

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes  
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger)

# **Auswirkung der selektiven Pfortaderastligatur auf die Angiogenese und das Wachstum maligner Lebertumore in der Maus**

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

2008

vorgelegt von: Marcus Corsten  
geboren am: 06.09.1982 in Braunschweig

*Meiner Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>X</b>
<b>Summary.....</b>	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Primäre und sekundäre Lebertumore.....	1
1.2 Therapie von Lebermetastasen.....	3
1.3 Leberanatomie der Maus.....	6
1.3.1 Aufbau und Besonderheiten der Mäuseleber.....	6
1.3.2 Aufbau des Leberläppchens.....	8
1.3.3 Zelltypen der Leber .....	11
1.4 Experimentelle Anwendung und Fragestellung.....	12
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1 Versuchstierart und -haltung .....	15
2.2 Versuchsanordnung und -ablauf .....	16
2.2.1 Anästhesie, Laparotomie und Verschluss des Abdomens .....	16
2.2.2 Pfortaderastligatur .....	18
2.2.3 Tumorzellimplantation .....	21
2.2.4 Zweite OP zur Nachuntersuchung.....	22
2.3 Einteilung der Versuchsgruppen .....	23
2.4 Untersuchungstechniken und erhobene Parameter .....	26
2.4.1 Makrohämodynamikanalyse mittels LDF.....	26

2.4.2	Mikrozirkulationsanalyse mittels IVM.....	27
2.4.2.1	Durchführung und Geräteanordnung.....	27
2.4.2.2	Mikrozirkulatorische Parameter .....	32
2.4.3	Laborchemische Untersuchungen.....	38
2.5	Histologie, Immunhistochemie und Western Blot.....	38
2.5.1	Lebergewicht, Tumolvolumen und Gewebeasservierung .....	38
2.5.2	HE-Färbung und Immunhistochemie (PCNA und Caspase-3) .....	39
2.5.3	Western Blot.....	40
2.6	Datenerfassung und Statistik.....	42
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1	Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf den ligierten Leberlappen.....	44
3.1.1	Makrohämodynamikanalyse mittels LDF.....	44
3.1.2	Mikrozirkulationsanalyse mittels IVM.....	46
3.1.3	Laborchemische Untersuchungen.....	53
3.1.4	Lebergewicht .....	54
3.1.5	HE-Färbung, Immunhistochemie und Western Blot .....	54
3.2	Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf das Tumorstadium .....	59
3.2.1	Makrohämodynamikanalyse mittels LDF.....	59
3.2.2	Mikrozirkulationsanalyse mittels IVM.....	59
3.2.3	Tumolvolumen und Lebergewicht .....	61
3.2.4	Immunhistochemie und Western Blot.....	62
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
4.1	Diskussion von Material und Methoden.....	68
4.1.1	Diskussion des Modells .....	68

4.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken .....	72
4.1.2.1 Makrohämodynamikanalyse mittels LDF .....	72
4.1.2.2 Mikrozirkulationsanalyse mittels IVM .....	72
4.1.2.3 Laborchemische Untersuchungen .....	78
4.1.2.4 HE-Färbung, Immunhistochemie und Western Blot .....	79
4.2 Diskussion der Ergebnisse .....	80
4.2.1 Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf den ligierten Leberlappen .....	80
4.2.1.1 Makro- und Mikrozirkulation .....	80
4.2.1.2 Proteinexpression .....	82
4.2.1.3 Lebergewicht .....	83
4.2.1.4 Apoptotischer und nekrotischer Zelltod .....	83
4.2.1.5 Zellproliferation .....	84
4.2.2 Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf das Tumorwachstum .....	85
4.2.1.1 Makro- und Mikrozirkulation .....	85
4.2.1.2 Proteinexpression .....	85
4.2.1.3 Tumolvolumen und Lebergewicht .....	86
4.2.1.4 Apoptotischer und nekrotischer Zelltod .....	86
4.2.1.5 Zellproliferation .....	86
4.2.1.6 Zusammenfassung .....	86
4.3 Schlussfolgerung .....	87
4.4 Perspektive .....	87
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XIV</b>
<b>6 Danksagung .....</b>	<b>XLIII</b>
<b>7 Lebenslauf .....</b>	<b>XLIV</b>

**8 Publikationen.....XLV**

**9 Anhang.....XLVII**

## Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (erworbenes Immundefektsyndrom)
ALAT	Alaninaminotransferase (= Glutamat-Pyruvat-Transaminase, GPT)
ANOVA	One-Way Analyse der Varianz
ASAT	Aspartataminotransferase (= Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GOT)
aU	arbitrary units (arbiträre Einheiten)
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
Bax	Bcl-2 associated X Protein
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
C	Celsius
CCD-Kamera	Charge Coupled Device-Kamera
Cr	Chrom
d	Tag
DNA (DNS)	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Äthylendiamintetraessigsäure)
Egr-1	Early-Growth-Gen-1

eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase (endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase)
FCS	Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
FNH	Fokale noduläre Hyperplasie
G	Gauche
g	Gramm
GLDH	Glutamatdehydrogenase
H	Wasserstoff
h	Stunde
HABR	Hepatic Arterial Buffer Response
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGF	Hepatocyte Growth Factor (Hepatozytenwachstumsfaktor)
HIDA	Hepatobiliary Iminodiacetic Acid (hepatobiliäre Iminodiacetidsäure)
HO-1	Hämoxygenase-1
HSP	Heat Shock Protein (Hitze-Schock-Protein)
I	Iod
IgG	Immunglobulin G
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
iNOS	Induced Nitric Oxide Synthetase (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase)
IVM	Intravitalmikroskopie
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm

