs. I/R & NaCl.

6.3.1.3 Sinusoidale Kongestion

Als weiterer histologischer Parameter der Organschädigung diente die sinusoidale Kongestion. I/R war mit einer massiven Kongestion hepatischer Sinusoide assoziiert (Abb. 19).

Sowohl die Vorbehandlung der Tiere mit G-CSF 16 h vor und 1h vor Ischämie, als auch die Injektion von G-CSF 1 h vor Reperfusion führten zu einer deutlichen Reduktion der sinusoidalen Kongestion um 50 %, 30 %, beziehungsweise 40 %.

Die Gabe von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie führte zu einer signifikanten Verstärkung der I/R-induzierten sinusoidalen Kongestion.

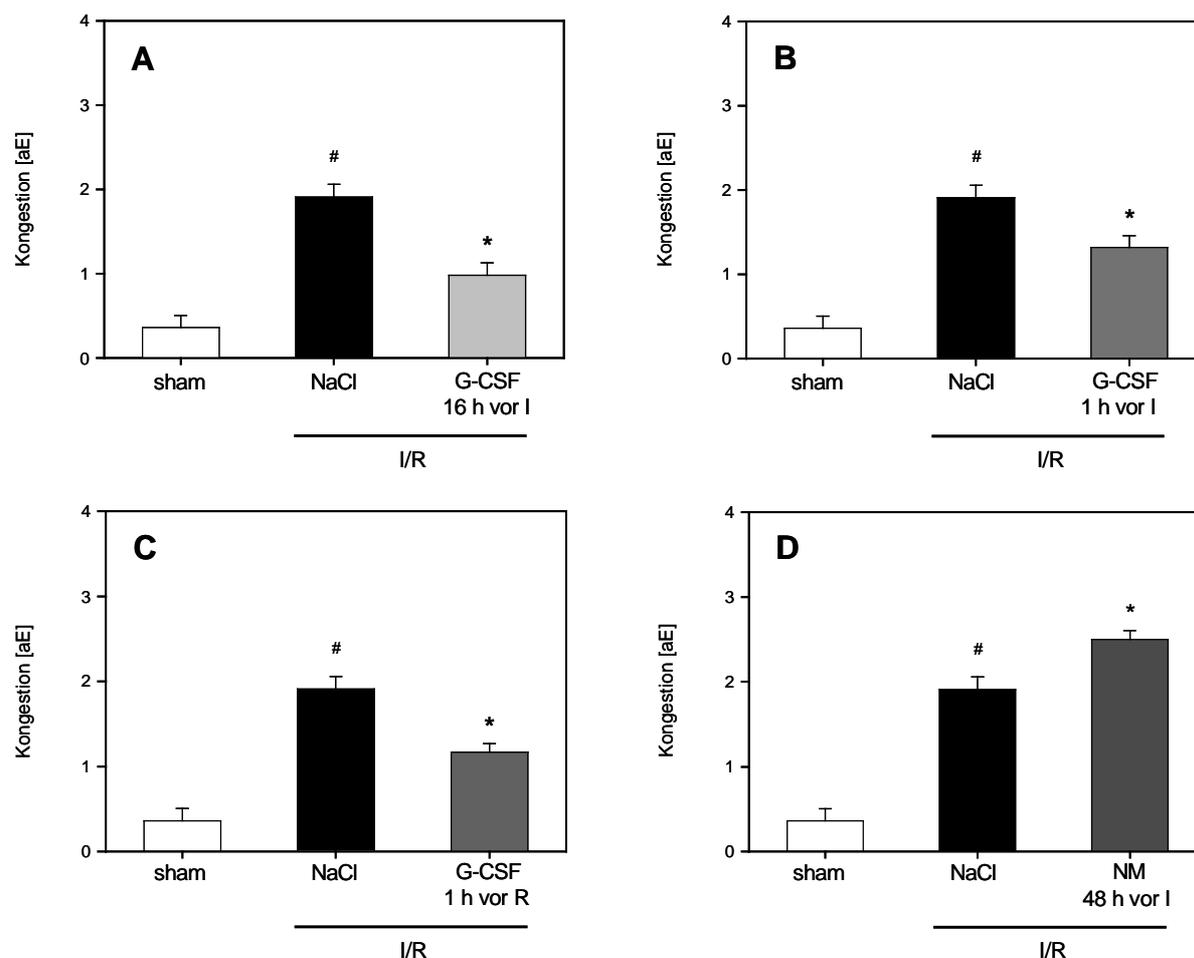


Abbildung 19: Sinusoidale Kongestion nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; n=6), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; n=8) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, #p<0,05 vs. sham, *p<0,05 vs. I/R & NaCl.

6.3.1.4 Leukozyteninfiltration

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Intravitalmikroskopie zeigte die histologische Analyse der Leukozyteninfiltration eine massive Akkumulation von Leukozyten nach 90 Minuten Ischämie und 90 Minuten Reperfusion (Abb. 20).

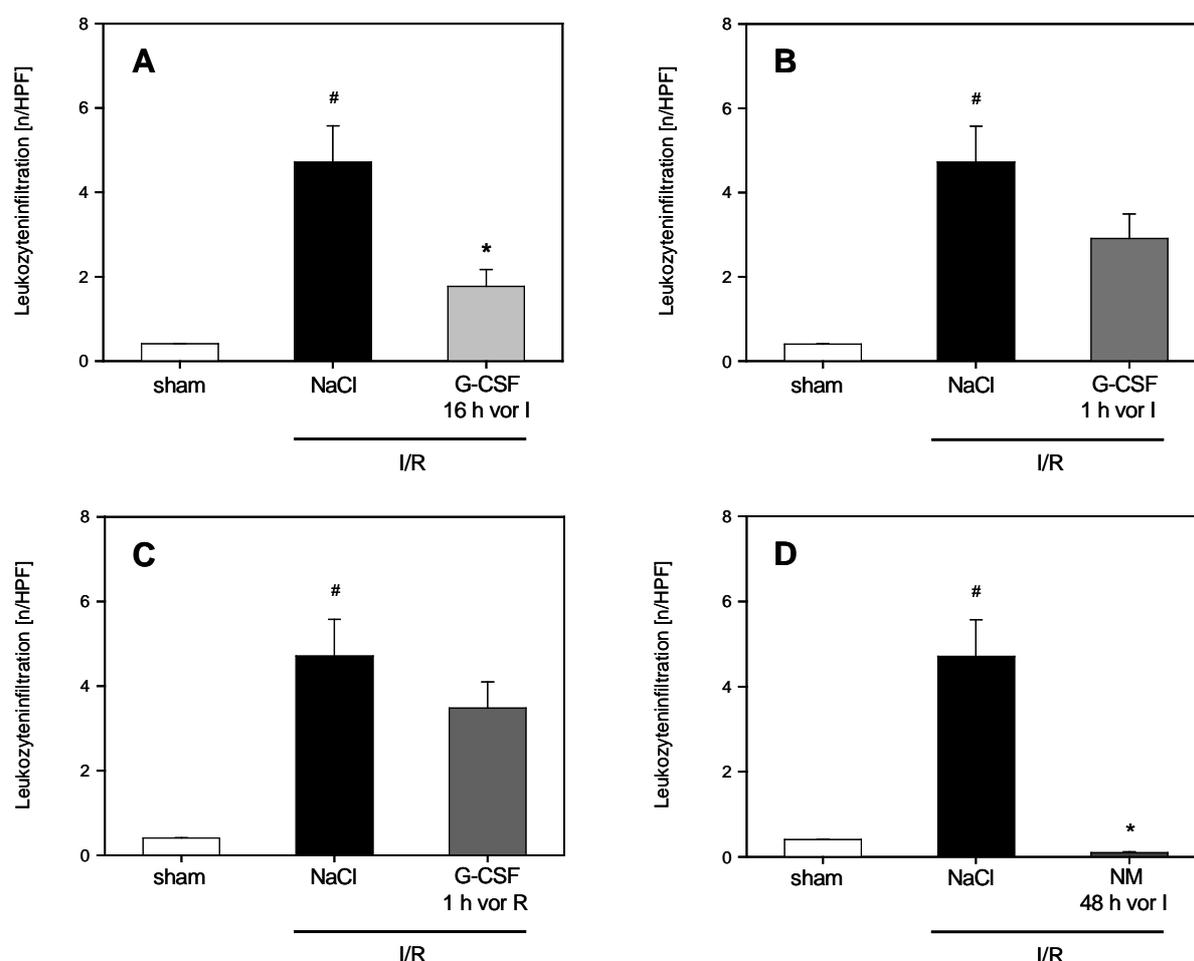


Abbildung 20: Leukozyteninfiltration nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (A; graue Säule; n=6), 1 h vor Ischämie (B; graue Säule; n=8) und 1 h vor Reperfusion (C; graue Säule; n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (D; graue Säule; n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, #p<0,05 vs. sham, *p<0,05 vs. I/R & NaCl.

Die Vorbehandlung mit G-CSF 16 h vor Ischämie vermochte die Anzahl infiltrierender Leukozyten signifikant um 62 % zu senken. Ebenfalls führten die Gabe von G-CSF 1 h vor Ischämie und G-CSF 1 h vor Reperfusion zur deutlichen Reduktion der in das Lebergewebe infiltrierten Leukozyten.

Erwartungsgemäß führte die Gabe von Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der Leukozyteninfiltration nach I/R.

6.3.2 Entzündungsmediatoren

6.3.2.1 Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α)

I/R verursachte einen signifikanten Anstieg der TNF- α -Plasmakonzentration (Tab. 7).

Die Applikation von G-CSF 16 h vor Ischämie hatte keine Auswirkungen auf die I/R-induzierte TNF- α -Freisetzung, wohingegen die Gabe von G-CSF 1 h vor Ischämie die TNF- α Konzentration signifikant auf nahezu sham-Niveau reduzierte.

Durch Applikation von G-CSF 1 h vor Reperfusion sowie Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie wurde die I/R-induzierte TNF- α -Freisetzung sogar um 47 % beziehungsweise 38 % erhöht.

	TNF- α [pg/ml]	IL-6 [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]
sham	6,91 \pm 5,86	346,14 \pm 114,31	86,82 \pm 35,60
I/R&NaCl	21,97 \pm 4,79 [#]	2010,39 \pm 490,92 [#]	322,96 \pm 59,99 [#]
I/R&G-CSF 16 h vor I	19,75 \pm 5,47	2106,92 \pm 720,99	246,44 \pm 56,78
I/R&G-CSF 1 h vor I	9,81 \pm 2,24*	2480,14 \pm 477,28	435,62 \pm 150,39
I/R&G-CSF 1 h vor R	32,41 \pm 8,20	1703,88 \pm 1129,08	193,27 \pm 77,50
I/R&NM 48 h vor I	30,37 \pm 5,70	5527,40 \pm 1407,77*	406,74 \pm 72,42

Tabelle 7: TNF- α -, IL-6- und IL-10-Plasmakonzentrationen nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 μ g/kg KG G-CSF 16 h vor Ischämie (n=6), 1 h vor Ischämie (n=8) und 1 h vor Reperfusion (n=6) sowie mit Nitrogen Mustard 1,75 mg/kg KG 48 h vor Ischämie (n=9). NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (n=8); sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (n=7). Mittelwert \pm SEM, [#]p<0,05 vs. sham, *p<0,05 vs. I/R & NaCl

6.3.2.2 Interleukin-6 (IL-6)

Nach Ischämie und Reperfusion war die Plasmakonzentration von Interleukin-6 im Plasma signifikant um mehr als das Fünffache im Vergleich zu sham-operierten Tieren erhöht (Tab. 7).

Die Gabe von G-CSF 16 h vor Ischämie und G-CSF 1 h vor Ischämie führten zu keiner wesentlichen Veränderung der IL-6-Plasmakonzentration. Ebenso bewirkte die Injektion von G-CSF 1h vor Reperfusion keine Reduktion der IL-6-Plasmakonzentration.

Hingegen führte die Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie zu einer Verdoppelung der post-ischämischen Plasmakonzentration von IL-6.

6.3.2.3 Interleukin-10 (IL-10)

I/R verursachte weiterhin eine signifikant erhöhte IL-10-Plasmakonzentration im Vergleich zu sham-operierten Tieren (Tab. 7).

Durch Applikation von G-CSF 16 h vor Ischämie kam es zu einer leichten Reduktion, wohingegen die Gabe von G-CSF 1 h vor Ischämie die IL-10-Plasmakonzentration um 35 % steigerte. Durch Gabe von G-CSF 1 h vor Reperfusion konnte der I/R-induzierte Anstieg von IL-10 um 40% reduziert werden.

Nach Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard 48 h vor Ischämie war die I/R-induzierte IL-10-Plasmakonzentration um 25 % im Vergleich zu ischämischen Kontrolltieren erhöht.

6.4 Proteinbiochemische Analysen

6.4.1 Immunhistochemie

Nach Ischämie und Reperfusion zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Expression der Transkriptionsfaktoren pSTAT-5 und NF- κ B sowie von iNOS und des G-CSF-Rezeptors (Abb. 21).

Die Gabe von G-CSF 1h vor Reperfusion führte zu einer leichten Expressionsreduktion von pSTAT-5 und NF- κ B.

Die Applikation von G-CSF 1h vor Reperfusion führte weiter zu einer drastischen Reduktion der iNOS-Expression, während sich keine Effekte auf die I/R-bedingte G-CSF-Rezeptor-Expression nachweisen ließen.

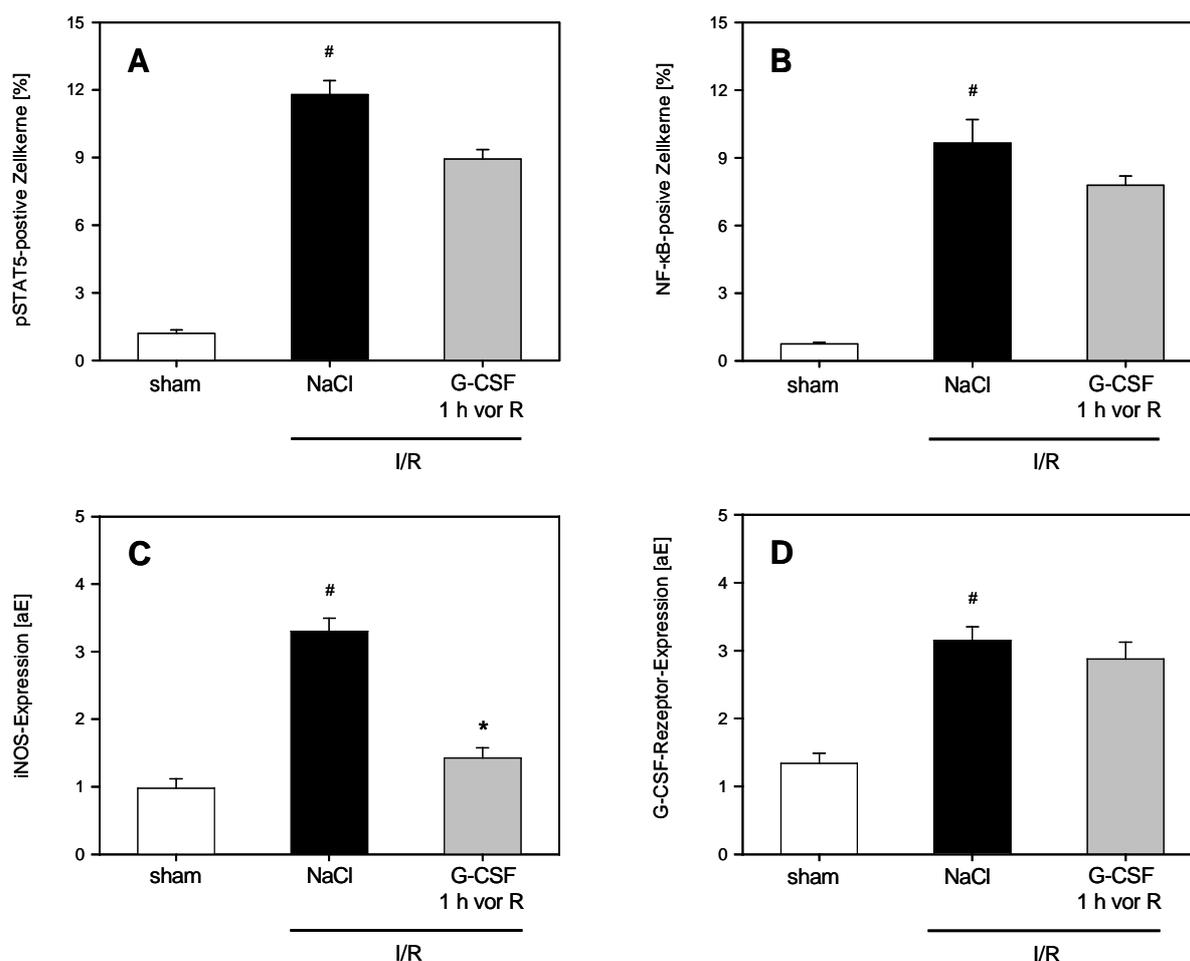


Abbildung 21: Immunohistochemische Analysen nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG G-CSF 1 h vor Reperfusion (graue Säule; n=6), (A; pSTAT-5 positive Zellen pro HPF); (B; NF-κB positive Zellen pro HPF; (C; iNOS-Expression); (D; G-CSF-Rezeptor-Expression). NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säulen; n=8); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säulen; n=7). Mittelwert ± SEM, #p<0,05 vs. sham, *p<0,05 vs. I/R & NaCl.