KRK	Kolorektales Karzinom
Lc	Lobus caudatus
LDF	Laser-Doppler-Flow-Messung
LDH	Laktatdehydrogenase
LITT	Laserinduzierte interstitielle Thermotherapie
LL	Links-lateraler Leberlappen (Lobus hepatis sinister lateralis)
LM	Links-medialer Leberlappen (Lobus hepatis sinister medialis)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
n	Zahl der Versuchstiere
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NADH	Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NIH	National Institutes of Health
NK-Zelle	natürliche Killerzelle (Natural Killer Cell)
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
p	Signifikanzniveau
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PBL	Portal Branch Ligation (Pfortaderastligatur)

PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor (thrombozytenabgeleiteter Wachstumsfaktor)
pH	Pondus hydrogenii (Wasserstoffionenkonzentration)
PSMF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RLd	Lobus hepatis dexter lateralis dorsalis
RLv	Lobus hepatis dexter lateralis ventralis
RM	Lobus hepatis dexter medialis
RM ANOVA	One-Way Repeated Measurements-Analysis of Variance
RPMI	Zellkulturmedium des Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler des Mittelwertes)
Tab.	Tabelle
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TBS-T	Tris Buffered Saline mit Tween 20 (Tris-Puffer mit Tween 20)
Tc	Technetium
TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor- $\alpha$ (transformierender Wachstumsfaktor- $\alpha$ )
TU	Tumor
TUNEL-Assay	Terminal Uridine Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling
UICC	Unio internationalis contra cancerum (internationale Union gegen den Krebs)

UKCCCR	United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
vgl.	vergleiche
VPLL	Linker Ast der Vena portae, der den links-lateralen Leberlappen versorgt
VPLM	Linker Ast der Vena portae, der den links-medialen Leberlappen versorgt
VPR	Rechter Ast der Vena portae
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Die Pfortaderastligatur (PBL) wurde als effektive Behandlungsmethode eingeführt, um ein Leberversagen nach ausgedehnter Leberresektion zu vermeiden. Dennoch zeigen klinische Studien, dass trotz Leberatrophie Tumoren im ligierten Leberlappen nicht schrumpfen, sondern teilweise ein beschleunigtes Wachstum zeigen. Auch wenn bekannt ist, dass die Tumorgöße von der Mikrozirkulation des Wirtes abhängt, besteht hier ein vollkommener Mangel an Information, wie die PBL zum einen die Lebermikrozirkulation und zum anderen das Tumorstadium beeinflusst.

Deshalb wurden im ersten Teil dieser Studie die mikrozirkulatorische Antwort, der mikrovaskuläre Umbau und die Konsequenzen auf die parenchymale Zellproliferation während 14 Tagen nach linkslateraler PBL mit Intravitalmikroskopie in BALB/c Mäusen untersucht. In den ersten sieben Tagen induzierte die PBL eine Reduktion des linkshilären Blutflusses um 50%, was mit einem 80%-igen sinusoidalen Perfusionsversagen und parenchymaler Hypoxie korrelierte. Diese mikrozirkulatorische Dysfunktion verursachte apoptotischen und nekrotischen Zelltod mit signifikanter Reduktion der Lebermasse. Nach 14 Tagen war der linkshiläre Blutfluss wiederhergestellt. Der mikrovaskuläre Umbau beinhaltete eine Ausdünnung des sinusoidalen Netzwerkes ohne substantielles Perfusionsversagen, was durch einen kompensatorischen Anstieg des Blutflusses der Arteria hepatica (hepatic arterial buffer response, HABR) und einer signifikanten sinusoidalen Dilatation gewährleistet wurde. Dies resultierte in einem Gewebsoxygenierungsniveau, das dem vor der PBL gleicht, was auf eine Arterialisierung des ligierten Leberlappens hinweist. Interessanterweise war der mikrovaskuläre Umbau 14 Tage nach der PBL mit einer signifikant vermehrten hepatozellulären Proliferation und einem leichten Anstieg des Lebergewichtes verbunden.

Somit ist gezeigt worden, dass der initiale Perfusionsausfall durch eine PBL zunächst eine Atrophie der betroffenen Leber induziert. Dies wird jedoch von einer HABR, einer Neuordnung der Mikroperfusion, einer Normalisierung der Oxygenierung und einer hepatozellulären Proliferation gefolgt. Da diese Veränderungen ursächlich für das gesteigerte Tumorstadium nach PBL sein könnten, wurde im zweiten Teil der Studie die zeitabhängigen Effekte der PBL auf die Angiogenese und das Wachstum von kolorektalen Lebermetastasen untersucht. Gemäß einem etablierten Lebermetastasenmodell wurden  $5 \times 10^5$  CT-26 Kolonkarzinomzellen in den linken Leberlappen der syngenen BALB/c Maus implantiert. Nach Randomisierung erhielten die Tiere anschließend entweder eine PBL oder eine sham-Behandlung des linken Leberlappens. Nach drei, sieben und 14 Tagen wurden Angiogene-

se, Tumorwachstum sowie Proliferation, Apoptose, VEGF, HGF und TGF- $\alpha$  Expression der Tumoren mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie, Histologie, Immunhistochemie und Western Blot analysiert. Zur Untersuchung des Langzeitüberlebens nach PBL wurden  $1 \times 10^5$  CT-26 Kolonkarzinomzellen in den linken Leberlappen syngener BALB/c Mäuse implantiert, die Tiere nach Randomisierung mit einer PBL oder sham-Therapie behandelt und nach 21 Tagen die Nachuntersuchungen durchgeführt. Durch die PBL wurde das Tumolvolumen nach 14 Tagen signifikant auf <20% der Kontrolltumoren reduziert. Innerhalb der ersten 14 Tage führte der reduzierte Blutfluss zu einer verzögerten Entwicklung der Gefäß-/Invasionsfront der Tumoren, zu einer reduzierten Dichte an Tumorgefäßen und einer reduzierten funktionellen Kapillardichte in der normalen Leber. Die signifikante sinusoidale Dilatation im Bereich des Tumorrandes ging mit einer signifikant gesteigerten VEGF-Expression einher. Die PBL führte des Weiteren initial zu einer verstärkten leukozytären Infiltration sowohl im Tumor als auch in der normalen Leber. Die Rate an Peritonealkarzinose und Lungenmetastasen wurde durch die PBL nicht beeinflusst. Interessanterweise führte jedoch die PBL nach 14 Tagen zu einer im Vergleich zu den Kontrollen hoch signifikant gesteigerten Proliferations- und Apoptoserate der Tumorzellen als auch der Hepatozyten im linken Leberlappen. Die gesteigerte Proliferation der Tumorzellen ging mit einer signifikant gesteigerten Expression von TGF- $\alpha$ , HGF und VEGF im an den Tumor angrenzenden Gewebe einher. Im Einklang mit diesen Beobachtungen war das TU-Volumen 21 Tage nach PBL im Vergleich zu den Kontrollen auch nicht mehr signifikant reduziert.