6.4.2. Western Blot

Ischämie und Reperfusion führten zu einer massiven Zunahme der cleaved Caspase-3 Expression. Ebenso konnte ein Anstieg von HO-1 und der Transkriptionsfaktoren NF-κB und pSTAT5 festgestellt werden (Abb. 22 bis 25).

Die Applikation von G-CSF 1 h vor Reperfusion bewirkte eine signifikante Verminderung der HO-1 Expression. Des Weiteren kam es zur deutlichen Reduktion der Expression von cleaved Caspase-3, NF-κB und pSTAT5.

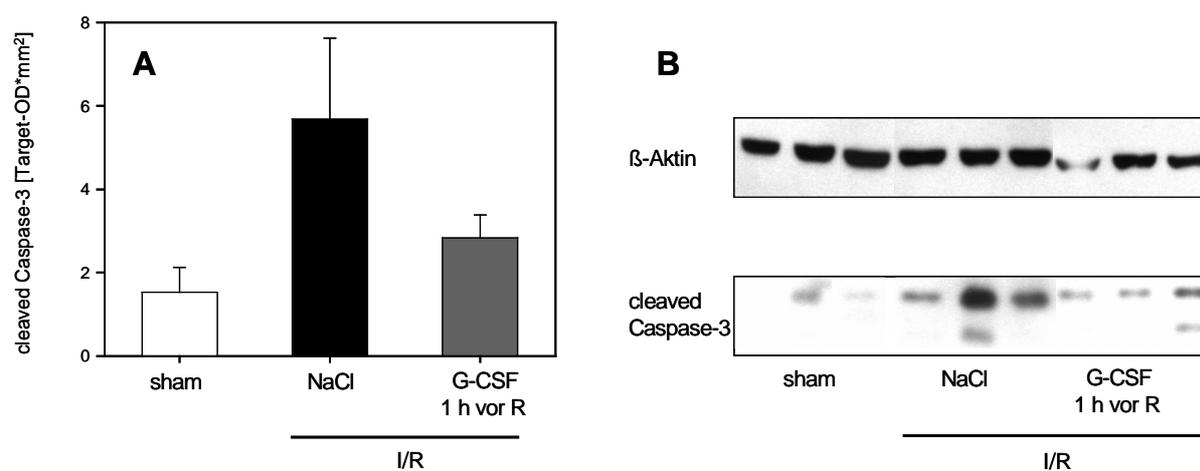


Abbildung 22: Quantitative Auswertung der cleaved Caspase-3 Expression (**A**; graue Säule; n=6) und Darstellung der Western Blots (**B**) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG 1 h vor Reperfusion. NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säule; n=8); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säule; n=7). Mittelwert ± SEM.

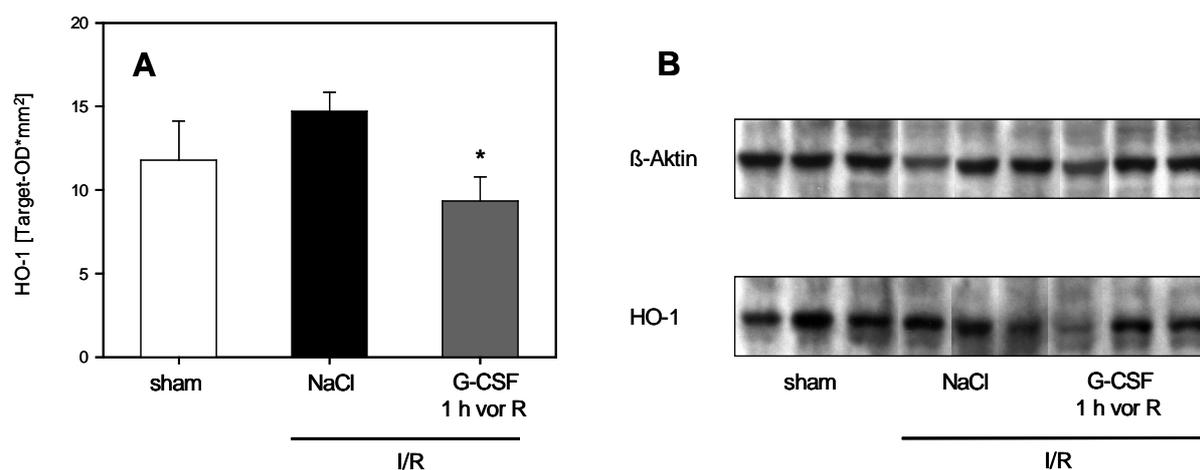


Abbildung 23: Quantitative Auswertung der HO-1-Expression (**A**; graue Säule; n=6) und Darstellung der Western Blots (**B**) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG 1 h vor Reperfusion. NaCl-vorbehandelte Tiere dienen als ischämische Kontrollen (schwarze Säule; n=8); sham-operierte Tiere dienen als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säule; n=7). Mittelwert ± SEM, *p<0,05 vs. I/R & NaCl.

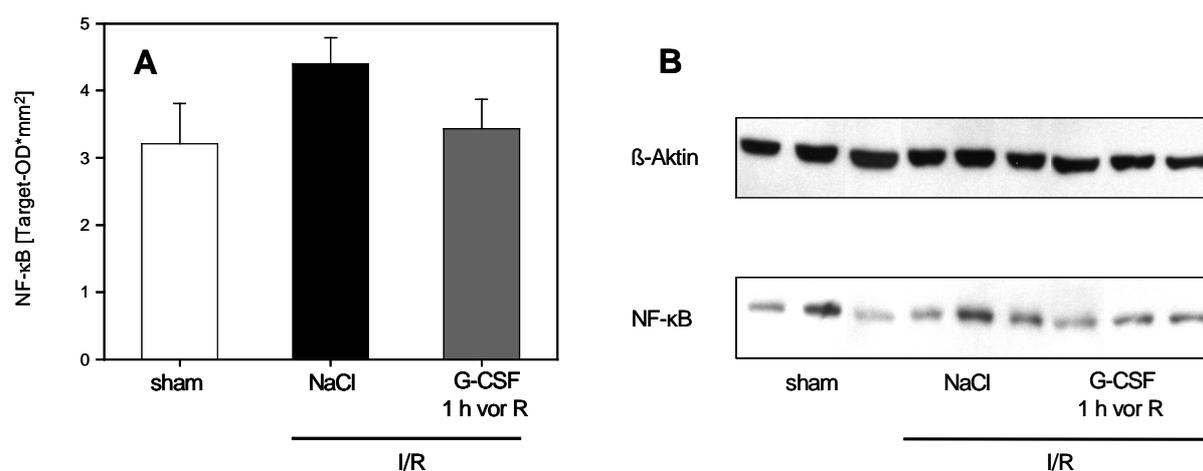


Abbildung 24: Quantitative Auswertung der NF-κB-Expression (**A**; graue Säule; n=6) und Darstellung der Western Blots (**B**) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG 1 h vor Reperfusion. NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (schwarze Säule; n=8); sham-operierte Tiere dienten als nicht-ischämische Kontrollen (weiße Säule; n=7).

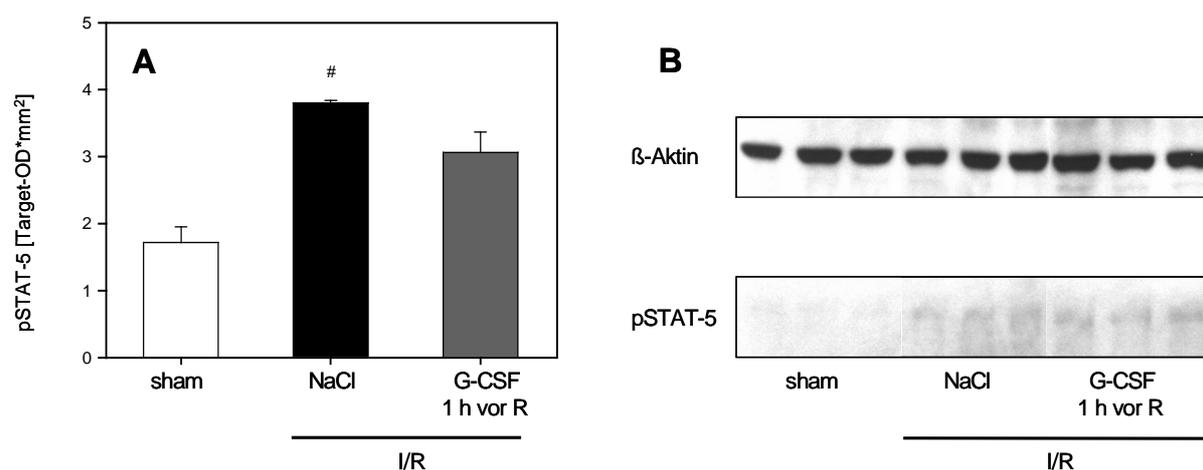


Abbildung 25: Quantitative Auswertung der pSTAT5-Expression (**A**; graue Säule; n=6) und Darstellung der Western Blots (**B**) nach 90-minütiger Ischämie und 90-minütiger Reperfusion. Versuchstiere wurden vorbehandelt mit 50 µg/kg KG 1 h vor Reperfusion. NaCl-vorbehandelte Tiere dienten als ischämische Kontrollen (schwarze Säule; n=8); sham-operierte Tiere dienten als nichtischämische Kontrollen (weiße Säule; n=7). Mittelwert ± SEM, [#]p<0,05 vs. sham.

7 Diskussion

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Diskussion der Modelle

Die vorliegende Untersuchung diene der Analyse der Auswirkungen einer Vorbehandlung mit G-CSF und Nitrogen Mustard auf den I/R-induzierten Reperfusionsschaden der Leber im Vergleich zu nicht vorbehandelten Versuchstieren. Das Ziel der Studie umfaßte die Beobachtung und Erklärung mikrohämodynamischer, zellulärer und molekularer Mechanismen nach jeweils neunzig Minuten Ischämie und Reperfusion. Die Experimente wurden an spontan atmenden, laparotomierten Ratten in intraperitonealer Anästhesie durchgeführt.

Experimentelle Untersuchungen zum Studium pathophysiologischer Mechanismen der Leberzellschädigung nach Ischämie und Reperfusion können grundsätzlich anhand isolierter Zellen [JAESCHKE et al., 1992; MAYADAS et al., 1993; RAUEN et al., 1994], an isoliert perfundierten Organen [RAO et al., 1990; KONNO et al., 1992; WETTSTEIN und HAUSSINGER, 1994] oder an intakten Organismen [JAESCHKE und FARHOOD, 1991; MENGER et al., 1991b; VOLLMAR et al., 1997, 1998; BURKHARDT et al., 1998] durchgeführt werden. Die problembezogene Auswahl des jeweiligen Studienmodells anhand zugrundeliegender Fragestellungen und Hypothesen [WORTHHA und ADAMS, 1992] gilt hierbei als zu beachtende Voraussetzung. Die Betrachtung von Zellkulturen, insbesondere Hepatozyten, Geweben oder Organen nach Hypoxie und folgender Reoxygenierung erweist sich zur Aufklärung zellulärer Mechanismen [LITTAUER und DE GROOT, 1992; HASHIMOTO et al., 1994] und deren Interaktionen im Zellverband [SCHMID-SCHÖNBEIN et al., 1980; BARGATZE et al., 1994] als vielversprechend. Jedoch bleiben durch die modellbedingte, isolierte Betrachtungsweise die komplexen Interaktionen von Zellkompartimenten und Organsystemen im Organismus und deren mikrozirkulatorisch-hämodynamische Einflussnahmen [VOLLMAR et al., 1996], die durch neuronale Steuerungsmechanismen, entstehende Metabolite und aktivierte humorale Kaskaden vermittelt werden, unberücksichtigt [MCCUSKEY 1986]. Dies erweist sich in der Praxis als gravierender Nachteil. Dagegen erlauben *in vivo*-Modelle, wie auch das in der vorliegenden Studie gewählte, die Berücksichtigung interferierender lokaler und systemischer sowie positiver und negativer Rückkopplungsmechanismen in der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse [MENGER und MESSMER, 1993b].

Die im Rahmen der chirurgischen Präparation der Versuchstiere und der intravitalmikroskopischen Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation notwendige Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Applikation von Pentobarbital. Hierbei ist auf die exakte Dosierung (50mg/kg Körpergewicht) zu achten, um unerwünschte Nebenwirkungen wie Blutdruckabfall, Atemdepression und Einschränkungen der Herzfunktion [LONGNECKER und SEYDE, 1986] zu minimieren. Des Weiteren bewirken Barbiturate aufgrund ihrer bekannten Verstoffwechslung durch die Leber die Freisetzung leberspezifischer Enzyme. Dies muss in Versuchsanordnungen, die das Ausmaß der Leberzellschädigung anhand des Anstiegs leberspezifischer Transaminasen im Serum bestimmen, berücksichtigt werden.

Das in dieser Studie verwendete chirurgische Modell erfordert die Laparotomie der Versuchstiere, die Präparation der Leber, sowie die Auslagerung des linken Leberlappens zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation. Hierbei besteht potentiell die Möglichkeit einer gravierenden Alteration der Leberdurchblutung infolge des unabdingbaren chirurgischen Traumas [GELMAN, 1976; GELMAN et al., 1987]. Mittels Intravitalmikroskopie sind vergleichende Messungen am nicht-narkotisierten, nicht-laparotomierten Tier aus methodischen und ethischen Gründen nicht durchführbar [VOLLMAR et al., 1997]. Allerdings zeigten sowohl die in dieser Studie vorgenommenen Bestimmungen der Leberenzyme, als auch die Auswertung der lichtmikroskopischen Präparate keine Hinweise auf einen funktionellen oder strukturellen Schaden des Leberparenchyms innerhalb der Kontrollgruppe. Darüber hinaus lag die sinusoidale Perfusionsrate unter Kontrollbedingungen mit annähernd 100% innerhalb des physiologischen Bereichs [MENGER et al., 1991b; POST et al., 1993b].

Zur Intravitalmikroskopie wurden die Tiere um 45° in der Sagittalebene nach links geneigt, und der linke Leberlappen mit seiner Unterseite nach oben rotiert. So konnte ein Plastilinbett der Leberoberfläche entsprechend angepasst und eine Beeinträchtigung der Perfusionssituation durch Zug oder Torsion am Gefäßstiel vermieden werden. Bei der Auslagerung kam der linke Leberlappen mit der Unterseite nach oben horizontal in Herzhöhe des Versuchstieres zu liegen, wodurch ein hydrostatischer Effekt, der die hepatische Mikrozirkulation und den venösen Rückstrom zu Herzen beeinflussen könnte, ausgeschlossen wurde.

7.1.2 Ischämie und Reperfusion (I/R) der Leber

Zur Induktion der Ischämie erfolgte die selektive Okklusion der arteriellen und portalvenösen Äste des linken Leberlappens der Versuchstiere mit Hilfe eines Gefäßclips [NAUTA et al., 1990]. Unmittelbar nach Wiedereröffnen des Clips begann die Phase der Reperfusion.

Aufgrund der loblären Struktur der Rattenleber und der damit verbundenen guten Darstellungsmöglichkeit der hilären Gefäße gestaltete sich deren Okklusion als unproblematisch. Nach korrekter Positionierung des Gefäßclips und der somit beginnenden Hypoxie blasste das von der Blutversorgung ausgeschlossene Gewebe sofort ab und verfärbte sich im Verlauf livide.

Ischämie mit Unterbrechung der hepatischen Mikrozirkulation kann prinzipiell durch Verschluss des *Ligamentum hepatoduodenale*, was zur Ischämie der gesamten Leber führt, oder durch selektive Ischämie eines oder mehrerer Leberlappen induziert werden. Die Okklusion des *Ligamentum hepatoduodenale* führte Pringle Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts zur Blutstillung bei traumatischen Leberparenchymverletzungen in die chirurgische Praxis ein [PRINGLE, 1908].

Diese Technik ist noch heute unter dem Namen „Pringle-Manöver“, bzw. „portal triad cross-clamping“ im anglo-amerikanischen Sprachraum bekannt.

Neben den ischämiebedingten Schädigungen des Leberparenchyms beinhaltet dieses Verfahren jedoch pathophysiologische Auswirkungen auf den gesamten Organismus, welche durch die komplette Unterbrechung des Pfortaderkreislaufs mit konsekutiver venöser Kongestion im Splanchnikusgebiet hervorgerufen werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei die bis zu 60%ige Reduktion des zirkulierenden Blutvolumens [BEACH et al., 1965; DELVA et al. 1989; GONCE et al., 1995], welche aus der Blockierung des intestinalen Kreislaufs und einer massiven Flüssigkeitstranssudation in den interstitiellen Raum, vornehmlich des Darms resultiert [KAWAMOTO et al., 1991]. Daraus folgt eine systemische Hypotension, eine Hämokonzentration, sowie ein portalvenöses „pooling“ des Blutes [VOLLMAR et al., 1996]. Der Zirkulationsstillstand im Splanchnikusgebiet verursacht aufgrund von Hypoxie und anaerobem Stoffwechsel eine zunehmende Laktatazidose und Hyperkaliämie [JOLLY und FOSTER, 1963; ALMERSJO et al., 1971; VAN DER MEER et al., 1986; GONCE et al., 1995]. Nach Wiedereröffnung des portalvenösen Kreislaufs kommt es im Anschluss zu einer massiven Einschwemmung saurer Metabolite in den systemischen Kreislauf, was wiederum als Hauptursache für die Letalität des Eingriffes verantwortlich gemacht wird [BEACH et al., 1965].