**Schlussfolgerung:** Somit ist zum einen demonstriert worden, dass die PBL nur initial ein mikrozirkulatorisches Versagen mit Leberatrophie induziert, das von einem mikrovaskulären Umbau, Normoxygenierung und hepatozellulärer Proliferation gefolgt ist. Zum anderen induziert die Regeneration der initial atrophierten Leber im Verlauf nach PBL eine kompensatorisch gesteigerte Angiogenese, welche das initial stark verzögerte Wachstum kolorektaler Lebermetastasen kompensatorisch beschleunigt. Ursächlich hierfür scheint der Umbau der Mikrozirkulation im Zusammenhang mit einer gesteigerten Proliferation in Leber als auch in den Metastasen zu sein.

## Summary

### **Effect of Portal Branch Ligation on Angiogenesis and Growth of Malignant Liver Tumors in Mice**

Portal branch ligation (PBL) has been introduced as an effective procedure to prevent liver failure after extended hepatic resection. However, clinical studies indicated that despite liver atrophy tumors within the ligated lobe do not shrink but show accelerated growth. Although it is well known that tumor growth depends on the host's microvascularization, there is complete lack of information on how PBL affects on the one hand hepatic microcirculation and on the other hand tumor growth.

In the first part of the study, we therefore studied microcirculatory responses, microvascular remodeling, and consequences on parenchymal cell proliferation during 14d after left lateral PBL using intravital fluorescence microscopy in BALB/c mice. During the first 7d PBL induced a reduction of left hilar blood flow by ~50%, which was associated with 80% sinusoidal perfusion failure and significant parenchymal hypoxia. This microcirculatory dysfunction provoked apoptotic and necrotic cell death with significant reduction of the liver mass. After 14d, left hilar blood flow was found restored. Remodeling of the microvasculature included a rarefaction of the sinusoidal network, however, without substantial perfusion failure, compensated by a hepatic arterial buffer response (HABR) and significant sinusoidal dilatation. This resulted in tissue oxygenation levels which were equal to those measured before PBL, indicating arterialization of the ligated lobe. Interestingly, microvascular remodeling at 14d after PBL was associated with a significantly increased hepatocellular proliferation and a slight regain of liver weight.

In the second part of the study, we analyzed the time-dependent effect of PBL on angiogenesis and tumor growth of colorectal metastasis. According to an established liver metastasis model, CT-26 colon cancer cells were implanted in the left liver lobe of syngeneic BALB/c mice. Animals were randomized to PBL of the left liver lobe or control group. Microcirculatory responses and microvascular remodeling of the normal liver as well as angiogenesis, tumor cell proliferation, apoptosis and growth were studied 3d, 7d, 14d and 21d after PBL using intravital multicolor fluorescence microscopy, laser Doppler fluxmetry, immunohistochemistry and biochemical techniques. After 14 days tumor volume was significantly reduced by PBL (<20% of controls) when compared to controls. During the first 14d PBL induced a reduction of left hilar blood flow by ~50%, resulting in a delayed development of an angiogenic front of the tumors, a reduced density of draining tumor venules and reduced func-

tional sinusoidal density in the normal liver. Sinusoidal dilation at the tumor border was associated by an increase of VEGF, HGF and TGF- $\alpha$  expression. PBL was associated with a higher leukocyte response in the tumor and normal liver. Immunohistological analyses demonstrated that PBL significantly induced tumor cell and hepatocyte proliferation after 14 days as well as apoptosis over the 14 days observation period. According to these findings, there was no significant difference on tumor volume after 21 days.

**In conclusion**, we demonstrate that PBL induces an only initial microcirculatory failure with liver atrophy, which is followed by microvascular remodeling, normoxygenation and hepatocellular proliferation. This may explain the late accelerated tumor progression observed in patients after PBL.

# 1 Einleitung

## 1.1 Primäre und sekundäre Lebertumore

**Lebertumore** lassen sich in benigne und maligne Tumore untergliedern (vgl. *Boese-Landgraf J et al.* [1997], S 227). Gutartige Lebertumore, die häufiger als bösartige Tumore sind, wachsen langsamer und zeigen anfänglich kaum Symptome. Ist die Benignität gesichert, dann ist eine Operation nur bei Komplikationen und/oder Symptomen notwendig. (vgl. *Tung LC, Häring R* [1997], S 671; *Kriegelstein CF, Senninger N* [2006], S 678-679) Benigne Tumore lassen sich weiter in

- Fokale noduläre Hyperplasie (FNH),
- Hämangiom/Hämangiokavernom,
- Hepatozelluläres Adenom und
- Noduläre regenerative Hyperplasie

untergliedern (vgl. *Oettle H, Dörken B* [2003], S 649; *Tung LC, Häring R* [1997], S 671), wobei Hämangiome/Hämangiokavernome die häufigsten benignen Lebertumore sind (vgl. *Tung LC, Häring R* [1997], S 671) und in der Bevölkerung eine Häufigkeit von 0,5 bis 7,0% aufweisen (vgl. *Oettle H, Dörken B* [2003], S 649).