Experimentelle Studien zur Pfortaderokklusion in verschiedenen Spezies divergieren hinsichtlich der maximal tolerierbaren Ischämiedauer [CHILD et al., 1950; BEACH et al., 1965; NORDLINGER et al., 1980; GONCE et al., 1995]. Dies liegt offenbar in der unterschiedlichen Ausprägung portosystemischer Shunts begründet, welche einen protektiven Effekt in Bezug auf die portalvenöse Kongestion haben [MACKENZIE et al., 1977; NORDLINGER et al., 1980], so dass diesbezüglich tierexperimentelle Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den menschlichen Organismus übertragbar sind [HUGUET et al., 1978; DELVA et al., 1987]. Da in der vorliegenden Studie die hepatische Mikrozirkulation nach Ischämie und Re-

perfusion ohne die im Rahmen einer Pfortaderokklusion auftretende venöse, intestinale Kongestion untersucht werden sollte, beschränkte sich die Ischämie auf den linken Leberlappen. Darüber hinaus lässt die in dieser Studie gewählte Ischämiezeit von 90 Minuten die Okklusion des *Ligamentum hepatoduodenale* nicht zu, da im Gegensatz zum Menschen [HUGUET et al., 1978; DELVA et al., 1987; HUGUET et al., 1992b] oder Schwein [NORDLINGER et al., 1980] eine solch lange Ischämiedauer der Leber mit konsekutiver venöser Kongestion des Darmes bei der Ratte mit dem Überleben nicht vereinbar ist [MEJIA, 1964; NORDLINGER et al., 1980; GONCE et al., 1995]. Das in dieser Studie verwendete Modell reproduziert somit die Pathophysiologie von langandauernder Ischämie/Reperfusion der Leber, wie sie einer kompletten Pfortaderokklusion mit portosystemischem Shunt entsprechen würde, ist jedoch technisch leichter durchführbar und standardisierbar [FERGUSON et al., 1993].

7.1.3 Diskussion der Untersuchungstechniken

Als Untersuchungstechnik der hepatischen Mikrozirkulation nach Ischämie und Reperfusion diene die intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Seit Mitte des 17. Jahrhunderts kommen Mikroskope zur Erforschung der Mikrozirkulation in der Wissenschaft zum Einsatz. So entdeckte Marcello Malpighi 1661 das Kapillarbett als Verbindung des arteriellen und venösen Gefäßsystems. Antony van Leuwenhook widmete 1674 seine Studien der kapillaren Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten [SLAAF et al., 1986]. Seit dieser Zeit ist die Untersuchung struktureller und funktioneller Eigenschaften des mikrovaskulären Gefäßbetts zahlreicher Organe das Ziel mikroskopischer *in vivo* Studien, wobei die Intravitalmikroskopie als sogenannte direkte Technik die Möglichkeit bietet, dynamische Prozesse über einen längeren Zeitraum detailliert und quantitativ zu analysieren [MCCUSKEY 1986; ZEINTL et al., 1986; MARZI et al., 1990; MENGER et al., 1991b; MENGER und VOLLMAR, 1994]. Auf diesen Eigenschaften beruhen die Vorteile und die prinzipielle Überlegenheit der intravitalem Mikroskopie in der Beobachtung der Mikrozirkulation gegenüber indirekten Verfahren, wie der Laser-Doppler-Flowmetrie [KOO et al., 1986; ARVIDSSON et al., 1988; ALMOND und WHEATLEY, 1992; MENGER und LEHR, 1993a; VOLLMAR et al., 1994b; WHEATLEY 1994] und der ^{51}Cr -Clearance-Technik [ARII et al., 1988].

Die H_2 -Gasclearance-Technik [SILVER, 1977; OHKAWA et al., 1984; GOUMA et al., 1986], die Indocyaningrün-Clearance-Technik [FARKOUH et al., 1971; LEBREC et al., 1981] und die Radiogoldpartikel-Clearance-Technik [LEBREC et al., 1981] erweisen sich gegenüber der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie aufgrund eingeschränkter Beobachtungsparameter als unterlegen. Die $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA-Szintigraphie [ATALLA et al., 1985], die ^{125}I -Albumin-

Szintigraphie [SCHMELING et al., 1989; POGGETTI et al., 1992] sowie die histologische Analyse von injizierten Kohlenstoffpartikeln [AMES et al., 1968; STROCK und MAJNO., 1969; KLONER et al., 1974; ENGLER et al., 1983; GOTO et al., 1992; JEROME et al., 1993] und die Elektronenmikroskopie [FLORES et al., 1972; BOUWENS et al., 1986; MCKEOWN et al., 1988; BABBS et al., 1991; CALDWELL-KENKEL et al., 1991; DEL ZOPPO et al., 1991; ODA et al., 1991] sind nicht oder nur eingeschränkt in der Lage, die dynamischen Aspekte der Perfusion wiederzugeben. Weitere Nachteile gegenüber der Intravitalmikroskopie zeigen sich bei der ^3H -Thymidin-Markierung [BOUWENS et al., 1986], der Myeloperoxidase-Aktivitätsmessung [GRISHAM et al., 1986; GRISHAM et al., 1988; CARDEN 1990], der Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs [DULING und BERNE, 1970; SILVER, 1977; METZGER und SCHYWALSKY, 1992], der Rückstreuungsspektrophotometrie [TE KOEPPEL et al., 1990; GOTO et al., 1992; SEIYAMA et al., 1994], der Thermodilutionsmethode [SATO, 1987] sowie bei Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen [KUNZ et al., 1991; CONNOR et al., 1992; SHIRATORI et al., 1994], Indikatorverdünnungsmethoden [LAPOINTE und OLSON, 1989] oder polarographischen Verfahren [KOBAYASHI et al., 1990].

Durch die Vielzahl der intravitalmikroskopisch erfassbaren Parameter ist eine „on-line“, d.h. Echtzeit-Analyse der Mikrozirkulation nicht realisierbar. Aus diesem Grund ist eine Dokumentation der mikroskopischen Bilder mit Hilfe einer hoch auflösenden CCD-Kamera [HIRAOKA et al., 1987] und einer Videoaufzeichnungseinheit [ELLIS et al., 1986; MCCUSKEY 1986] unerlässlich. Die Quantifizierung der einzelnen Parameter kann somit nach Abschluss der einzelnen Experimente durch wiederholte Analyse der einzelnen Bildsequenzen erfolgen, wobei mittels Zeitlupe, Bild-zu-Bild-Analyse oder Standbildern auch komplexe, rasch ablaufende Vorgänge erfasst werden können [ELLIS et al., 1986; MENGER et al., 1991b; MENGER und LEHR, 1993a].

Die „off-line“-Auswertung der Videosequenzen kann sowohl manuell, als auch Computer gestützt – halb- oder vollautomatisch – erfolgen [INTAGLIETTA und TOMPKINS, 1973; INTAGLIETTA et al., 1975; ELLIS et al., 1986]. Eine digitalisierte Analyse mittels Computer-Video-System bietet vor allem den Vorteil einer wesentlich rationelleren Quantifizierung der untersuchten Parameter, wodurch in kurzer Zeit eine sehr große Datenmenge verarbeitet werden kann [ELLIS et al., 1986]. Die prinzipiellen Probleme der Computer-gestützten Video-Analyse bestehen in der Notwendigkeit eines konstanten, hohen Signalverhaltens der zu untersuchenden Objekte sowie in der Beeinflussung der Auswertung durch Bewegungsartefakte [ZEINTL et al., 1986]. Obwohl automatisierte Verfahren zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation bereits zur Anwendung kamen [KOO und LIANG, 1977; KOMATSU et al., 1990], ergeben sich jedoch gerade im Falle der Intravitalmikroskopie der Rattenleber Schwierigkeiten aufgrund von Atemexkursionen, die dem Organ durch die Zwerchfellbewegungen widerfahren. Die absolute Ruhigstellung des Organs kann auch durch ein zwischen

Leber und Diaphragma positionierten Metallschild, welches die Übertragung von Atemexkursionen und Herzaktionen auf die Leber minimieren soll [KOO et al., 1988; KOMATSU et al., 1990] nicht erreicht werden, da die Leber an der *Area nuda* mit dem Zwerchfell verwachsen ist.

In dem von uns gewählten Modell wurde der linke Leberlappen auf eine mittels Plastilinmasse der Leberoberfläche genau angepasste Metallschale ausgelagert. Die somit erreichte Ruhigstellung des Untersuchungsobjektes reichte zur manuellen Auswertung der mikrozirkulatorischen Parameter völlig aus [CLEMENS et al., 1985; MARZI et al., 1991; MENGER et al., 1991b; MACPHEE et al., 1992; FERGUSON et al., 1993; POST et al., 1993a; VOLLMAR et al., 1994a]. Auf eine Computer-gestützte Analyse konnte somit verzichtet werden.

Zur Analyse der hepatischen Mikrozirkulation stehen prinzipiell zwei Untersuchungstechniken zu Verfügung, die Epi-Illumination (Auflicht) und die Trans-Illumination (Durchlicht) [MCCUSKEY 1986; SLAAF et al., 1986]. Frühe intravitalmikroskopische Untersuchungen nutzten dabei vornehmlich die Trans-Illumination [KNISELY 1939; HANZON 1952; KNISELY et al., 1957; BLOCH 1955]. Im Falle der Leber wird damit jedoch die Beurteilung auf den äußeren Rand eines Leberlappens eingeschränkt. Die Analyse größerer Areale mit zahlreichen Azini ist nicht möglich, und die innerhalb eines Experiments zu erhebende Datenmenge bleibt limitiert. Darüber hinaus zeigen Trans-Illuminations-Studien [EGUCHI et al., 1991] gegenüber Studien in Epi-Illuminations-Technik [POST et al., 1993b; VOLLMAR et al., 1993c] eine deutlich niedrigere sinusoidale Perfusionsrate unter physiologischen Bedingungen.

Die für die trans-illuminatorische Untersuchung obligate Mikroskopie des äußeren Leberrandes birgt das Risiko einer präparationsbedingten, mechanischen Alteration des Organs. Außerdem ist der Leberrand einer erhöhten Austrocknungsfahr während der Untersuchung ausgesetzt. Aufgrund dieser Nachteile wurde in der vorliegenden Studie die Epi-Illuminations-Technik verwendet, die die Visualisierung der Mikrozirkulation an der Oberfläche massiver Organe ermöglicht. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass zwischen den an der Leberoberfläche zu beobachtenden pathophysiologischen Prozesse und denen im tieferen Parenchym kein Unterschied bestehen [RAPPAPORT, 1958].

Aufgrund der nur geringen Autofluoreszenz des Lebergewebes [HANZON 1952] ist hierbei die Verwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen zur Kontrastverstärkung erforderlich [DE BRUYN et al., 1950; GUMUCIO et al., 1981; SHERMAN und FISHER, 1986; VOLLMAR et al., 1994c]. Zur Darstellung der Perfusionsverhältnisse diente der Farbstoff Natrium-Fluoreszein, der zu Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen *i.v.* appliziert wurde. In der geeigneten Dosis (2µmol/kg Körpergewicht) wurde damit eine optimale Kontrastverstärkung der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen erzielt, d.h. die Sinusoide blieben über

ihren gesamten Verlauf innerhalb des Azinus von periportal bis perizentral gut darstellbar. Die Markierung der Leukozyten erfolgte mittels Rhodamin-6G, das in adäquater Dosierung (0,1 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht *i.v.*) eine ausreichende Detektion der fließenden und stagnierenden Leukozyten ermöglicht [BAATZ et al., 1995].

Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wie Rhodamin-6G ist eine Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse denkbar. Rhodamin-6G beeinflusst die oxidative Phosphorylierung auf mitochondrialer Ebene sowohl durch die Hemmung der ATP-Hydrolyse und –Synthese als auch durch Hemmung des Transports von H^+ -Ionen aus den Mitochondrien [HIGUTI et al., 1980; BEREITER-HAHN et al., 1983; DIETZMANN et al., 1987], was eine Interferenz zwischen Farbstoff und Atmungskette bedeutet. Die gewählte Dosierung macht allerdings eine Störung der Atmungskette, und somit eine Auswirkung auf die Ergebnisse, aufgrund pharmakologisch-toxischer Eigenschaften des Farbstoffes, unwahrscheinlich [EGUCHI et al., 1991]. Des Weiteren kann eine längere Lichtexposition während der Intravitalmikroskopie intrazelluläre photodynamische Prozesse induzieren, weshalb die Belichtung eines Gesichtsfeldes auf maximal 60 Sekunden und die Gesamtdauer der Mikroskopie auf 10-15 Minuten beschränkt wurde [MENGER et al., 1991b]. Bei der Auswahl der Gesichtsfelder wurde die wiederholte Mikroskopie in der Nähe bereits belichteter Gesichtsfelder vermieden, was sich aufgrund der zur Verfügung stehenden Leberoberfläche von circa 7 cm^2 gut realisieren ließ.

Zur quantitativen „off-line“- Auswertung der einzelnen Videosequenzen wurde jeweils ein elliptisches Overlay als Schablone auf den Bildschirm gelegt. Dieses wurde in Größe und Form an das auszuwertende Lobulussegment angeglichen und entspricht einem sechstel Lobulus. In der Schablone waren sowohl Zentralvene als auch Periportalfeld enthalten. Somit wird die Umrechnung der anhand eines Overlays gewonnenen Daten auf die Fläche eines Lobulus ermöglicht. Des Weiteren erlaubt die Verwendung elliptischer Overlays eine Unterteilung des Azinus in drei Segmente gleicher Länge [RAPPAPORT, 1973; GUMUCIO et al., 1981; GUMUCIO 1989], wodurch alle analysierten Parameter getrennt für die subzitären Regionen periportal, midzonal und perizentral zu erheben sind. Diese Vorgehensweise erlaubt eine detaillierte, quantitative und hinsichtlich der Lokalisation aller betrachteten Phänomene differenzierte Analyse der hepatischen Mikrozirkulation, welche bereits in vergleichbaren Studien etabliert wurde [MENGER et al., 1991b; POST et al., 1993b; VOLLMAR et al., 1993a; VOLLMAR et al., 1994c]. In der vorliegenden Studie wurde somit jeder Parameter für jeden Sinusoid getrennt erhoben. Dieses Vorgehen minimierte das Risiko fehlerhafter Berechnungen aufgrund zu kleiner Messwerte oder unzureichender Berücksichtigung der sinusoidalen Tortuosität.

Nach der Applikation von Natrium-Fluoreszein konnte die sinusoidale Perfusion quantitativ beurteilt werden. Die Quantifizierung der sinusoidalen Perfusionsrate erfolgte mittels der erwähnten elliptischen Overlays. Ergänzend wurden Messungen der Erythrozytenfließgeschwindigkeit in den postsinusoidalen Venulen computergestützt durchgeführt.

Neben der in der vorliegenden Arbeit praktizierten Vorgehensweise stehen alternative Verfahren zur Analyse der sinusoidalen Perfusion zur Verfügung. Unter Einsatz der Intravitalmikroskopie und eines Mikro-Spektrophotometers ist es möglich, Erythrozyten-Flux, Sauerstoffgehalt, und Oxygenierung des erythrozytären Hämoglobins im Blut einzelner Sinusoide zu bestimmen [SEIYAMA et al., 1994]. Damit ist eine sehr differenzierte, quantitative Analyse der nutritiven Perfusion und Sauerstoffversorgung des Organs möglich. Da jedoch die sequentielle Untersuchung jedes einzelnen Sinusoids einen vergleichsweise hohen Zeitaufwand in Anspruch nimmt und darüber hinaus nicht „off-line“ durchgeführt werden kann, wird die Anzahl der innerhalb eines Experiments durchführbaren Messungen limitiert. Aus den genannten Gründen ist die von uns gewählte Methode die differenzierteste zur Analyse der sinusoidalen Perfusion und bietet darüber hinaus die Möglichkeit, innerhalb eines Experiments eine große Anzahl von Daten mittels „off-line“ Analyse zu erheben.

Zur Messung der Leberschädigung wurde, wie im Klinikalltag seit Jahrzehnten fest etabliert, am Versuchsende die Aktivität der leberspezifischen Transaminasen laborchemisch bestimmt. Damit ist sowohl das Ausmaß der Gewebeerteration, als auch die Qualität der Schädigung bestimmbar. Erstere nimmt mit der Dauer der Hypoxie [FARKOUH et al., 1971] und der Anzahl der Zellen mit beeinträchtigter Integrität zu [SCHMIDT und SCHMIDT, 1987]. Die Enzymtopographie der Zelle [NISHIMURA et al., 1986; SCHMIDT und SCHMIDT., 1989] und damit die Lokalisation innerhalb der einzelnen Kompartimente [SCHMIDT und SCHMIDT, 1987; SCHMIDT und SCHMIDT, 1988] erlauben die qualitative Analyse des Gewebeschadens. Die ubiquitär mit Zelldestruktion korrelierende Aktivitätssteigerung der Laktatdehydrogenase im Serum wurde ebenfalls bestimmt. Eine vermehrte Freisetzung dieser Enzyme mit konsekutiver, messbarer Aktivitätserhöhung erfolgt im Rahmen pathophysiologischer Prozesse, die mit einer Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität einhergehen [SCHMIDT und SCHMIDT, 1987]. So zeigt sich ein mit der Dauer der Leberischämie korrelierender Anstieg der Serumaktivitäten der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) [FARKOUH et al., 1971].

Die Enzymtopographie der Zelle ermöglicht die Lokalisation des durch Ischämie und Reperfusion entstandenen Schadens, so dass eine Aussage über den Schweregrad einer Leberschädigung getroffen werden kann [NISHIMURA et al., 1986; SCHMIDT und SCHMIDT, 1989]. Zytoplasmatische Enzyme (z.B. ALT) oder Ekto-Enzyme der Plasmamembran wie γ -Glutamyl-Transferase (γ -GT) oder alkalische Phosphatase (AP) gelangen bereits bei

leichteren Zellschäden in den extrazellulären Raum, wodurch eine Zunahme der entsprechenden Enzymaktivitäten im Serum resultiert [SCHMIDT und SCHMIDT, 1987]. Ein Anstieg der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) – welche innerhalb der Mitochondrienmatrix lokalisiert ist – kann als schwere, die Mitochondrienstruktur einbeziehende Zellschädigung aufgefasst werden [SCHMIDT und SCHMIDT, 1987; SCHMIDT und SCHMIDT, 1988]. Darüberhinaus kann aus der Änderung des Enzymmusters von AST und ALT auf die Schwere der Leberschädigung zurück geschlossen werden. Während die ALT ein ausschließlich zytoplasmatisches Enzym darstellt, ist die AST sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien lokalisiert [KAMIKE et al., 1982]. Leichtere Zellschäden verursachen somit die Freisetzung von ALT und der zytoplasmatischen AST; erst bei ausgeprägter Schädigung wird auch die Aktivität der mitochondrialen AST ansteigen, wodurch sich das Verhältnis AST/ALT zu größeren Werten hin verschiebt [KLEINE 1965; KAMIKE et al., 1982; FREDERIKS et al., 1983; NISHIMURA et al., 1986].

Als Maß der systemischen Entzündungsreaktion wurden die Plasmakonzentrationen der an Inflammation maßgeblich beteiligten Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 [STENVINKEL et al., 2005] mittels ELISA-Technik bestimmt.

Die Quantifizierung der Expression der für den I/R-induzierten Parenchymschaden repräsentativen Stressproteine wurde mittels immunhistochemischer beziehungsweise Western Blot-Analysen durchgeführt, was in Laboren seit Jahrzehnten zur täglichen Praxis gehört.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Schädigung des linken Leberlappens durch Ischämie und Reperfusion

Die ischämische Schädigung der Leber mit darauf folgender Reperfusion stellt im gegenwärtigen Klinikalltag bei Leberresektionen, Sepsis, Lebertraumata, hypovolämischem Schock und Lebertransplantationen ein häufiges Problem dar [RAMALHO et al., 2006]. Der Zusammenbruch der Mikrozirkulation führt zu einer Beeinträchtigung der Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und energiereichen Substraten, sowie einer Akkumulation von Metaboliten und Abfallprodukten. Die Zellen werden durch den ineffektiveren anaeroben Stoffwechsel mit Energie versorgt. Dennoch kann der Energiebedarf des Parenchyms nicht gedeckt werden, was den Verlust der Zellintegrität und schlussendlich den Zelltod zur Folge hat. Darüber hinaus kommt es zur Aktivierung komplexer vasoaktiver Mediatorokaskaden im Orga-

nismus, die eine Vasokonstriktion und eine Veränderung der Perfusion und damit der Sauerstoffversorgung des Gewebes zur Folge haben. Weiterhin münden diese Kaskaden in einer Aktivierung der Gerinnung sowie in einer Induktion der Inflammation [RAMALHO et al., 2006]. Trotz wiedereinsetzender Reperfusion steigen Morbidität und Mortalität der Patienten durch diese pathophysiologischen Phänomene signifikant an [BANGA et al., 2005].

In verschiedenen vorangegangenen Studien konnte die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation nach Ischämie und Reperfusion in unterschiedlichen Organsystemen nachgewiesen werden [BLANKENSTEIJN und TERPSTRA, 1991; CLAVIEN et al., 1992; MENGER et al., 1992a; MENGER et al., 1992b]. Dementsprechend zeigten auch die Versuche in der vorliegenden Studie einen signifikanten Anstieg nicht perfundierter Sinusoide während der Reperfusionsphase.

Die Aktivierung sich antagonistischer vasokonstringierender und –dilatisierender Mediatorkaskaden hat eine Veränderung des sinusoidalen Blutflusses zur Folge. Das Überwiegen von konstringierendem Endothelin gegenüber vasodilatierendem Stickstoffmonoxid im Leberparenchym in der frühen Reperfusionsphase wurde bereits intensiv erforscht [SERRACINO-INGLOTT et al., 2000]. Die sinusoidale Konstriktion [YOKOYAMA et al., 2005] und das postschämische Anschwellen von Endothelzellen [VOLLMAR et al., 1994b] führen zu der auch in unseren Versuchen beobachteten signifikanten Reduktion der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit. Diese ist zudem partiell durch den signifikanten Abfall des systemischen Blutdrucks während der Reperfusion bedingt [WAISMAN et al., 2003].

Die verstärkte Transkription und Expression von Selektinen, ICAM-1 und VCAM-1 führt im Zusammenwirken mit den oben genannten Veränderungen des mikrovaskulären Gefäßbetts zur massiven Rekrutierung, Stagnation und Migration von Leukozyten [JAESCHKE et al., 1990; VOLLMAR et al., 1996; SERRACINO-INGLOTT et al., 2000; JAESCHKE et al., 2003], was auch in der vorliegenden Studie sowohl in den Sinusoiden als auch in den postsinusoidalen Venulen zu beobachten war. Zwar verursacht die alleinige Anwesenheit von Leukozyten keinen Perfusionsausfall [VOLLMAR et al., 1996b], durch Freisetzung von Proteasen und freien Sauerstoffradikalen sind sie jedoch am Reperfusionsschaden der Leber beteiligt [SERRACINO-INGLOTT et al., 2000]. Die exakte Beteiligung von Leukozyten an der Induktion hepatozellulärer Apoptose ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt und wird kontrovers diskutiert. Wir konnten in Analogie zu weiteren Studien [CHEN et al., 2006] einen signifikanten Anstieg der hepatozellulären Apoptoserate nach Ischämie und Reperfusion nachweisen. Diese gesteigerte Apoptoserate verzögert einerseits die unmittelbare Regeneration der Leberzellen [CHEN et al., 2006], stellt jedoch andererseits einen bedeutenden Trigger für einsetzende Reparaturmechanismen des Gewebes dar [GHAVAMI et al., 2005]. Ischämie und Reperfusion führten insbesondere in der Frühphase der Reperfusion zu einer massiven Schädigung der Kupfferzellen, den ortsständigen Makrophagen der Leber

[SERRACINO-INGLOTT et al., 2000], was sich in einer signifikanten Beeinträchtigung der Phagozytoseaktivität widerspiegelt [WIEZOREK et al., 1994; VOLLMAR et al., 1994b]. In unseren Versuchen zeigte die quantitative Auswertung der frei fließenden Latexpartikel eine deutlich reduzierte Phagozytosekapazität der Kupfferzellen nach Ischämie und Reperfusion.

Parallel zu den intravitalmikroskopisch untersuchten Parametern der Leberzellschädigung zeigten sich auch in der darauf folgenden histologischen Analyse der gewonnenen Präparate deutliche Zeichen der Parenchymalteration [RUDIGER et al., 2002; EL-GIBALY et al., 2004]. Nach Ischämie und Reperfusion imponierte das Gewebe inhomogen und grobschollig. Es fanden sich vermehrt Vakuolen, die Sinusoide zeigten eine markante Kongestion. Die Chlorazetatesterase Färbung (CAE) der Gewebeschnitte zum lichtmikroskopischen Nachweis infiltrierter Leukozyten [MARTINEZ-SILVESTRE et al., 2005] untermauerte die in der Intravitalmikroskopie beobachtete Leukozytenakkumulation.

Als weiteres Maß des Leberzellschadens wurde - wie auch im klinischen Alltag - die Aktivitätssteigerung der zytoplasmatisch und mitochondrial lokalisierten Enzyme im Plasma herangezogen [VOLLMAR et al., 1996a; RUDIGER et al., 2002; LEE und LEE, 2005a]. Der signifikante Aktivitätsanstieg der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) bestätigte laborchemisch den bereits intravitalmikroskopisch und histologisch nachgewiesenen Reperfusionsschaden. Der Anstieg der Plasmakonzentration der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) repräsentierte die Schwere des Gewebeschadens, der sogar mit einer Störung der mitochondrialen Integrität einherging [GLANEMANN et al., 2003]. Die Konzentrationszunahme der Laktat-Dehydrogenase (LDH) als Maß des nekrotischen Zelluntergangs ist im klinischen Alltag seit Jahrzehnten etabliert. Dementsprechend führten Ischämie und Reperfusion der Leber auch in unserem Modell zu einer signifikant erhöhten Plasmakonzentration der LDH.

Einhergehend mit der Beeinträchtigung der Gewebeintegrität kommt es zur Funktionseinschränkung des alterierten Leberparenchyms. Die Galleexkretion, als Ausdruck der Syntheseleistung intakter Hepatozyten, nimmt bei eingeschränkter Sauerstoffversorgung ab [BOWERS et al., 1987; GLANEMANN et al. 2003], was in der vorliegenden Studie ebenfalls beobachtet werden konnte.

Neben diskreten Veränderungen an Organsystemen setzt der Organismus ein Netzwerk aus pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren in Gang [JAESCHKE 2003], die sowohl systemische, als auch lokale Wirkungen nach sich ziehen. Zentraler Mediator der Inflammation ist das Zytokin Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), das unter anderem von Kupfferzellen und anderen inflammatorische Zellen freigesetzt wird [JAESCHKE 2003]. Mit dem Wiedereinsetzen der Blutversorgung von ischämischem Gewebe kommt es zur lokalen Freisetzung von TNF- α , die mit systemisch erhöhten Serumkonzentrationen einhergeht [DULUNDU et al., 2007]. Gleichzeitig setzt der Organismus auch entzündungshemmende Zyto-

kine frei, um ein Überschießen der Inflammation zu verhindern [JAESCHKE 2003]. Interleukin-10 inhibiert die Transkription und Sekretion von TNF- α [SERRACINO-INGLOTT et al., 2000; JAESCHKE 2003]. Zudem führt das pro-inflammatorische IL-6 [HEINRICH et al., 2003; NETO et al., 2004] über die Induktion von IL-10 [NISHIMURA et al., 1999] zu einer Abschwächung der Inflammation [TILG et al., 2006]. In der vorliegenden Studie wurde nach Ischämie und Reperfusion ein signifikanter Anstieg der Serumkonzentrationen aller drei Mediatoren beobachtet, was die Aktivierung des Zytokinnetzwerkes im Rahmen der Entzündungsreaktion abbildet.

Ischämie und Reperfusion steigert die Expression von Stressproteinen und Transkriptionsfaktoren, die verschiedene intrazelluläre Kaskaden in Gang setzen können. Immunhistochemische Analysen zeigten einen I/R-induzierten Anstieg der NF- κ B- und pSTAT-5-positiven Zellkerne im Lebergewebe, was durch Western Blot-Analysen bestätigt wurde. Die gesteigerte Expression beider Transkriptionsfaktoren wurde in mehreren Studien im Rahmen der Entzündungsreaktion beobachtet [LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006; GAO, 2005; YAMAURA et al., 2003]. Des Weiteren erhöht die signifikant verstärkte Expression der iNOS sowohl den oxidativen Stress auf das Leberparenchym und als auch die Inflammation [HUR et al., 1999].

Die in der Western Blot-Analyse beobachtete I/R-induzierte Expression von cleaved Caspase-3 und NF- κ B führt zur Aktivierung pro-apoptotischer und zytotoxischer Kaskaden in der Leberzelle [LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006]. Die Expression des Stressproteins Hämoxxygenase-1 (HO-1) reduziert die systemische Inflammation durch Bildung von Biliverdin, CO und komplexierten Eisens und hat damit insgesamt hepatoprotektiven Charakter [TSUCHIHASHI et al., 2006].

7.2.2 Wirkungen von G-CSF auf das Lebergewebe nach Ischämie und Reperfusion

Zur Analyse der Wirkung von G-CSF auf den Reperfusionsschaden nach Ischämie des linken Leberlappens wurde G-CSF zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten – 16 Stunden vor Ischämiebeginn, eine Stunde vor Ischämiebeginn und eine Stunde vor Beginn der Reperfusion – in einer Dosierung von jeweils 50 μ g/kg Körpergewicht verabreicht. Der protektive Effekt der G-CSF-Gabe bei ischämischer Infarzierung einzelner Organe wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen, insbesondere am Herzen [UEDA et al., 2006], am Hirn [SCHABITZ et al., 2003; SHYU et al., 2006] und bei mesenterialer Ischämie [SQUADRITO et al., 1997] erforscht.

Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit G-CSF zu beiden Zeitpunkten vor Ischämie reduzierte die Anzahl nicht perfundierter Sinusoide deutlich und die venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit als Ausdruck verbesserter Rheologie nahm bei der späteren Applikation zu. Die Verbesserungen der Perfusion können auf die bereits nachgewiesenen nicht-hämatopoietischen Effekte des Zytokins zurückgeführt werden [SQUADRITO et al., 1997; UEDA et al., 2006].

Die sinusoidale Leukostase zeigte einen markanten Anstieg bei Versuchstieren, die G-CSF 16 Stunden vor Ischämie erhielten. Dies ging mit signifikant gesteigerten systemischen Leukozytenzahlen einher, die Folge der hämatopoietischen Wirkungen des Stammzellfaktors sind [DEMETRI und GRIFFIN, 1991]. Im Gegensatz dazu war nach Gabe von G-CSF eine Stunde vor Ischämie eine gesteigerte Leukozytenanzahl in den postsinusoidalen Venulen nachweisbar. Die beginnende Aktivierung zirkulierender Granulozyten innerhalb von zwei Stunden mit damit verbundener Steigerung der Effektorfunktionen und Freisetzung von chemotaktischen Mediatoren und freien Radikalen [DEMETRI und GRIFFIN, 1991] könnte zu dieser der Gewebemigration vorangehenden Adhärenz in den Venulen beitragen.

Die hepatozelluläre Apoptoserate sank unabhängig vom Applikationszeitpunkt um circa die Hälfte ab. In diesem Zusammenhang wurde der protektive Effekt von G-CSF bei Ischämie und Reperfusion bereits nachgewiesen [SOLAROGLU et al., 2006a] und konnte von uns bestätigt werden.

Einen ebenfalls protektiven Effekt hat G-CSF auf die Kupfferzellen der Leber. Deren Phagozytoseaktivität nahm geringfügiger ab. Vorteile zeigten sich bei G-CSF-Injektion eine Stunde vor Ischämie. Mit der Abschwächung der Kupfferzell-Schadens wird die darauf folgende Überaktivierung unterdrückt, die mit Freisetzung von TNF- α und anderen proinflammatorischer Zytokine die systemische Entzündung triggert [GORGAN et al., 1992; VOLLMAR et al., 1997b; VOLLMAR et al., 2002].

Der als Maß für die Sekretionsleistung der Leber geltende Gallefluss [BOWERS et al., 1987] nahm durch G-CSF 16 Stunden vor Ischämie zu, blieb hingegen bei einständiger, präischämischer Injektion unverändert.

Auf den Anstieg der Aktivitäten der Alanin- und Aspartat-Aminotransferasen im Blut am Ende der Reperfusionsphase hatte die Gabe von G-CSF 16 Stunden vor Ischämie keinen Einfluss. Bei den Tieren, die die Injektion eine Stunde vor Ischämie erhielten, wurde sogar ein Anstieg der systemischen Enzymkonzentrationen verzeichnet. Demgegenüber senkte die Vorbehandlung mit G-CSF 16 Stunden vor Ischämie die systemische Aktivität der Laktatdehydrogenase, sowie der Glutamat-Dehydrogenase und damit den Schweregrad der Schädigung. Dies steht teilweise im Widerspruch zu den Beobachtungen in anderen Modellen, die eine Reduktion der Serumenzymaktivitäten von ALT und AST zeigten. In diesen wurden die Transaminasen allerdings zu späteren Zeitpunkten und nicht unmittelbar nach

der Reperfusion bestimmt [VOLLMAR et al., 2002; DIRSCH et al., 2006]. Die protektiven Wirkungen von G-CSF, insbesondere auf mitochondrialer Ebene, konnte zudem in anderen Versuchsanordnungen bestätigt werden [SCHMIDT-MENDE et al., 2006].

Hinsichtlich der histomorphologisch evaluierten Parameter führte die Injektion von G-CSF 16 Stunden vor Ischämie zur Leberparenchymprotektion. Verminderte Vakuolisierung, signifikant reduzierte Grobscholligkeit und Gewebekongestion, als auch eine signifikant verringerte Leukozyteninfiltration in der Chlorazetatesterase Färbung weisen auf die protektiven Wirkungen hin. Weniger effektiv erschien die Injektion von G-CSF eine Stunde vor Ischämie. Zwar wurden die Kongestion des Gewebes und die Anzahl der Leukozyten vermindert, allerdings imponierten sowohl Grobscholligkeit als auch Vakuolisierung leicht beziehungsweise deutlich erhöht.