Auch die malignen Lebertumore lassen sich weiter untergliedern (vgl. *Oettle H, Dörken B* [2003], S 649-651; *Tung LC, Häring R* [1997], S 672-674):

- Primäres cholangiozelluläres Karzinom,
- Primäres hepatozelluläres Karzinom,
- Andere maligne primäre Lebertumore,
  - Fibrolamelläre Karzinome,
  - Hepatoblastom,
  - Epitheloides Hämangioendotheliom und
- Sekundäre Lebertumore (Lebermetastasen).

Lebermetastasen sind die häufigste Form der malignen Lebertumore (vgl. *Herold G et al.* [2005], S 480): 95% aller Lebertumore sind Metastasen (vgl. *Preuss R et al.* [2004], S 688). Sie sind nach der Zirrhose die zweithäufigste Lebererkrankung, die zum Tod führt (vgl. *Oettle, Dörken B* [2003], S 651).

Für die Invasion von Tumorzellen ist die Leber besonders empfänglich. Auf Grund ihrer Größe, der guten Durchblutung und doppelten Versorgung durch die Arteria hepatica und die Vena portae ist sie nach den Lymphknoten der häufigste Sitz von

Metastasen. Das Wachstum von Metastasen wird vermutlich durch lokale Gewebefaktoren und die Merkmale der Endothelmembran begünstigt. Mit Ausnahme von primären Hirntumoren können alle Tumorarten in die Leber metastasieren. (vgl. *Oettle, Dörken B* [2003], S 651) Nach dem Karzinom der Bronchien sind Karzinome des Kolon und Rektums die häufigsten Primärtumore von Lebermetastasen (vgl. *Krieglstein CF, Senninger N* [2006], S 679; *Lepenies J et al.* [2004], S 264). Bei 25% der Patienten finden sich bereits zum Diagnosezeitpunkt des **kolorektalen Karzinoms** (KRK) Lebermetastasen (vgl. *Vogl TJ et al.* [2001], S A839; *Herold G et al.* [2005], S 419). Bis zu 60% der Betroffenen entwickeln trotz einer operativen Entfernung des Primärtumors im weiteren Verlauf Lebermetastasen (vgl. *Vogl TJ et al.* [2001], S A839; *Trarbach T et al.* [2007], S 27). 25% der Patienten mit KRK stirbt an dieser Lebermetastasierung, bei 20% der Patienten liegen ausschließlich Lebermetastasen vor (vgl. *Vogl TJ et al.* [2001], S A839, *Weiss L et al.* [1986], pp 195-203). Die Überlebenszeit bei Lebermetastasen ist von der Art des Primärtumors abhängig. Sie beträgt im Mittel etwa vier bis acht Monate (vgl. *Tung LC, Häring R* [1997], S 673; *Spieker T* [2006], S 1-2). Die Heilungsrate nach der Resektion von Lebermetastasen eines KRK liegt um 30% (vgl. *Hohenberger W* [1999], S 619), die 5-Jahresüberlebensrate bei 25 bis 40% (vgl. *Tung LC, Häring R* [1997], S 674).

Das KRK (zur Klassifikation des KRK vgl. Anhang) ist die häufigste maligne Erkrankung des Gastrointestinaltraktes (25/100.000 Einwohner/Jahr) mit steigender Inzidenz (vgl. z.B. *Lepenies J et al.* [2004], S 230; *Riede UN et al.* [1998], S 380). Die Inzidenz variiert in Europa von <20/100.000 pro Jahr in Griechenland bis >40/100.000 pro Jahr in Deutschland, womit letzteres die höchste Inzidenz in Europa aufweist. Das KRK ist bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung sowie die zweithäufigste Krebstodesursache (vgl. *Robert Koch-Institut* [2006], o.S.). Generell sind Männer häufiger betroffen als Frauen (vgl. *Bumm R, Harder Y* [2006], S 629). Die Inzidenz verdoppelt sich bei über 40-jährigen alle 10 Jahre. (vgl. z.B. *Herold G et al.* [2005], S 417)

Die Lokalisationsverteilung des KRK lässt sich wie folgt spezifizieren: Rektum (60%) > Sigma (20%) > Coecum/Kolon ascendens (10%) ≥ übriges Kolon (10%) (vgl. z.B. *Herold G et al.* [2005], S 419).

95% der KRK sind Adenokarzinome, die sich wie folgt untergliedern:

- differenzierter Typ (80%),
- schleimbildender Typ (10%) und
- undifferenzierter/anaplastischer (hochmaligner) Typ (10%) (vgl. z.B. *Renz-Polster H* [2004], S 591).

Die restlichen 5% sind Plattenepithelkarzinome des Analkanals, Leiomyosarkome sowie Kaposi-Sarkome bei AIDS (vgl. z.B. *Renz-Polster H* [2004], S 591).

Die Metastasierung des KRK erfolgt hämatogen (vgl. *MacDonald IC et al.* [2002], pp 885-886) in die Leber und sekundär in die Lunge. Die hämatogene Metastasierung folgt dem venösen Abfluss, das heißt mit der Vena portae in die Leber (vgl. *Nijssen JF et al.* [2002], p 73). Sekundär kommt es zur Metastasierung in die Lunge. Das tiefsitzende Rektumkarzinom im mittleren und distalen Drittel metastasiert hauptsächlich über die Vena cava in die Lunge (vgl. z.B. *Lepenies J et al.* [2004], S 231; *Bruch HP, Schiedeck T* [1997], S 582).