Darüber hinaus wurden die Konzentrationen der Entzündungsmediatoren im Blut durch die Applikation von G-CSF vor einsetzender Ischämie beeinflusst. Die Injektion 16 Stunden vor Ischämie senkte die Konzentration von TNF- α im Blut der Versuchstiere leicht ab. Einen signifikanten Abfall dieses Parameters konnte durch die Gabe eine Stunde vor Ischämie bewirkt werden. Den dämpfenden Einfluss von G-CSF auf die Bildung und Freisetzung von TNF- α bei Organischämien und Inflammationsreaktionen wurde bereits in anderen Modellen nachgewiesen [SQUADRITO et al., 1997; GORGEN et al., 1992]. Die systemische Konzentration von Interleukin-6 wies in der Gruppe mit 16-stündiger Vorbehandlung einen mäßigen Anstieg auf. Deutlicher war dieser Anstieg bei Versuchstieren nach G-CSF Applikation eine Stunde vor Ischämie ausgeprägt. Die Tatsache, dass G-CSF mit IL-6 interagiert ist seit längerer Zeit bekannt und wurde *in vitro* bestätigt [DEMETRI und GRIFFIN, 1991]. Die Mechanismen im Organismus bei Ischämie und Reperfusion sind jedoch noch nicht vollständig verstanden. Des Weiteren wurde in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Ansätzen eine Induktion von Interleukin-10 durch G-CSF bei systemischer Inflammation und chronischer Herzinsuffizienz beobachtet [AGNELLO et al., 2004; JOSEPH et al., 2006]. Demgegenüber war in der vorliegenden Studie bei Versuchstieren nach 16-stündiger G-CSF-Vorbehandlung ein Absinken der IL-10-Konzentration nachweisbar. Bei Injektion eine Stunde vor Ischämie konnte der Anstieg der Blutkonzentration des Mediators bestätigt werden.

Zum Vergleich der hepato-protektiven Wirkungen der Präkonditionierung mit G-CSF 16 Stunden und eine Stunde vor Ischämiebeginn mit dem akuten Wirkprofil des Stammzellfaktors, erfolgte in einer weiteren Versuchsgruppe die Injektion von G-CSF eine Stunde vor Reperfusion bei gleicher Dosierung. In dieser Gruppe konnte eine weitere Verbesserung der Lebermikrozirkulationsstörung festgestellt werden. Die Anzahl nicht-perfundierter Sinusoide reduzierte sich weiter auf das Niveau sham-operierter Tiere. Analog dazu kam es zu einem deutlichen Anstieg der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit. Dieser perfusionsfördernde Effekt von G-CSF bei Administration eine Stunde vor Reperfusionbeginn beobachte-

ten auch Ueda und Mitarbeiter bei Myokardischämie [UEDA et al., 2006]. Ebenfalls waren intravitalmikroskopisch eine reduzierte sinusoidale Leukostase und venuläre Leukozytenadhäsion als Äquivalent der verringerten Rekrutierung von Leukozyten im Gewebe nachweisbar. Die hämatopoietischen Wirkungen von G-CSF beginnen übereinstimmend mit diesen Ergebnissen erst frühestens zwei Stunden nach einmaliger Injektion [DEMETRI und GRIF-FIN, 1991]. Die hepatozelluläre Apoptoserate blieb bei G-CSF behandelten Tieren sowohl nach Gabe vor Ischämie als auch vor Reperfusion [SOLAROGLU et al., 2006] konstant niedrig nahe der Nachweisgrenze. Auch im Bezug auf die Kupfferzell-Aktivität hatte der Applikationszeitpunkt nur geringen Einfluss auf die protektiven Wirkungen von G-CSF. Eine vom Injektionszeitpunkt abhängige Wirkung war hingegen bei Messung der Leberzellfunktion zu beobachten. Der Gallefluss wurde durch G-CSF eine Stunde vor Reperfusion deutlich gesteigert und reichte sogar nahe an Werte der sham-Gruppe heran, was den Rückschluss auf eine verbesserte funktionale Integrität der reperfundierten Leber zulässt. Noch deutlicher erscheint die Protektion bei Betrachtung der Leberenzyme. Die Konzentrationen von ALT, AST, GLDH und auch LDH wiesen die niedrigsten Werte aller I/R-Gruppen auf. Damit erstreckte sich der protektive Effekt von G-CSF eine Stunde vor Reperfusion nicht nur auf die funktionelle, sondern auch auf die strukturelle Integrität der Leberzellen. In Analogie hierzu war in der histomorphologischen Analyse eine Verminderung des I/R-induzierten Gewebeschadens zu verzeichnen. Die Vakuolisierung und Grobscholligkeit nahmen ab, die Kongestion verblieb mit den anderen Gruppen vergleichbar niedrig. Lediglich die Infiltration CAEgefärbter Leukozyten nahm geringfügig zu. Der Einfluss von G-CSF nach Applikation eine Stunde vor Reperfusion hatte auf die Konzentration der Entzündungsmediatoren wenig Einfluss. Die systemische Konzentration von TNF- α stieg nicht-signifikant an, die Konzentrationen von IL-6 und IL-10 blieben hinter denen der Tiere zurück, die G-CSF 16 bzw. eine Stunde vor Ischämie erhielten. Diese Konstellation ist am ehesten auf die kurze Einwirkdauer des G-CSF zurückzuführen. Der Stammzellefaktor schützt bei Injektion eine Stunde vor der Reperfusion durch Verbesserung der rheologischen Bedingungen das Gewebe vor dem Ischämie-Reperfusionsschaden [UEDA et al., 2006]. Zur Beschränkung der systemischen Inflammation und TNF- α -Suppression sind aber längere Einwirkphasen von Nöten [BUSCH et al., 2004].

Immunhistochemisch war nach Gabe von G-CSF eine Stunde vor Reperfusion eine Reduktion sowohl der NF- κ B- als auch pSTAT-5-positiver Zellkerne im Lebergewebe nachweisbar. Dies wurde durch Western Blot-Analysen bestätigt und stellt ein Zeichen der reduzierten Inflammation dar [LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006; GAO, 2005; YAMAURA et al., 2003]. Die signifikante Reduktion der iNOS-Expression durch G-CSF trägt durch den verringerten, iNOS-induzierten oxidativen Stress [HUR et al., 1999] in besonderem Maße zur Hepatoprotektion bei. Die in der Western Blot-Analyse beobachtete geringere Expression von

cleaved Caspase-3 hat zusammen mit der NF- κ B-Reduktion die Verminderung proapoptotischer und zytotoxischer Kaskaden in der Leberzelle [LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006] zur Folge. Die Reduktion der eigentlich hepatoprotektiv wirkenden Hämooxygenase-1 (HO-1)-Expression bestätigt die insgesamt abgeschwächte Inflammation, da HO-1 das Überschießen der Entzündung verhindert [TSUCHIHASHI et al., 2006].

Zusammenfassend sind die überwiegenden Vorteile der G-CSF Gabe vor Reperfusionbeginn gegenüber der Vorbehandlung vor Ischämiebeginn herauszustellen. Wesentliche Parameter, die für den Ischämie-Reperfusionsschaden verantwortlich gemacht werden, zeigen durch die Injektion von G-CSF zu beiden Zeitpunkten vor einsetzender Ischämie eine deutlich verbesserte Gewebepfusion. Ebenfalls konnte die systemische Inflammation begrenzt werden. Durch G-CSF-Gabe eine Stunde vor Reperfusion konnte die postischämische Gewebesituation weiter optimiert werden. Insbesondere durch die signifikante Verbesserung der Parenchymperfusion wurde die Leber vor Alteration geschützt. Somit erscheint die Gabe von G-CSF vor Reperfusionbeginn der Präkonditionierung mit G-CSF überlegen.

7.2.3 Wirkungen von Nitrogen Mustard auf das Lebergewebe nach Ischämie und Reperfusion

Zur Beobachtung der Auswirkungen einer systemischen Leukozytendepletion auf den Reperfusionsschaden wurde Versuchstieren das Chemotherapeutikum Nitrogen Mustard zwei Tage vor Beginn der Ischämie intravenös injiziert. Als alkylierendes und damit zytotoxisches Medikament wird es zur topischen Therapie von Lymphomen eingesetzt [KIM, 2003]. Systemisch appliziert stehen Knochenmarkdepression mit folgender Panzytopenie im Vordergrund [REYNOLDS et al., 1993]. Zur Etablierung der Leukozytendepletion bei ansonsten normaler Zellzahl im Blutkreislauf wurde im vorliegenden Modell die erforderliche Einwirkdauer des Medikamentes mittels Vorversuchen und engmaschigen Laborkontrollen ermittelt. Die Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard 48 Stunden vor Ischämie reduzierte die Anzahl der perfundierten Lebersinusoide am Ende der Reperfusion. Das sinusoidale Perfusionsversagen stieg im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Geringfügig stieg die venuläre Fließgeschwindigkeit in den perfundierten Arealen an. Die sinusoidale Leukostase und die venuläre Leukozytenadhäsion waren erwartungsgemäß signifikant reduziert. Bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung fehlten im Lebergewebe die Leukozyten nahezu vollständig. Hinsichtlich der hepatozellulären Apoptoserate waren mit der G-CSF-Therapie vergleichbare Para-

meter messbar. Nur geringe Wirkung zeigte Nitrogen Mustard auf die Kupfferzell-Aktivität nach Ischämie und Reperfusion. Die Clearance der injizierten Latexpartikel war nahezu identisch mit der NaCl-behandelten Tiere. Die Gallesekretion hingegen war nach der Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard im Vergleich zur Vorbehandlung mit den NaCl-Kontrolltieren mäßig erhöht. Die Bestimmung der Plasmaenzymaktivität der Lebertransaminasen zeigte eine massive Freisetzung von AST und ALT. Ebenfalls waren die systemische LDH-Aktivität in ähnlichem Ausmaß erhöht. Lediglich die GLDH-Konzentration nahm im Vergleich zur Kontrollgruppe ab, was die Schwere des Schadens etwas relativiert. Die lichtmikroskopische Untersuchung bestätigte die stattgefundenene Parenchymschädigung. Vakuolisierung, Kongestion und Grobscholligkeit nahmen nach Administration von Nitrogen Mustard 48 Stunden vor Ischämie gegenüber den mit NaCl behandelten Tieren signifikant zu. Die Anzahl der Leukozyten in der CAE-Färbung war entsprechend der Leukozytenzahlen im peripheren Blut nahezu null. Trotz systemischer Leukozytendepletion reduzierte sich die Entzündungsreaktion jedoch nicht. Die Konzentration von TNF- α nach Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard 48 Stunden vor Ischämie war im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen deutlich erhöht. Ebenso war eine signifikante Steigerung der Freisetzung von IL-6 zu verzeichnen und letztlich war auch IL-10 in erhöhter Konzentration nachweisbar.

Die Vorbehandlung mit Nitrogen Mustard sollte durch systemische Leukozytendepletion die lokale Akkumulation von Leukozyten in Leberparenchym nach Ischämie und Reperfusion verhindern. Das Ziel war es, die Leukozyten als bedeutender Faktor des Reperfusionsschadens auszuschalten und die Freisetzung von freien Radikalen oder gewebetoxischer Zytokine in den ischämischen Arealen zu unterbinden. Des Weiteren sollte die Entzündungsreaktion durch verminderte Freisetzung von TNF- α und anderen inflammatorischen Mediatoren reduziert werden. Die vorliegende Studie zeigt jedoch das genaue Gegenteil. Zwar sanken die Leukozytenzahlen sowohl systemisch als auch lokal an die Nachweisgrenze, die I/R-induzierte Gewebsschädigung wurde jedoch noch verstärkt. Dies ist wohl maßgeblich auf die toxischen Nebenwirkungen des Zellgiftes zurückzuführen, so dass mögliche protektive Effekte der Leukozytendepletion durch die toxischen Effekte von Nitrogen Mustard überlagert werden.

7.2.4 Mechanismen

Wie oben bereits erwähnt, werden die in dieser Studie beobachteten hepatoprotektiven Mechanismen der G-CSF-Medikation aufgrund des Beobachtungszeitraumes vornehm-

lich durch nicht-hämatopoietische Effekte von G-CSF vermittelt. Sie beruhen letztlich auf einer Verbesserung der Rheologie und der Reduktion der Inflammation.

In verschiedenen Studien wurde eine durchblutungsverbessernde und vasodilatierende Wirkung von G-CSF nachgewiesen [UEDA et al., 2006; SOLAROGLU et al., 2006b; LEE et al., 2005b]. Ueda und Mitarbeiter beobachteten eine verstärkte Stickstoffmonoxidproduktion nach G-CSF-Applikation in reperfundiertem Myokard, was sie auf eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung der endothelialen NOS, die bereits Minuten nach G-CSF-Gabe feststellbar ist, zurückführen konnten [UEDA et al., 2006]. Lee und Mitarbeiter wiesen in Analogie die G-CSF-induzierte eNOS-Aktivierung bei Hirnschämie nach [LEE et al., 2005b].

Somit führt eine verstärkte Expression der eNOS zur vermehrten NO-Produktion. Dies hat eine Vasodilatation zur Folge, was schließlich in eine verbesserte Gewebepfusion mündet. G-CSF führt weiterhin zur Steigerung der Expression [SCHABITZ et al., 2003] und Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch die JAK2-Kinase [UEDA et al., 2006; SOLAROGLU et al., 2006b], was im Gehirn die Anzahl der Apoptosen in Infarktarealen reduziert und damit zur Neuroprotektion beiträgt [SOLAROGLU et al., 2006b; SCHABITZ et al., 2003]. Weiterhin führt G-CSF ebenfalls zur vermehrten Expression von STAT5 [SLOAND et al., 2006]. STAT5 konnte als Transkriptionsfaktor mit protektiven Eigenschaften bei zerebraler Ischämie identifiziert werden [SUN et al., 2007].

Des Weiteren reduziert die Behandlung mit G-CSF bei Endotoxinämie die lokale und systemische Entzündungsreaktion. Vollmar und Mitarbeiter wiesen bei G-CSF-vorbehandelten Tieren eine signifikant reduzierte Leukozytenrekrutierung im Lebergewebe nach [VOLLMAR et al., 1997b]. Sowohl die sinusoidale als auch die venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion waren abgeschwächt. Dies resultierte in einer reduzierten Anzahl in das Parenchym eingewanderter Leukozyten. Ebenso konnte in dieser Studie eine Protektion der Kupfferzellen und eine Reduktion des Perfusionsausfalls durch G-CSF beobachtet werden. Diese Reduzierung der lokalen Entzündung hatte die Abschwächung der systemischen Inflammation zur Folge, was sich in geringen Plasmakonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine widerspiegelte [BUSCH et al., 2004]. Die Reduktion von proteolytischen Enzymen, freien Radikalen und entzündungsfördernder Zytokine wurde in anderen Modellen bestätigt [SOLAROGLU et al., 2006b]. Insbesondere die verstärkte Freisetzung von TNF- α mit folgender Chemotaxis für Leukozyten [COLLETTI et al., 1996b] und deren Reduktion durch G-CSF wurde von verschiedenen Autoren als gemeinsame Endstrecke der systemischen Inflammation nachgewiesen [BUSCH et al., 2004; KITABAYASHI et al., 1995; HARTUNG et al., 1995] und konnte in unserer Studie bei G-CSF-Administration 16 h und 1 h vor Ischämie ebenfalls beobachtet werden. Der Anstieg der TNF- α -Plasmakonzentration bei Tieren, die G-CSF 1 h vor Reperfusion erhielten, ist durch die Inhibierung der TNF- α -Produktion auf post-

transkriptionaler Ebene zu erklären [KITABAYASHI et al., 1995], die eine längere Wirkzeit von G-CSF voraussetzt. Die gesteigerte TNF- α -Freisetzung der Kupfferzellen nach G-CSF-Gabe bei Endotoxinämie nach einer zweistündigen Beobachtungszeit wurde von Görden und Mitarbeiter bereits beschrieben [GÖRGEN et al., 1992]. Die Reduktion der IL-6-Konzentration im Plasma durch G-CSF ist ein weiteres Merkmal der abgeschwächten lokalen Entzündung [BUSCH et al., 2004] und führt selbst wiederum zu einer reduzierten Aktivierung von Leukozyten und Makrophagen und damit zur reduzierten Freisetzung von freien Radikalen aus Makrophagen [BIFFL and MOORE., 1996] wie z.B. Kupfferzellen [BUSCH et al., 2004]. IL-6 bindet allerdings auch direkt an Hepatozyten und interagiert dort mit Membranglykoproteinen, was zur Aktivierung von Januskinasen (JAK) und Transkriptionsfaktoren wie STAT3 [LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006] und STAT5 [GAO, 2005; YAMAURA et al., 2003] und zur Induktion der Akute-Phase-Reaktion der Leber führt [TRAUTWEIN et al., 1994; ZHANG et al., 1996]. Die Aktivierung von STAT3 hat zwar die Transkription antiapoptisch wirksamer Gene zur Folge, insgesamt konnte aber die zentrale Bedeutung von IL-6 für die fortschreitende Leberschädigung von verschiedenen Autoren festgestellt werden [LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006].

Das anti-inflammatorische IL-10 dämpft die Entzündungsreaktion durch seine inhibitorische Wirkung auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B [SERRACINO-INGLOTT et al., 2001]. Allerdings beeinflussen nach neueren Studien hohe IL-10-Konzentrationen die Mortalität von Herzinfarktpatienten negativ [YIP et al., 2007]. Die von uns beobachtete Reduktion der IL-10-Konzentration im Plasma durch G-CSF, die auch im Endotoxinämiemodell nachgewiesen worden war [VOLLMAR et al., 2002], stellt somit im Rahmen der insgesamt verringerten Zytokin-Kaskaden-Aktivierung einen weiteren Teil der Hepatoprotektion dar.

Die Protektion von Leberparenchym auf funktioneller Ebene wird durch die Wiederherstellung der Galleexkretion durch G-CSF repräsentiert. Die ist Ausdruck der erhaltenen Syntheseleistung des Organs. Der I/R-induzierte Abfall der Galleproduktion [ACCATINO et al., 2003] wird durch die Administration von G-CSF gedämpft [VOLLMAR et al., 2002]. Dies setzt eine durch G-CSF verringerte Anzahl von Zelluntergängen voraus, was geringere Plasmaaktivitäten der Leberenzyme [VOLLMAR et al., 2002] sowie die histomorphologischen Analysen bestätigen.

Ischämie und Reperfusion und damit erhöhte TNF- α -Konzentrationen führen zur Aktivierung von Caspasen in der Leberzelle, die den apoptotischen Zelltod induzieren [LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006]. Des Weiteren werden Rezeptor-abhängige Signalkaskaden aktiviert, die in einer verstärkten Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B und Transkription abhängiger Gene münden [LUEDDE und TRAUTWEIN, 2006]. Die Bedeutung einer verstärkten NF- κ B-Expression bei Leberischämie und -reperfusion wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen [FAN et al., 2004; LUEDDE et al., 2005]. Somit sind die Reduktion

der NF- κ B-positiven Zellkerne als auch die geringere cleaved Caspase-3 Expression weitere Merkmale der G-CSF-induzierten Hepatoprotektion. Die signifikante Reduktion der iNOS-Induktion durch die Verringerung der NF- κ B-Expression nach G-CSF-Behandlung reduziert nicht nur die Produktion freier Radikale und damit den Organschaden [HUR et al., 1999], sondern führt selbst zu einer geringeren Aktivierung von NF- κ B und Expression von STAT3 und IL-6 [HIERHOLZER et al., 1998]. Die durch Ischämie und Reperfusion induzierte verstärkte Expression der Hämoxxygenase-1 (HO-1) schützt die Leberzellen vor oxidativem Stress und bremst die Entzündungsreaktion [TSUCHIHASHI et al., 2006]. Durch die insgesamt durch G-CSF reduzierte Inflammation ist in unserem Modell auch eine reduzierte HO-1-Expression zu beobachten.

7.3 Schlussfolgerung

Ist Lebergewebe über einen längeren Zeitraum von der Blutversorgung abgeschnitten, zum Beispiel bei der Lebertransplantation oder –operationen mit Unterbrechung der Perfusion, führt dies zu einer gestörten hepatischen Mikrozirkulation. Diese Mikrozirkulation ist auch nach Wiedereinsetzen der Leberdurchblutung deutlich beeinträchtigt und als vermindert messbar. Somit sind auch die Störungen des zellulären Energiestoffwechsels, die reduzierte Syntheseleistung der Leber und die hepatozelluläre Schädigung als direkte Konsequenz dieser Mangelversorgung mit Sauerstoff und energiereichen Substraten nachweisbar. Als Folge dieser Organschädigung kann sich ein akutes Leberversagen mit generalisiertem Schockzustand entwickeln, was das Leben der Patienten massiv bedroht.

Als wichtiger Bestandteil der post-ischämischen Mikrozirkulationsstörung steht die Inflammation im Zentrum des Interesses. Nach Aktivierung verschiedener Mediatorsysteme sind die Leukozyten die Effektorzellen der ausgelösten Entzündungsreaktion. Die Depletion der Leukozyten durch Nitrogen Mustard zeigte jedoch keine protektive Wirkungen auf den post-ischämischen Reperfusionsschaden. Die hepato-toxischen Nebenwirkungen des Alkylanz verdeckten eventuelle entzündungsdämpfende Effekte und führten selbst zur Leberschädigung.

Die Gabe von G-CSF hatte hingegen eine Protektion zur Folge und konnte das post-ischämische Perfusionsversagen vermindern. Eine wiederhergestellte nutritive Versorgung der Leber führte zur geringeren Inflammation, verbesserter Syntheseleistung und zellulären Integrität des Leberparenchyms. Deutliche Unterschiede zeigten sich bezüglich des Applikationsszeitpunktes von G-CSF. Die Gabe kurz vor Wiedereinsetzen der Reperfusion erwies sich gegenüber der Injektion vor Ischämie als überlegen. Die Protektion der Leber vor dem

Reperfusionsschaden konnte so nochmals gesteigert werden. Der protektive Effekt des Stammzellsfaktors erklärt sich durch die nicht-hämatopoietischen Wirkungen von G-CSF. G-CSF bremst die lokale und systemische Entzündungsreaktion, verbessert die Perfusion des Lebergewebes und reduziert somit die Akkumulation von aktivierten Leukozyten im Parenchym, die zur Unterhaltung der Entzündung beitragen.

Somit könnte die Applikation von G-CSF eine Stunde vor Beginn der Reperfusion einen therapeutischen Ansatz darstellen, um den post-ischämischen Reperfusionsschaden der Leber zu vermindern.

8 Literatur

- Accatino L, Pizarro M, Solís N, Arrese M, Koenig CS (2003) Bile secretory function after warm hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Liver Transpl.* 9:1199-1210.
- Agnello D, Mascagni P, Bertini R, Villa P, Senaldi G, Ghezzi P (2004) Granulocyte colony-stimulating factor decreases tumor necrosis factor production in whole blood: role of interleukin-10 and prostaglandin E(2). *Eur Cytokine Netw.* 15:323-326.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357:593-615.
- Almersjo O, Bengmark S, Domellof L, Hafstrom L (1971) Immediate effects of short-term hepatic and splanchnic ischemia in pigs. *Am J Surg.* 122:91-94.
- Almond NE, Wheatley AM (1992) Measurement of hepatic perfusion in rats by laser Doppler flowmetry. *Am J Physiol.* 262:203-209.
- Ames A 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G (1968) Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol.* 52:437-453.
- Arii S, Monden K, Itai S, Sasaoki T, Shibagaki M, Tobe T (1988) The three different phases of reticuloendothelial system phagocytic function in rats with liver injury. *J Surg Res.* 45:314-319.
- Arvidsson D, Svensson H, Haglund U (1988) Laser-Doppler flowmetry for estimating liver blood flow. *Am J Physiol.* 254:471-476.
- Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP (1985) Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers. *Transplantation.* 40:584-590.
- Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F (1995) Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp.* 15:85-91.
- Babbs CF, Salaris SC, Turek JJ (1991) Cytochemical studies of hydrogen peroxide generation in postischemic hepatocytes. *Am J Physiol.* 260:H123-129.
- Baeuerle PA, Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 12:141-179.
- Bagby G, Shaw G, Brown M, Damm D, Hefeneider S, Heinrich M, Band L Segal G (1988) IL-1 induces GM-CSF mRNA accumulation in human stromal cells (HSC) by inducing ribonuclease inhibitory activity. *Blood.* 72:347
- Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H (2001) Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:G1188-1195.
- Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White SA, Prasad KR (2005) Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg.* 92:528-538.
- Bargatze RF, Kurk S, Butcher EC, Jutila MA (1994) Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med.* 1;180:1785-1792.
- Beach PM, Torres E, Litton A, Kundsinn R (1965) Acute occlusion of the portal vein in dogs. *Surg Gynecol Obstet.* 121:761-766.
- Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O (1999) Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg.* 229:369-375.
- Bell FP, Essani NA, Manning AM, Jaeschke H. (1997) Ischaemia-reperfusion activates the nuclear transcription factor NF-kB and upregulates messenger RNA synthesis of adhesion molecules in the liver in vivo. *Hepatol Res.* 8:178-188
- Bereiter-Hahn J, Seipel KH, Voth M, Ploem JS (1983) Fluorimetry of mitochondria in cells vitally stained with DASPMI or rhodamine 6 GO. *Cell Biochem Funct.* 1:147-155.
- Biffi WL, Moore EE (1996) Splanchnic ischaemia/reperfusion and multiple organ failure. *Br J Anaesth.* 77:59-70.
- Blankensteijn JD, Terpstra OT (1991) Liver preservation: the past and the future. *Hepatology.* 13:1235-1250.
- Bloch EH (1955) The in vivo microscopic vascular anatomy and physiology of the liver as determined with the quartz rod method of transillumination. *Angiology.* 6:340-349.
- Boutillier RG (2001) Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *J Exp Biol.* 204:3171-3181.

- Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E (1986) Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology*. 6:718-722.
- Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC (1987) Bile flow--an index of ischemic injury. *J Surg Res*. 42:565-569.
- Burgess AW, Metcalf D (1980) Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer*. 26:647-654.
- Burkhardt M, Vollmar B, Menger MD (1998) In vivo analysis of hepatic NADH fluorescence. Methodological approach to exclude Ito-cell vitamin A-derived autofluorescence. *Adv Exp Med Biol*. 454:83-89.
- Burnett AL (2006) The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 8:53-62.
- Busch CJ, Wanner GA, Menger MD, Vollmar B (2004) Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) reduces not only gram-negative but also gram-positive infection-associated proinflammatory cytokine release by interaction between Kupffer cells and leukocytes. *Inflamm Res*. 53:205-210.
- Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ (1991) Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology*. 13:83-95.
- Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ (1990) Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res*. 66:1436-1444.
- Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*. 84:2068-2101.
- Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE (1979) Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery*. 85:205-211.
- Chen YX, Sato M, Kawachi K, Abe Y (2006) Neutrophil-mediated liver injury during hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 5:436-442.
- Child CG, Milnes RF, Holswade GR, Gore AL (1950) Sudden and complete occlusion of the portal vein in the macaca mulatta monkey. *Ann. Surg*. 132: 475-491.
- Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM (1992) Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. *Transplantation*. 53:957-978.
- Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX (1997) Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock*. 8:80-85.
- Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE (1985) Hepatic microcirculatory failure after ischemia and reperfusion: improvement with ATP-MgCl₂ treatment. *Am J Physiol*. 248:804-811.
- Cohen AM, Zsebo KM, Inoue H, Hines D, Boone TC, Chazin VR, Tsai L, Ritch T, Souza LM (1987) In vivo stimulation of granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:2484-2488.
- Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM (1996a) The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*. 23:506-514.
- Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA (1990) Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alternations after hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest*. 85:1936-1943
- Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG (1992) Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat--an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation*. 54:199-204.
- Corso CO, Okamoto S, Ruttinger D, Messmer K (1999) Hypertonic saline dextran attenuates leukocyte accumulation in the liver after hemorrhagic shock and resuscitation. *J Trauma*. 46:417-423.
- De Bruyn PP, Robertson RC, Farr RS (1950) In vivo affinity of diaminoacridines for nuclei. *Anat Rec*. 108:279-307.
- De Figueiredo LL, de Abreu e Lima RS, Rego EM (2004) Granulocyte colony-stimulating factor and leukemogenesis. *Mediators Inflamm*. 13:145-50.
- De Greef KE, Ysebaert DK, Ghielli M, Vercauteren S, Nouwen EJ, Eyskens EJ, De Broe ME (1998) Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol*. 11:110-122.
- Decker K (1990) Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem*. 192:245-261.
- Del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 22:1276-1283.

- Delva E, Camus Y, Nordlinger B, Hannoun L, Parc R, Deriaz H, Lienhart A, Huguet C (1989) Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg.* 209:211-208.
- Delva E, Camus Y, Paugam C, Parc R, Huguet C, Lienhart A (1987) Hemodynamic effects of portal triad clamping in humans. *Anesth Analg.* 66:864-868.
- Demetri GD, Ernst TJ, Pratt ES 2nd, Zenzie BW, Rheinwald JG, Griffin JD (1990) Expression of ras oncogenes in cultured human cells alters the transcriptional and posttranscriptional regulation of cytokine genes. *J Clin Invest.* 86:1261-1269.
- Demetri GD, Griffin JD (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood.* 78:2791-2808.
- Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Petronilli V (1998) The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta.* 1366:69-78.
- Dietzmann K, Letko G, Sokolowski A (1987) Mitochondrial membrane potential in living cells: evidence from studies with rhodamine 6 G as fluorescent probe. *Exp Pathol.* 31:47-51.
- Dillard MG, Dujovne I, Pollak VE, Pirani CL (1973) The effect of treatment with prednisone and nitrogen mustard on the renal lesions and life span of patients with lupus glomerulonephritis. *Nephron.* 10:273-291.
- Dirsch O, Chi H, Ji Y, Gu YL, Broelsch CE, Dahmen U (2006) Administration of granulocyte colony stimulating factor after liver transplantation leads to an increased incidence and severity of ischemic biliary lesions in the rat model. *World J Gastroenterol.* 12:5021-5027.
- Duling BR, Berne RM (1970) Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in local regulation of blood flow. *Circ Res.* 27:669-678.
- Dulundu E, Ozel Y, Topaloglu U, Sehirlir O, Ercan F, Gedik N, Sener G (2007) Alpha-Lipoic Acid Protects against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Pharmacology.* 79:163-170
- Eguchi H, McCuskey PA, McCuskey RS (1991) Kupffer cell activity and hepatic microvascular events after acute ethanol ingestion in mice. *Hepatology.* 13:751-757.
- Elbaz O, Budel LM, Hoogerbrugge H, Touw IP, Delwel R, Mahmoud LA, Lowenberg B (1991) Tumor necrosis factor downregulates granulocyte-colony-stimulating factor receptor expression on human acute myeloid leukemia cells and granulocytes. *J Clin Invest.* 87:838-841.
- El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B (2004) Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necroptosis. *Hepatology.* 39:1553-1562.
- Ellis CG, Tymi K, Groom AC (1986) Computer-assisted analysis of video images: a new tool for microvascular measurement. *Microcirculatory technology.* pp 229-244.
- Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS (1983) Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol.* 111:98-111.
- Ernst TJ, Ritchie AR, Demetri GD, Griffin JD (1989) Regulation of granulocyte- and monocyte-colony stimulating factor mRNA levels in human blood monocytes is mediated primarily at a post-transcriptional level. *J Biol Chem.* 264:5700-5703.
- Essani NA, McGuire GM, Manning AM, Jaeschke H (1996) Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor kappa B and expression of E-selectin messenger RNA in hepatocytes, Kupffer cells, and endothelial cells in vivo. *J Immunol.* 156:2956-2963.
- Fan C, Li Q, Zhang Y, Liu X, Luo M, Abbott D, Zhou W, Engelhardt JF (2004) IkappaBalpha and IkappaBbeta possess injury context-specific functions that uniquely influence hepatic NF-kappaB induction and inflammation. *J Clin Invest.* 113:746-755.
- Farkouh EF, Daniel AM, Beaudoin JG, MacLean LD (1971) Predictive value of liver biochemistry in acute hepatic ischemia. *Surg Gynecol Obstet.* 132:832-838.
- Ferguson D, McDonagh PF, Biewer J, Paidas CN, Clemens MG (1993) Spatial relationship between leukocyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia. *Int J Microcirc Clin Exp.* 12:45-60.
- Fisher MA, Eversole RR, Beuving LJ, Jaeschke H (1997) Sinusoidal endothelial cell and parenchymal cell injury during endotoxemia and hepatic ischemia-reperfusion: protection by the 21-aminosteroid titilazad mesylate. *Int Hepatol Commun.* 6:121-129.
- Flores J, DiBona DR, Beck CH, Leaf A (1972) The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J Clin Invest.* 51:118-126.
- Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF (1990) The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet.* 170:363-378.