## 1.2 Therapie von Lebermetastasen

Als Therapiemöglichkeiten beziehungsweise Behandlungskonzepte der Lebermetastasen stehen mehrere Verfahren zur Verfügung (vgl. *AWMF* [2003], o.S.). Die chirurgische Resektion (Lappenresektion, R<sub>0</sub>-Resektion und Teillappenresektion; vgl. *Parks RW, Garden OJ* [2001], pp 766-771; *Heriot AG, Karanjia ND* [2002], pp 371-380; *Fong Y, Blumgart LH* [2002], pp 1-19) ist jedoch das einzige Verfahren für eine kurative Therapie (vgl. *Hillert C et al.* [2003], S 341). Die mittlere Überlebenszeit bei Lebermetastasen eines KRK beträgt ohne chirurgische Intervention etwa sechs bis neun Monate und die 3-Jahresüberlebensrate liegt unter drei Prozent (vgl. *Stangl R et al.* [1994], pp 1405-1410). Nach chirurgischer Intervention beträgt die 5-Jahresüberlebensrate etwa 30-40% (vgl. *Broelsch CE et al.* [1997], S 91-93). Alle weiteren Verfahren erreichen lediglich eine Verbesserung der Lebensqualität, aber sie erzielen keine signifikante Steigerung der Langzeitüberlebensrate der Patienten (vgl. *Kato T et al.* [2003], pp S22-S31). Als sonstige Verfahren, die ein kuratives Ziel verfolgen, sind zum einen die Lebertransplantation (vgl. *Ringe B et al.* [2001], pp 697-699; *Nakajima Y et al.* [2006], pp 1805-1809) und zum anderen die lokale Tumordestruktion (vgl. o.V. [2008], o.S.) zu nennen. Zur letzteren zählen die Alkoholablationstherapie (vgl. *Blum HE* [2005], p 7394), die Kryotherapie (vgl. *Cozzi PJ et al.* [1995], pp 501-509; *Sheen AJ et al.* [2002], pp 1396-1401), die Laserinduzierte Interstitielle Thermotheapie (LITT; vgl. *McCulloch P* [1994], p 154, *Vogl TJ et al.* [1997], p 29) und die Radiofrequenzablation (vgl. *Nijssen JF et al.* [2002], p 73; *Galandi D, Antes G* [2004], pp 1-19). Als adjuvante Therapieoptionen stehen die adjuvante regionale Chemotherapie (vgl. *Håkansson L et al.* [1997], pp S6-100-S6-101), die adjuvante systemische Chemotherapie (vgl. *Derenzini E et al.* [2006], pp 107-119) und die Immunotherapie (vgl. *Lode HN et al.* [1998], pp 277-292; *Liu LX et al.* [2003], p 196) zur Verfügung. Ferner gibt es einige Möglichkeiten der Palliativthera-

pie, wie zum Beispiel die transarterielle Chemoembolisation (TACE; vgl. *O'Toole D et al.* [2003], pp 464-466; *Herber SC et al.* [2007], pp 289-299), das operative Tumordebulking (vgl. *Sartori P et al.* [2005], pp 391-396), die lokale Tumordestruktion (vgl. *Malafosse R et al.* [2001], pp 891-892) oder die perkutane Bestrahlung (vgl. *McCulloch P* [1994], pp 153-154) im Sinne einer Schmerztherapie des Leberkapselschmerzes.

Die Leberresektion gilt somit immer noch als „Gold Standard“ für die Behandlung von Patienten mit malignen Lebertumoren und Lebermetastasen (vgl. *Bradpiece HA et al.* [1987], pp 324-326). Der Verlust funktionsfähiger Lebermasse nach Hepatektomie wird durch die regenerative Kapazität der Leber bis hin zum initialen Volumen und Funktionsstatus kompensiert. Ausgedehnte Leberresektionen (über 75% der Lebermasse) weisen eine inadäquate Regenerationsreserve des verbleibenden Leberparenchyms auf. (vgl. *Broering DC et al.* [2002], pp 905-913; *Yigitler C et al.* [2003], pp S18-S25) Dies resultiert in einer parenchymalen Dysfunktion und einem Leberversagen, das mit einer hohen Mortalität vergesellschaftet ist. (vgl. *Mullin EJ et al.* [2005], pp 87-97)

Die gesunde Leber hat eine ausgesprochen gute Fähigkeit zur Regeneration, da die Hepatozyten teilungsfähig sind. Nach Leberresektion kann das Organ wachsen, bis es wieder seine physiologische Größe erreicht hat. (vgl. *Lepenies J et al.* [2004], S 231) Um das Risiko des Leberversagens zu reduzieren und die Zahl resektionsfähiger Patienten bei indizierter ausgedehnter Hepatektomie zu steigern, wurde die **Pfortaderokklusion** eingeführt (vgl. *Makuuchi M et al.* [1990], pp 521-527). Diese präoperative Pfortaderokklusion ist heute eine etablierte Methode zur Vergrößerung des prospektiven Leberrestvolumens vor geplanten erweiterten Hemihepatektomien bei Lebermalignomen (vgl. *Müller L et al.* [2004], S 317). Vier bis acht Wochen vor geplanter Hepatektomie wird der Pfortaderast, der den tumortragenden Leberlappen versorgt, durch Embolisation (vgl. *Broering DC et al.* [2002], pp 905-913; *Takayama T, Makuuchi M* [2004], pp 17-20; *Chijiwa K et al.* [2000], pp 94-99; *Miyagawa S, Kawasaki S* [2001], S 770-774; *Sirichindakul B et al.* [2005], pp 1115-1119; *Shimada H et al.* [2006], pp 130-142; *Jaeck D et al.* [2003], pp 221-229) oder Ligatur (vgl. *Abdalla EK et al.* [2001], pp 165-175; *Kameoka N et al.* [1998], pp 545-553) verschlossen. Die Pfortaderokklusion kommt also dann zum Einsatz, wenn die Restleber für ein Überleben des Patienten zu klein ist. Wird der portalvenöse Blutfluss durch Embolisation beziehungsweise Ligatur der tumorlappenversorgenden Pfortader unterbunden, dann wird der portale Blutfluss dadurch in die Restleber geleitet und stimuliert eine Leberhypertrophie dieser Leberareale (vgl. *Hölscher AH et al.* [2003], S 860). Bei dieser Behandlungsmethode bestand der Gedanke, eine Atro-

phie des ligierten Leberlappens zu induzieren, während das nichtligierte kontralaterale Lebergewebe, das die verbleibende Leber nach späterer Hepatektomie darstellt, kompensatorisch hypertrophiert. (vgl. *Makuuchi M et al.* [1990], pp 521-527, *Huang JY et al.* [2006], pp 408-414)