- Frederiks WM, Myagkaya GL, Bosch KS, Fronik GM, van Veen H, Vogels IM, James J (1983) The value of enzyme leakage for the prediction of necrosis in liver ischemia. *Histochemistry*. 78:459-472.
- Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Nagata S (1990a) Purification and characterization of the receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem*. 265:14008-14015.
- Fukunaga R, Ishizaka-Ikeda E, Seto Y, Nagata S (1990b) Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. *Cell*. 61:341-350.
- Gabrilove JL, Jakubowski A, Fain K, Grous J, Scher H, Sternberg C, Yagoda A, Clarkson B, Bonilla MA, Oettgen HF (1988a) Phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium. *J Clin Invest*. 82:1454-1461.
- Gabrilove JL, Jakubowski A, Scher H, Sternberg C, Wong G, Grous J, Yagoda A, Fain K, Moore MA, Clarkson B (1988b) Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia and associated morbidity due to chemotherapy for transitional-cell carcinoma of the urothelium. *N Engl J Med*. 318:1414-1422.
- Gao B (2005) Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol Immunol*. 2:92-100.
- Gelman SI (1976) Disturbances in hepatic blood flow during anesthesia and surgery. *Arch Surg*. 111:881-883.
- Gelman SI, Dillard E, Bradley EL Jr. (1987) Hepatic circulation during surgical stress and anesthesia with halothane, isoflurane, or fentanyl. *Anesth Analg*. 66:936-943.
- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M (2005) Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit*. 11:337-345.
- Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD (2003) Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol*. 38:59-66.
- Gonce ME, Brackett DJ, Squires RA, Gibson DD, Balla AK, Lerner MR, McCay PB, Pennington LR (1995) Development of circulatory and metabolic shock following transient portal triad occlusion. *J Surg Res*. 59:534-543.
- Gorgen I, Hartung T, Leist M, Niehorster M, Tiegs G, Uhlig S, Weitzel F, Wendel A (1992) Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*. 149:918-924.
- Goto M, Kawano S, Yoshihara H, Takei Y, Hijioka T, Fukui H, Matsunaga T, Oshita M, Kashiwagi T, Fusamoto H (1992) Hepatic tissue oxygenation as a predictive indicator of ischemia-reperfusion liver injury. *Hepatology*. 15:432-437.
- Goto M, Takei Y, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Masuda E, Nishimura Y, Okumura S, Kashiwagi T, Fusamoto H (1994) Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology*. 19:675-681.
- Gouma DJ, Coelho JC, Schlegel J, Fisher JD, Li YF, Moody FG (1986) Estimation of hepatic blood flow by hydrogen gas clearance. *Surgery*. 99:439-445.
- Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB (1989) Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. G257:683-688.
- Granger DN, Kubes P (1994) The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol*. 55:662-675.
- Grisham MB, Everse J, Janssen HF (1988) Endotoxemia and neutrophil activation in vivo. *Am J Physiol*. 254:H1017-1022.
- Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN (1986) Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol*. G251:567-574.
- Gumucio JJ (1989) Hepatocyte heterogeneity: the coming of age from the description of a biological curiosity to a partial understanding of its physiological meaning and regulation. *Hepatology*. 9:154-160.
- Gumucio JJ, Miller DL, Krauss MD, Zanolli CC. (1981) Transport of fluorescent compounds into hepatocytes and the resultant zonal labeling of the hepatic acinus in the rat. *Gastroenterology*. 80:639-646.
- Hamano K, Tsuboi H, Seyama A, Esato K (1993) Shock-reinfusion injury to the central organs and the effect of free radical scavengers in the rat. *Surg Today*. 23:891-896.
- Hanzon F (1952) Liver cell secretion under normal and pathologic conditions studied by fluorescence microscopy on living rats. *Acta Physiol. Scand*. 28 (Suppl. 1), 1-268.
- Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I (2005) G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med*. 11:305-311.

- Harbrecht BG, Wu B, Watkins SC, Marshall HP Jr, Peitzman AB, Billiar TR (1995) Inhibition of nitric oxide synthase during hemorrhagic shock increases hepatic injury. *Shock*. 4:332-337.
- Hartung T, Döcke WD, Gantner F, Krieger G, Sauer A, Stevens P, Volk HD, Wendel A (1995) Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers. *Blood*. 85:2482-2489.
- Hasegawa H, Takano H, Shiraishi H, Ueda K, Niitsuma Y, Tadokoro H, Komuro I (2006) Intracoronary injection of granulocyte colony-stimulating factor ameliorates the progression of left ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. *Circ J*. 70:942-944.
- Hashimoto Y, Itoh K, Nishida K, Okano T, Miyazawa Y, Okinaga K (1994) Rapid superoxide production by endothelial cells and their injury upon reperfusion. *J Surg Res*. 57:693-697.
- Hasselgren PO (1987) Prevention and treatment of ischemia of the liver. *Surg Gynecol Obstet*. 164:187-196.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 374:1-20.
- Henderson JM (1999) Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepatogastroenterology*. 46:1482-1484.
- Hierholzer C, Harbrecht B, Menezes JM, Kane J, MacMicking J, Nathan CF, Peitzman AB, Billiar TR, Tweardy DJ (1998) Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med*. 187:917-928.
- Higuti T, Niimi S, Saito R, Nakasima S, Ohe T, Tani I, Yoshimura T (1980) Rhodamine 6G, inhibitor of both H⁺-ejections from mitochondria energized with ATP and with respiratory substrates. *Biochim Biophys Acta*. 593:463-467.
- Hiraoka Y, Sedat JW, Agard DA (1987) The use of a charge-coupled device for quantitative optical microscopy of biological structures. *Science*. 238:36-41.
- Hochachka PW (1986) Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*. 231:234-241.
- Huguet C, Addario-Chieco P, Gavelli A, Arrigo E, Harb J, Clement RR (1992a) Technique of hepatic vascular exclusion for extensive liver resection. *Am J Surg*. 163:602-605.
- Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, Jobard J, Gramaglia M, Lasserre M (1992b) Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery*. 111:251-259.
- Huguet C, Nordlinger B, Bloch P, Conard J (1978) Tolerance of the human liver to prolonged normothermic ischemia. A biological study of 20 patients submitted to extensive hepatectomy. *Arch Surg*. 113:1448-1451.
- Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, Lee JH (199) Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*. 11;261:917-922.
- Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR (1975) Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res*. 10:165-179.
- Intaglietta M, Tompkins WR (1973) Microvascular measurements by video image shearing and splitting. *Microvasc Res*. 5:309-312.
- Jaeschke H (1997) Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am J Physiol*. 273:G602-611.
- Jaeschke H (2003) Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 284:15-26.
- Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ (1992) Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol*. 52:377-382.
- Jaeschke H, Farhood A (1991) Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol*. 260:G355-362.
- Jaeschke H, Farhood A, Smith CW (1990) Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *Faseb J*. 4:3355-3359.
- Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA (1996) Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol*. 139:213-226.
- Jerome SN, Smith CW, Korthuis RJ (1993) CD18-dependent adherence reactions play an important role in the development of the no-reflow phenomenon. *Am J Physiol*. 264:H479-483.
- Jolly PC, Foster JH (1963) Hepatic inflow stasis. *Surgery*. 54:45-55.

- Joseph J, Rimawi A, Mehta P, Cottler-Fox M, Sinha A, Singh BK, Pacheco R, Smith ES 3rd, Mehta JL (2006) Safety and effectiveness of granulocyte-colony stimulating factor in mobilizing stem cells and improving cytokine profile in advanced chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 97:681-684.
- Kako K, Kato M, Matsuoka T, Mustapha A (1988) Depression of membrane-bound Na⁺-K⁺-ATPase activity induced by free radicals and by ischemia of kidney. *Am J Physiol.* 254:C330-337.
- Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T, Tagawa K, Ikeda Y, Nakao K, Kawashima Y (1982) Changes in cellular levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. *J Biochem (Tokyo).* 91:1349-1356.
- Kawamoto S, Tashiro S, Miyauchi Y, Inoue M (1991) Mechanism for enterohepatic injury caused by circulatory disturbance of hepatic vessels in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med.* 198:629-635.
- Kayyali US, Donaldson C, Huang H, Abdelnour R, Hassoun PM (2001) Phosphorylation of xanthine dehydrogenase/oxidase in hypoxia. *J Biol Chem.* 276:14359-14365.
- Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, Hutter J, Messmer K, Krombach F (2002) P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock.* 18:529-535.
- Kim H, Kim KH (1998) Role of nitric oxide in oxidative damage in isolated rabbit gastric cells exposed to hypoxia-reoxygenation. *Dig Dis Sci.* 43:1042-1049.
- Kim YH (2003) Management with topical nitrogen mustard in mycosis fungoides. *Dermatol Ther.* 16:288-298.
- Kitabayashi A, Hirokawa M, Hatano Y, Lee M, Kuroki J, Niitsu H, Miura AB (1995) Granulocyte colony-stimulating factor downregulates allogeneic immune responses by posttranscriptional inhibition of tumor necrosis factor- α production. *Blood.* 86:2220-2227.
- Kitagawa S, Yuo A, Souza LM, Saito M, Miura Y, Takaku F (1987) Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor enhances superoxide release in human granulocytes stimulated by the chemotactic peptide. *Biochem Biophys Res Commun.* 144:1143-1146.
- Kleine FD (1965) Die diagnostische Bedeutung des De-Ritis-Quotienten. *Dtsch. Zeitschr. f. Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten.* 25:355-362.
- Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB (1974) The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 54:1496-1508.
- Knisely MH (1939) Microscopic observations of the circulatory conditions in living frog liver lobules. *Anat.Rec.* 73:169-270.
- Knisely MH, Harding F, Debacker H (1957) Hepatic sphincters; brief summary of present-day knowledge. *Science.* 125:1023-1026.
- Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Sugiyama S, Ozawa T, Takagi H (1991) Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *J Surg Res.* 51:240-244.
- Koeffler HP, Gasson J, Tobler A (1988) Transcriptional and posttranscriptional modulation of myeloid colony-stimulating factor expression by tumor necrosis factor and other agents. *Mol Cell Biol.* 8:3432-3438.
- Komatsu H, Koo A, Guth PH (1990) Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation. *Microvasc Res.* 40:1-13.
- Konno H, Lowe PJ, Hardison WG, Miyai K, Nakamura S, Baba S (1992) Breakdown of hepatic tight junctions during reoxygenation injury. *Transplantation* 53:1211-1214.
- Koo A (1986) Liver microvascular flow in rats: quantitation by laser Doppler flowmetric technique and effects of sodium dehydrocholate. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 1: 347-358.
- Koo A, Breit G, Intaglietta M (1988) Leukocyte adherence in hepatic microcirculation in ischemia reperfusion. *Microcirculation in circulatory disorders*, Springer, Berlin-New York-Tokyo. pp 205-213.
- Koo A, Liang IY (1977) Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat. *Microvasc Res.* 13:315-325.
- Kubes P, Payne D, Woodman RC (2002) Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in postischemic liver microcirculation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283:139-147.
- Kunz R, Brune HA, Ziegler U, Marzinzig M, Beger HG (1991) Ischemia/reperfusion damage of the liver caused by free radicals--direct radical detection using electron spin resonance (ESR) *Langenbecks Arch Chir.* 376:139-142.
- Lapointe DS, Olson MS (1989) Alteration of hepatic tissue spaces by platelet-activating factor and phenylephrine. *Hepatology.* 9:278-284.

- Larsen A, Davis T, Curtis BM, Gimpel S, Sims JE, Cosman D, Park L, Sorensen E, March CJ, Smith CA (1990) Expression cloning of a human granulocyte colony-stimulating factor receptor: a structural mosaic of hematopoietin receptor, immunoglobulin, and fibronectin domains. *J Exp Med.* 172:1559-1570.
- Lawrence MB, Springer TA (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell.* 65:859-873.
- Lebrec D, Blanchet L, Lacroix S (1981) Measurement of hepatic blood flow in the rat using fractional clearance of indocyanine green and colloidal radiogold. *Pflugers Arch.* 391:353-354.
- Lee ST, Chu K, Jung KH, Ko SY, Kim EH, Sinn DI, Lee YS, Lo EH, Kim M, Roh JK (2005) Granulocyte colony-stimulating factor enhances angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1058:120-128.
- Lee WY, Lee SM (2005a) Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver. *Shock.* 24:370-375.
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A (1994) Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol.* 153:1778-1788.
- Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ (2000) Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 32:169-173.
- Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282:227-241.
- Li XK, Matin AF, Suzuki H, Uno T, Yamaguchi T, Harada Y (1993) Effect of protease inhibitor on ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation.* 56:1331-1336.
- Lichtman MA (1990) Rheology of leukocytes, leukocyte suspensions and blood in leukemia. *J Clin Invest.* 52:561-576.
- Littauer A, de Groot H (1992) Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria. *Am J Physiol.* 262:G1015-1020.
- Longnecker DE, Seyde WC (1986) Anesthetic regimes: Advantages and disadvantages. In: *Microcirculatory technology.* Academic Press, Orlando. pp 343-365.
- Lopez AF, Nicola NA, Burgess AW, Metcalf D, Battye FL, Sewell WA, Vadas M (1983) Activation of granulocyte cytotoxic function by purified mouse colony-stimulating factors. *J Immunol.* 131:2983-2988.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275.
- Luedde T, Assmus U, Wüstefeld T, Meyer zu Vilsendorf A, Roskams T, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K, Brenner DA, Manns MP, Pasparakis M, Trautwein C (2005) Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 115:849-859.
- Luedde T, Trautwein C (2006) Intracellular survival pathways in the liver. *Liver Int.* 26:1163-1174.
- Mackenzie RJ, Furnival CM, Wood CB, O'Keane MA, Blumgart LH (1977) The effects of prolonged hepatic ischaemia before 70 per cent partial hepatectomy in the dog. *Br J Surg.* 64:66-69.
- MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC (1992) Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol.* 263:G17-23.
- Marshall JC, Christou NV, Horn R, Meakins JL (1988) The microbiology of multiple organ failure. The proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens. *Arch Surg.* 123:309-315.
- Martinez-Silvestre A, Marco I, Rodriguez-Dominguez MA, Lavin S, Cuenca R (2005) Morphology, cytochemical staining, and ultrastructural characteristics of the blood cells of the giant lizard of El Hierro (*Gallotia simonyi*). *Res Vet Sci.* 78:127-134.
- Marzi I, Knee J, Menger MD, Harbauer G, Buhren V (1991) Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model. *Transplantation.* 52:432-436.
- Marzi I, Takei Y, Knee J, Menger M, Gores GJ, Buhren V, Trentz O, Lemasters JJ, Thurman RG (1990) Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc.* 22:2004-2005.
- Matsuda S, Shirafuji N, Asano S (1989) Human granulocyte colony-stimulating factor specifically binds to murine myeloblastic NFS-60 cells and activates their guanosine triphosphate binding proteins/adenylate cyclase system. *Blood.* 74:2343-2348.
- Mavier P, Guigui B, Preaux AM, Rosenbaum J, Lescs MC, Zafrani ES, Dhumeaux D (1988) In vitro toxicity of hydrogen peroxide against normal vs. tumor rat hepatocytes: role of catalase and of the glutathione redox cycle. *Hepatology.* 8:1673-1678.

- Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*. 74:541-554.
- Mazzoni MC, Borgstrom P, Intaglietta M, Arfors KE (1990) Capillary narrowing in hemorrhagic shock is rectified by hyperosmotic saline-dextran reinfusion. *Circ Shock*. 3:407-418.
- McCuskey RS (1986) Microscopic methods for studying the microvasculature of internal organs. In: *Microcirculatory technology*. Academic Press, Orlando. pp 247-264.
- McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM (1988) Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation*. 46:178-191.
- Mejia RH (1964) Hypovolemic shock in the white rat. *Acta Physiol Lat Am*. 14:77-85.
- Menger MD, Lehr HA (1993a) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol. Today*. 14:519-522.
- Menger MD, Lehr HA, Messmer K (1991a) Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury. *Klin Wochenschr*. Dec 15. 69:1050-1055. Erratum in: *Klin Wochenschr* 1990 Dec 30. 69:1185.
- Menger MD, Marzi I, Messmer K (1991b) In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res*. 23:158-169.
- Menger MD, Messmer K (1993b) Can laser Doppler flowmetry detect spontaneous arteriolar vasomotion? *Prog. Appl. Microcirc*. 20: 27-33.
- Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K (1992b) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". *Am J Physiol*. 263:1901-1906.
- Menger MD, Sack FU, Hammersen F, Messmer K (1989) Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effect of prophylactic isovolemic hemodilution. *Adv Exp Med Biol*. 248:387-395.
- Menger MD, Steiner D, Messmer K (1992a) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol*. 263:1892-1900.
- Menger MD, Vollmar B (1994) In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin. *Microsurgery*. 15:383-389.
- Metcalf D (1980) Clonal extinction of myelomonocytic leukemic cells by serum from mice injected with endotoxin. *Int J Cancer*. 25:225-233.
- Metzger HP, Schywalsky M (1992) Intraorgan differences of blood flow, oxygen supply and glycogen content in the multilobular liver of normal and hemorrhagic rats. *Int J Microcirc Clin Exp*. 11:67-83.
- Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, Arai M, Misao Y, Lu C, Suzuki K, Goto K, Komada A, Takahashi T, Kosai K, Fujiwara T, Fujiwara H (2004) Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation*. 109:2572-2580.
- Mubashir BA, Shullenberger CC, Gamble JF (1973) Treatment of advanced Hodgkin's disease with combination chemotherapy. *South Med J*. 66:779-784.
- Nakamura S, Nishiyama R, Serizawa A, Yokoi Y, Suzuki S, Konno H, Baba S, Muro H (1995) Hepatic release of endothelin-1 after warm ischemia. Reperfusion injury and its hemodynamic effect. *Transplantation*. 59:679-684.
- Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A (1990) Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obstet*. 171:120-125.
- Neto JS, Nakao A, Kimizuka K, Romanosky AJ, Stolz DB, Uchiyama T, Nalesnik MA, Otterbein LE, Murase N (2004) Protection of transplant-induced renal ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide. *Am J Physiol Renal Physiol*. 287:979-989.
- Nicola NA (1989) Hemopoietic cell growth factors and their receptors. *Annu Rev Biochem*. 58:45-77.
- Nicola NA, Metcalf D (1985) Binding of 125I-labeled granulocyte colony-stimulating factor to normal murine hemopoietic cells. *J Cell Physiol*. 124:313-321.
- Nicola NA, Metcalf D, Matsumoto M, Johnson GR (1983) Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem*. 258:9017-9023.
- Nicola NA, Vadas MA, Lopez AF (1986) Down-modulation of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human neutrophils by granulocyte-activating agents. *J Cell Physiol*. 128:501-509.
- Nishimura N, Tohyama C, Satoh M, Nishimura H, Reeve VE (1999) Defective immune response and severe skin damage following UVB irradiation in interleukin-6-deficient mice. *Immunology*. 97:77-83.