Vorherige Studien haben gezeigt, dass die **Pfortaderastligatur** (PBL)-assoziierte Hypertrophie des nichtligierten Leberlappens eine in der Tat suffiziente Regenerationskapazität für eine spätere Hepatektomie entwickelt (vgl. *Abdalla EK et al.* [2001], pp 165-175; *Kokudo N et al.* [2001], pp 267-272). Trotzdem ist wenig darüber bekannt, ob die PBL-induzierte Atrophie des tumortragenden Leberlappens das Nährstoffangebot und dadurch die Tumorgroße beeinflusst. Im Gegensatz zu der kompensatorischen Hypertrophie, die unmittelbar durch eine frühe proliferative Antwort hervorgerufen wird (vgl. *Lambotte L et al.* [2000], pp 940-945), erklärt sich das rasche Schrumpfen des ligierten Lappens durch die assoziierte Reduktion der Größe und Anzahl an Hepatozyten. Dies ist am wahrscheinlichsten die Folge der anhaltenden Hypoxie und dem metabolischen Mangel an portalen hepatotrophischen Faktoren. (vgl. *Mueller L et al.* [2005], pp 994-1001; *Picard C et al.* [2004], pp 618-628; *Yamasaki M et al.* [1999], pp 401-411) Die PBL-induzierte Atrophie umfasst sowohl zentrolobuläre Nekrosen als auch apoptotischen Zelltod in einem zeitabhängigen Auftreten, jedoch ohne die hepatische Mikroarchitektur zu beeinflussen. (vgl. *Mueller L et al.* [2005], pp 994-1001; *Picard C et al.* [2004], pp 618-628; *Takamura K et al.* [2005], pp 3-11; *Um SH et al.* [1994], pp 202-209; *Mueller L et al.* [2003], pp 146-155)

Von Interesse sind einige Anzeichen aus klinischen Studien, die besagen, dass trotz Leberatrophie, Tumoren im ligierten Leberlappen nicht an Größe verlieren, sondern eine Beschleunigung des Wachstums zeigen (vgl. *Broering DC et al.* [2002], pp 905-913; *Kokudo N et al.* [2001], pp 267-272; *Heinrich S et al.* [2006], pp 35-42). Des Weiteren haben experimentelle Studien gezeigt, dass der Verlust an portalem Blutfluss nach PBL durch eine hepatic arterial buffer response (HABR) kompensiert wird, die eine schnelle Normalisierung des gesamten hepatischen Blutflusses pro Gramm Lebergewebe schon nach sieben Tagen im ligierten Leberlappen gewährleistet (vgl. *Um SH et al.* [1994], pp 202-209; *Rocheleau B et al.* [1999], pp G1000-G1007). Inwieweit diese Arterialisierung die hepatische Mikrozirkulation beeinflusst, ist bisher noch nicht untersucht worden. Diese Informationen sind jedoch von größtem Interesse, weil die Größe und das Wachstum von Tumorgewebe bekanntermaßen grundlegend von dem gesamten mikrovaskulären Nährstoffblutangebot des Wirtes abhängen.

## 1.3 Leberanatomie der Maus

### 1.3.1 Aufbau und Besonderheiten der Mäuseleber

Auf Grund der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeiten zum Menschen werden Mäuse in der medizinischen Forschung als Versuchstiere eingesetzt. Biomedizinische Modelle sind oft beschrieben worden und Publikationen über Anästhesie (vgl. z.B. *Erhardt W et al.* [1984], pp 159-169; *Otto K* [2004], pp 565-566; *Erhardt W et al.* [1986], S 333-342; *Humphrey JA et al.* [2002], pp 1241-1249), Analgesie (vgl. *Otto K* [2004], pp 565-566) und über das prä- und postoperative Handling (vgl. z.B. *UKCCCR* [1998], pp 1-10) von Mäusen zahlreich vorhanden. Forschungsgebiete, in denen Mäuse als Versuchstiere genutzt werden, umfassen unter anderem die Anästhesiologie, die Kardiologie, die Pharmakologie, die Nephrologie, die Chirurgie und die Transplantationsmedizin (vgl. z.B. *Harlemann JH* [2004], pp 111-114; *Houdebine LM* [2004], pp 97-110). Mit der Entwicklung eines leberspezifischen Tumormodells für die Maus, eröffnen sich auch auf diesem Forschungsgebiet neue Möglichkeiten (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 453-460).

Die Leber (Hepar) ist das größte Stoffwechselorgan des Körpers. Bei den Säugetieren und beim Menschen liegt sie im rechten Oberbauch unter der Zwerchfellkuppe. Die Lage der Leber wird beeinflusst durch die Stellung des Körpers, durch den Muskeltonus der vorderen Bauchwand, durch Atemexkursionen und durch die Verdrängungseffekte der anderen Bauchorgane. (vgl. *Schiebler TH, Schmidt W* [2002], S 581-582) Die Leber des Menschen und der Maus sind sehr ähnlich aufgebaut; sie unterscheiden sich nur in wenigen Punkten:

Während die menschliche Leber äußerlich nicht frei in einzelne Leberlappen gegliedert ist (vgl. *Kollmar O* [2000], S 14), ist sie bei der Maus durch Incisurae in die einzelnen, leicht gegeneinander beweglichen Leberlappen, den Lobus hepatis sinister lateralis und medialis sowie den Lobus hepatis dexter lateralis dorsalis und medialis, auffallend deutlich unterteilt. Im Hilusbereich sind zusätzlich der Lobus hepatis dexter lateralis ventralis und der Lobus caudatus zu finden (vgl. Abbildung 1.1; Nomenklatur analog zu *Aprahamian M, Freund Y* [2004]). Charakteristische Eigenschaften der Mäuseleber sind Anisocytose und Anisokaryose (vgl. *Krinke GJ* [2004], p 147). Die weibliche Mäuseleber ist durchschnittlich 1,64g, die männliche 2,18g schwer (vgl. *Krinke GJ* [2004], p 134).