- Nishimura T, Yoshida Y, Watanabe F, Koseki M, Nishida T, Tagawa K, Kawashima Y (1986) Blood level of mitochondrial aspartate aminotransferase as an indicator of the extent of ischemic necrosis of the rat liver. *Hepatology*. 6:701-707.
- Nordlinger B, Douvin D, Javaudin L, Bloch P, Aranda A, Boschat M, Huguet C (1980) An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia. *Surg Gynecol Obstet*. 150:859-864.
- Nunes G, Blaisdell FW, Margaretten W (1970) Mechanism of hepatic dysfunction following shock and trauma. *Arch Surg*. 100:546-556.
- Ohkawa M, Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE (1984) ATP-MgCl₂ produces sustained improvement in hepatic mitochondrial function and blood flow after hepatic ischemia. *J Surg Res*. 37:226-234.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:10344-10349.
- Ottmann OG, Bug G, Krauter J (2007) Current status of growth factors in the treatment of acute myeloid and lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 44:183-192.
- Panasci L, Xu ZY, Bello V, Aloyz R (2002) The role of DNA repair in nitrogen mustard drug resistance. *Anticancer Drugs*. :211-20.
- Parks DA, Granger DN (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl*. 548:87-99.
- Parratt JR (1998) Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother*. 41:31-39.
- Perler BA, Tohmeh AG, Bulkley GB (1990) Inhibition of the compartment syndrome by the ablation of free radical-mediated reperfusion injury. *Surgery*. 108:40-47.
- Pielop JA, Brownell I, Duvic M (2003) Mycosis fungoides associated with malignant melanoma and dysplastic nevus syndrome. *Int J Dermatol*. 42:116-122.
- Pober JS. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture (1988) Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. *Physiology and pathology*. *Am J Pathol*. 133:426-433
- Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Bensard DD, Anderson BO, Banerjee A (1992) Liver injury is a reversible neutrophil-mediated event following gut ischemia. *Arch Surg*. 127:175-179.
- Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzales AP, Menger MD (1993b) Hepatic reperfusion injury following cold ischemia in the rat: potentials of quantitative analysis by in vivo fluorescence microscopie. *Prog. Appl. Microcirc*. 19:152-166.
- Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD (1993a) Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology*. 18:1490-1497.
- Pringle JH (1908) Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due of trauma. *Ann. Surg*. 48:541-549.
- Ramalho FS, Fernandez-Monteiro I, Rosello-Catafau J, Peralta C (2006) Hepatic microcirculatory failure. *Acta Cir Bras*. 1:48-53.
- Rao PN, Walsh TR, Makowka L, Rubin RS, Weber T, Snyder JT, Starzl TE (1990) Purine nucleoside phosphorylase: a new marker for free oxygen radical injury to the endothelial cell. *Hepatology*. 11:193-198.
- Rappaport AM (1958) The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec*. 130:673-689.
- Rappaport AM (1973) The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res*. 6:212-228.
- Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN (1954) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec*. 119:11-33.
- Rauen U, Komarov P, Gyenes M, Hanssen M, de Groot H (1994) Differences in the mechanisms of damage to Kupffer cells and liver endothelial cells during preservation in UW solution. *Zentralbl Chir*. 119:322-327.
- Reynolds JEF: Martindale (1993) *The Extra Pharmacopoeia*, 30th ed. London. The Pharmaceutical Press.
- Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA (2002) Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg*. 235:400-407.
- Sáenz de Tejada I (2002) Molecular mechanisms for the regulation of penile smooth muscle contractility. *Int J Impot Res*. 1:6-10.
- Sato T (1987) New method for measurement of hepatic blood flow in the rat using thermodilution method. *Circ. Shock*. 21:31-37.

- Schabitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Scholzke MN, Sommer C, Schwab S (2003) Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 34:745-751.
- Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS, Hinshaw DB (1989) Evidence for neutrophil-related acute lung injury after intestinal ischemia-reperfusion. *Surgery*. 106:195-201.
- Schmid-Schonbein GW, Usami S, Skalak R, Chien S (1980) The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc Res*. 19:45-70.
- Schmidt E, Schmidt FW (1987) Enzyme release. *J Clin Chem Clin Biochem*. 25:525-540.
- Schmidt E, Schmidt FW (1988) Glutamate dehydrogenase: biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme. *Clin Chim Acta*. 173:43-55.
- Schmidt FW, Schmidt E (1989) Diagnostic application of mitochondrial enzymes and isoenzymes. *Clin Chim Acta*. 185:253-263.
- Schmidt-Mende J, Gogvadze V, Hellstrom-Lindberg E, Zhivotovsky B (2006) Early mitochondrial alterations in ATRA-induced cell death. *Cell Death Differ*. 13:119-128.
- Seiyama A, Chen SS, Imai T, Kosaka H, Shiga T (1994) Assessment of rate of O₂ release from single hepatic sinusoids of rats. *Am J Physiol*. 267:944-951.
- Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT (2001) Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg*. 181:160-166.
- Shaw G, Kamen R (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 46:659-667.
- Sherman IA, Fisher MM (1986) Hepatic transport of fluorescent molecules: in vivo studies using intravital TV microscopy. *Hepatology*. 6:444-449.
- Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S (1997) Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology*. 26:113-120.
- Shirafuji N, Matsuda S, Ogura H, Tani K, Kodo H, Ozawa K, Nagata S, Asano S, Takaku F (1990) Granulocyte colony-stimulating factor stimulates human mature neutrophilic granulocytes to produce interferon-alpha. *Blood*. 75:17-19.
- Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, Oshima A, Shito M, Kawachi S, Karahashi T, Kumamoto Y, Yoshida M, Kitajima M (1997) Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 64:1398-1403.
- Shiratori Y, Kiriya H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K, Kamii K (1994) Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. *Dig Dis Sci*. 39:1265-1272.
- Shito M, Wakabayashi G, Ueda M, Shimazu M, Shirasugi N, Endo M, Mukai M, Kitajima M (1997) Interleukin 1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation*. 63:143-148.
- Shyu WC, Lin SZ, Lee CC, Liu DD, Li H (2006) Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ*. 174:927-933.
- Silver IA (1977) Ion fluxes in hypoxic tissues. *Microvasc Res*. 13:409-420.
- Slaaf DW, Tangelder GJ, Teirlinck HC, Oude Vrielink HH, Reneman RS (1986) Flow cessation pressures in the rabbit tenuissimus muscle. *Int J Microcirc Clin Exp*. 5:3-9.
- Sloand EM, Yong AS, Ramkissoon S, Solomou E, Bruno TC, Kim S, Fuhrer M, Kajigaya S, Barrett AJ, Young NS (2006) Granulocyte colony-stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:14483-14488.
- Solaroglu I, Cahill J, Jadhav V, Zhang JH (2006b) A novel neuroprotectant granulocyte-colony stimulating factor. *Stroke*. 37:1123-1128.
- Solaroglu I, Tsubokawa T, Cahill J, Zhang JH (2006a) Anti-apoptotic effect of granulocyte-colony stimulating factor after focal cerebral ischemia in the rat. *Neuroscience*. 143:965-974.
- Souza LM, Boone TC, Gabilove J, Lai PH, Zsebo KM, Murdock DC, Chazin VR, Bruszewski J, Lu H, Chen KK (1986) Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science*. 232:61-65.
- Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Ioculano M, Ammedolia L, Arlotta M, Saitta A, Caputi AP (1997) The effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on vascular dysfunction and splanchnic ischaemia-reperfusion injury. *Br J Pharmacol*. 333-339.
- Squadrito GL, Pryor WA (1998) Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med*. 392-403.

- Steimle CN, Guynn TP, Morganroth ML, Bolling SF, Carr K, Deeb GM (1992) Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion lung injury. *Ann Thorac Surg.* 53:64-72.
- Strife A, Lambek C, Wisniewski D, Gulati S, Gasson JC, Golde DW, Welte K, Gabrilove JL, Clarkson B (1987) Activities of four purified growth factors on highly enriched human hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 69:1508-1523.
- Strock PE, Majno G (1969) Microvascular changes in acutely ischemic rat muscle. *Surg Gynecol Obstet.* 129:1213-1224.
- Substance Profiles (1985) Nitrogen Mustard Hydrochloride CAS No. 55-86-7. Fourth Annual Report on Carcinogens.
- Sumimoto K, Inagaki K, Yamada K, Kawasaki T, Dohi K (1988) Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. Bile flow rate and cellular adenosine triphosphate level. *Transplantation.* 50:506-509.
- Sun SL, Li TJ, Yang PY, Qiu Y, Rui YC (2007) Modulation of signal transducers and activators of transcription (STAT) factor pathways during focal cerebral ischaemia: a gene expression array study in rat hippocampus after middle cerebral artery occlusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34:1097-1101.
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH (1994) Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res.* 57:253-258.
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D (1993) Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation.* 55:1265-1272.
- Taniguchi T (1988) Regulation of cytokine gene expression. *Annu Rev Immunol.* 439-464.
- Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB, Clouse ME (1993) Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation.* 56:1076-1082.
- Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL (1990) Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. *J Immunol.* 144:2609-2613.
- Tilg H, Kaser A, Moschen AR (2006) How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int.* 26:1029-1039.
- Townsend MC, Hampton WW, Haybron DM, Schirmer WJ, Fry DE (1986) Effective organ blood flow and bio-energy status in murine peritonitis. *Surgery.* 100:205-213.
- Trautwein C, Böker K, Manns MP (1994) Hepatocyte and immune system: acute phase reaction as a contribution to early defence mechanisms. *Gut.* 35:1163-1166.
- Tsuchihashi S, Livhits M, Zhai Y, Busuttill RW, Araujo JA, Kupiec-Weglinski JW (2006) Basal rather than induced heme oxygenase-1 levels are crucial in the antioxidant cytoprotection. *J Immunol.* 177:4749-4757.
- Ueda K, Takano H, Hasegawa H, Niitsuma Y, Qin Y, Ohtsuka M, Komuro I (2006) Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-endothelial NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:108-113.
- Van der Meer C, Valkenburg PW, Snijders PM (1986) Studies on hyperkalemia as a cause of death in intestinal ischemia shock in rats. *Circ Shock.* 19:329-345.
- Van Scott EJ, Kalmanson JD (1973) Complete remissions of mycosis fungoides lymphoma induced by topical nitrogen mustard (HN2). Control of delayed hypersensitivity to HN2 by desensitization and by induction of specific immunologic tolerance. *Cancer.* 32:18-30.
- Vargas FS, Carmo AO, Teixeira LR (2000) A new look at old agents for pleurodesis: nitrogen mustard, sodium hydroxide, and silver nitrate. *Curr Opin Pulm Med.* 6:281-286.
- Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD (1997a) High-resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for in vivo monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Microvasc Res.* 54:164-173.
- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD (1994b) Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol.* 145:1421-1431.
- Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD (1996a) Role of microcirculatory derangements in manifestation of portal triad cross-clamping-induced hepatic reperfusion injury. *J Surg Res.* 60:49-54.
- Vollmar B, Glasz J, Senkel A, Menger MD, Messmer K (1993a) Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir.* 118:691-696.
- Vollmar B, Lang G, Menger MD, Messmer K (1994c) Hypertonic hydroxyethyl starch restores hepatic microvascular perfusion in hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 266:1927-1934.

- Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K (1993b) Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function *Zentralbl Chir.* 118:218-225.
- Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K (1994a) Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 267:786-793.
- Vollmar B, Menger MD, Lang G, Post S, Messmer K (1993c) Hepatic microcirculation in hemorrhagic shock. *Prog Appl Microcirc.* 152-166.
- Vollmar B, Messner S, Wanner GA, Hartung T, Menger MD (1997b) Immunomodulatory action of G-CSF in a rat model of endotoxin-induced liver injury: an intravital microscopic analysis of Kupffer cell and leukocyte response. *J Leukoc Biol.* 62:710-718.
- Vollmar B, Pradarutti S, Nickels RM, Menger MD (2002) Age-associated loss of immunomodulatory protection by granulocyte-colony stimulating factor in endotoxic rats. *Shock.* 18:348-354.
- Vollmar B, Richter S, Menger MD (1996b) Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol.* 270:798-803.
- Vollmar B, Wanner GA, Stöckle V, Bauer M, Menger MD (1998) Differential modulation of CINC, NOSII and ICAM- gene expression in parenchyma and non-parenchyma cells of the liver by G-CSF--possible protective mechanisms of endotoxin-associated hepatotoxicity. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 115:403-404.
- Waisman D, Brod V, Wolff R, Sabo E, Chernin M, Weintraub Z, Rotschild A, Bitterman H (2003) Effects of hyperoxia on local and remote microcirculatory inflammatory response after splanchnic ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:643-652.
- Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H (1995) Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock.* 4:282-288.
- Wang Y, Vodovotz Y, Kim PK, Zamora R, Billiar TR. (2002) Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 962:415-422.
- Wanner GA, Ertel W, Muller P, Hofer Y, Leiderer R, Menger MD, Messmer K (1996) Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 5:34-40.
- Wettstein M, Haussinger D (1994) Effect of hypoxia on nitric oxide formation and leukotriene metabolism in the perfused rat liver. *Zentralbl Chir.* 119:328-333.
- Wheatley AM (1994) Does laser-Doppler flowmetry provide a quantitative measure of hepatic perfusion? *Am J Physiol.* 266:960-962.
- Wiezorek JS, Brown DH, Kupperman DE, Brass CA (1994) Rapid conversion to high xanthine oxidase activity in viable Kupffer cells during hypoxia. *J Clin Invest.* 94:2224-2230.
- Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H (1994) Complement and tumor necrosis factor- α contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol.* 55:105-111.
- Wortha HP, Adams J (1992) Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft. In: Einführung in die medizinische Biometrie. Gustav Fischer, Jena. pp 18-19
- Yamaura G, Turoczy T, Yamamoto F, Siddiqui MA, Maulik N, Das DK (2003) STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:476-482.
- Yanqing Z, Yu-Min L, Jian Q, Bao-Guo X, Chuan-Zhen L (2006) Fibronectin and neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor in focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 1098:161-169.
- Yip HK, Youssef AA, Chang LT, Yang CH, Sheu JJ, Chua S, Yeh KH, Lee FY, Wu CJ, Hang CL (2007) Association of interleukin-10 level with increased 30-day mortality in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction undergoing primary coronary intervention. *Circ J.* 71:1086-1091.
- Yokoyama Y, Nimura Y, Nagino M, Bland KI, Chaudry IH (2005) Role of thromboxane in producing hepatic injury during hepatic stress. *Arch Surg.* 140:801-7.
- Yuo A, Kitagawa S, Ohsaka A, Saito M, Takaku F (1990) Stimulation and priming of human neutrophils by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: qualitative and quantitative differences. *Biochem Biophys Res Commun.* 171:491-497.
- Zeintl H, Tompkins WR, Messmer K, Intaglietta M (1986) Static and dynamic microcirculatory video image analysis applied to clinical investigations. *Prog. Appl. Microcirc.* 11:1-10.
- Zhang B, Borderie D, Sogni P, Soubrane O, Houssin D, Calmus Y (1997) NO-mediated vasodilation in the rat liver. Role of hepatocytes and liver endothelial cells. *J Hepatol.* 26:1348-1355.
- Zhang D, Sun M, Samols D, Kushner I (1996) STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6. *J Biol Chem.* 271:9503-9509.

Zou MH, Bachschmid M (1999) Hypoxia-reoxygenation triggers coronary vasospasm in isolated bovine coronary arteries via tyrosine nitration of prostacyclin synthase. *J Exp Med.* 190:135-139.

Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF (1997) CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest.* 100:279-289.

9 Danksagung und Publikation

Beginnend danke ich Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, für die Überlassung des Themas und die persönliche Betreuung während der gesamten Tätigkeit in seinem Institut. Herr Professor Menger hat durch positive Kritik und seine ruhige, analytische Vorgehensweise meine Motivation und wissenschaftliches Interesse im Besonderen gefördert.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. med. Jan E. Slotta. Durch dauernde, kompetente Hilfsbereitschaft sowohl bei der Durchführung und Auswertung der Experimente, als auch bei der Analyse und Diskussion der Ergebnisse kommt ihm entscheidender Anteil an der Erstellung der vorliegenden Arbeit zu. Er lehrte mich wissenschaftliches Arbeiten und Argumentieren. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen und sein persönliches Engagement bin ich Herrn Dr. Slotta in tiefem Dank verbunden.

Des Weiteren danke ich Frau Jennifer Klein, die als geschätzte Mitarbeiterin während der Erstellung der Arbeit mir eine grosse Hilfe bedeutete.

Abschließend danke ich neben Frau Dr. rer. med. Claudia Scheuer, Frau Janine Becker und Frau Elisabeth Gluding auch allen anderen Mitarbeitern und Angestellten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie. Deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft ermöglichten das Arbeiten in angenehmer Atmosphäre und ließen weiten Raum für Rückfragen und Wünsche.

Kongressteilnahme

11th Annual Meeting on Surgical Research/11. Chirurgische
Forschungstage

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

G-CSF reduces hepatic post-ischemic reperfusion syndrome by reducing microvascular perfusion failure and leukocytic inflammatory reaction. *Langenbecks Arch Surg* (2007) 392:790–791