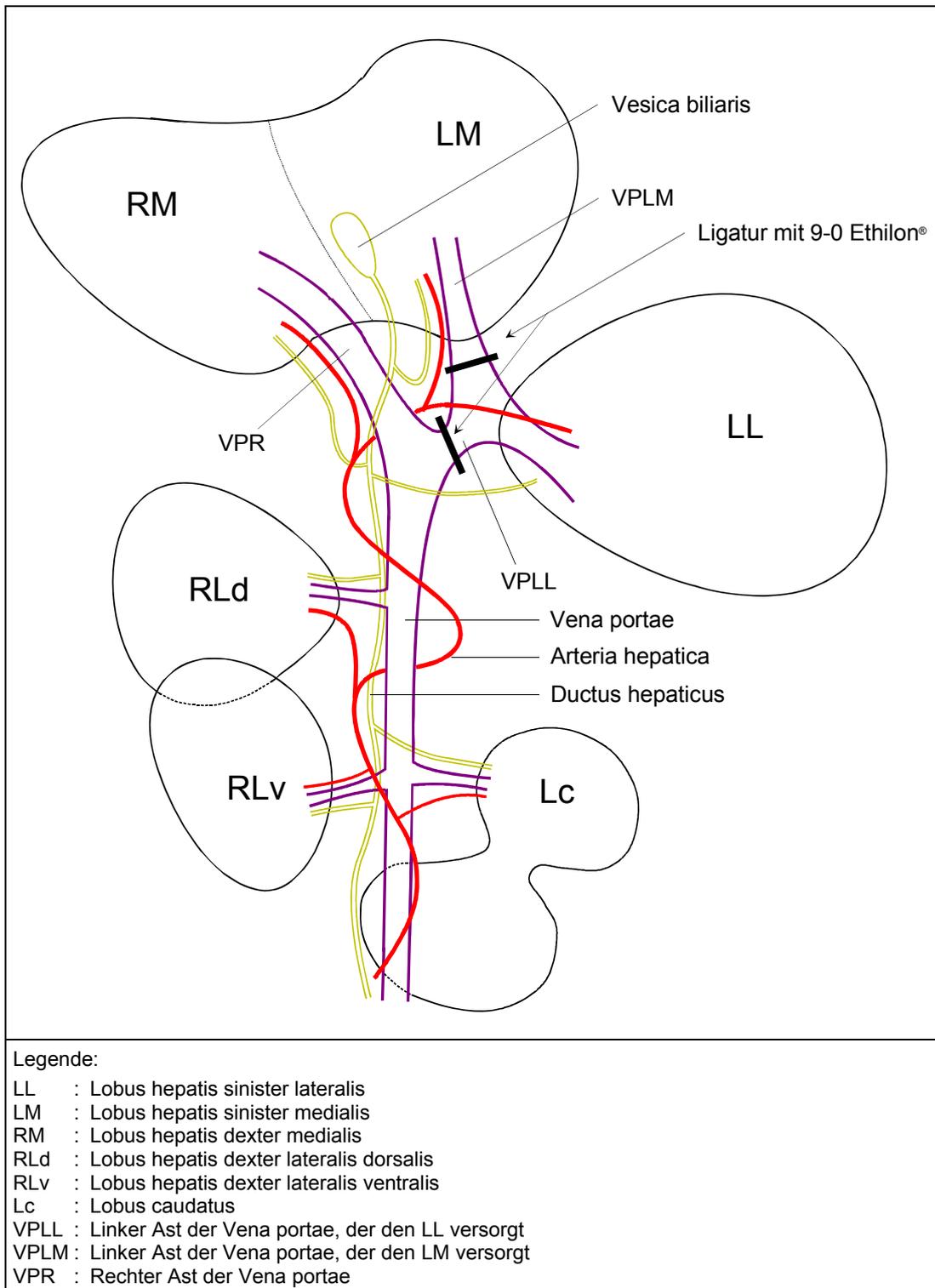


Abb. 1.1: Anatomie der Leber der Maus (Nomenklatur analog zu *Aprahamian M, Freund Y* [2004])

Die Blutversorgung der Mäuseleber entspricht derjenigen des Menschen. Hierbei ist vor allem die doppelte Blutzufuhr durch die Arteria hepatica propria und die Vena portae hervorzuheben (vgl. *Campra JL, Reynolds TB* [1982], pp 627-632). Jeder Leberlappen der Maus wird von je einem Ast der Arteria hepatica und Vena portae

versorgt. Zwischen den einzelnen Leberlappen bestehen zusätzliche portal-portale beziehungsweise portal-venöse Shunts. Der Blutabfluss erfolgt über zufließende Äste der Vena hepatica in die Vena cava inferior.

Die Leber ist aus embryologischer Sicht ein aus entodermalen und mesodermalen Anteilen zusammengesetztes Organ. Während die Hepatozyten entodermalen Ursprungs sind, kommen bei der Entwicklung der Leberzellplatten mit den einsprossenden Nabelgefäßen mesodermale Anteile hinzu. Das auf diese Weise in das Lebergewebe gelangte Endothel kleidet die Lebersinusoide aus. (vgl. *Schiebler TH, Schmidt W* [2002], S 581) Sekundär wandern die Kupfferzellen als Zellen des Mononukleären-Phagozytären-Systems ein. Die Funktionen der Leber werden zum einen durch die Hepatozyten bestimmt, die die Synthese, Speicherung und Sekretion sowie Entgiftung biochemischer Metaboliten betreiben, und zum anderen durch das Endothel erweitert, das durch seinen mesodermalen Charakter z.B. Phagozytose und embryonale Hämatopoese gewährleistet. (vgl. *Kollmar O* [2000], S 15)

Die Leber bildet in ihrer späteren embryonalen Entwicklung die Läppchengliederung aus. Wie beim Menschen bildet bei der Maus eine Bindegewebskapsel die äußere Begrenzung der Leber. Das interstitielle interlobuläre Bindegewebe, das von der Organkapsel ausgeht, ist für die Lobulierung verantwortlich. Beim Menschen ist der bindegewebige Anteil in der Leber größer als bei der Maus.

### 1.3.2 Aufbau des Leberläppchens

Die Leber setzt sich aus kleinen Baueinheiten, den klassischen Leberläppchen (Zentralvenenläppchen, Lobuli hepatis) zusammen, die als ein 0,7 bis 2mm großer, länglicher Körper mit wenig zugespitzten Enden beschrieben werden (vgl. *Welsch U* [2003], S 349). Diese rein strukturelle Gliederung erfolgte erstmalig durch Kiernan (vgl. *Kiernan F* [1833], pp 711-770) im Jahre 1833. Diese Leberläppchen bilden sowohl eine strukturelle als auch funktionelle Einheit. Wesentliche Bestandteile des klassischen Leberläppchens sind:

- Anteile des Gallengangsystems,
- Bindegewebe,
- Leberepithelzellen (Parenchym) und
- vaskuläre Elemente.

Anhand verschiedener Ansätze lassen sich unterschiedliche Typen von Leberläppchen unterscheiden (vgl. Abbildung 1.2):

- Leberazinus,
- Portalvenenläppchen und
- Periportalfeld.

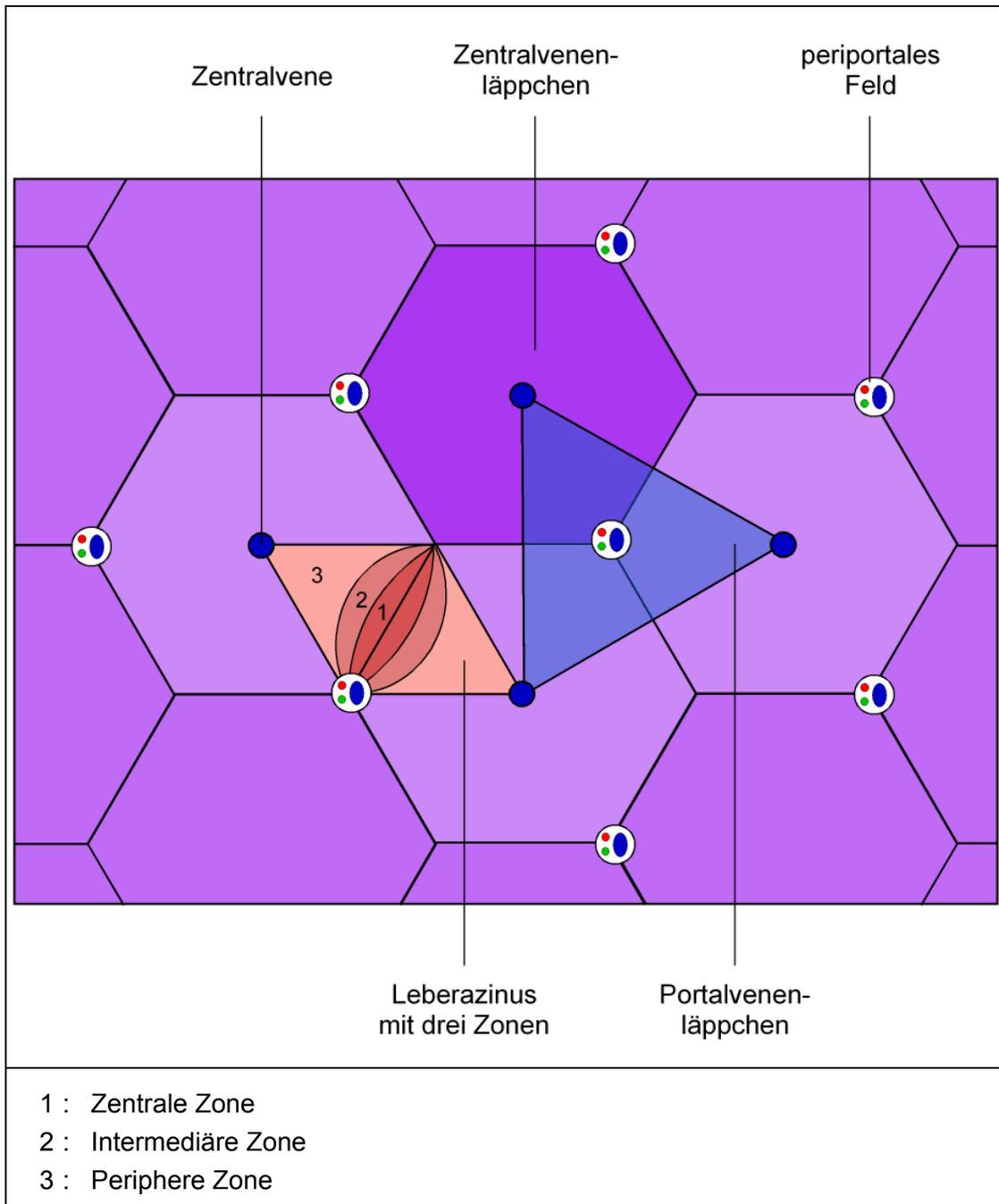


Abb. 1.2: Aufbau der Leberläppchen (schematisch; vgl. z.B. *Welsch U* [2003], S 352)

Der **Leberazinus**, der im Anschnitt eine rhombische Form aufweist, wird an den spitzen Enden durch die Zentralvenen der benachbarten Läppchen und an den stumpfen Enden durch die periportalen Felder begrenzt. Die Bezeichnung Leberazinus fand im Jahre 1883 erstmals Erwähnung durch Brissaud und Sabourin (vgl.

*Brissaud E, Sabourin C* [1883], p 757). Auf Grund funktioneller Parameter, insbesondere des unterschiedlichen Sauerstoffgehaltes im Blut, erfolgt eine Klassifizierung in drei Zonen, die als Rappaport-Schema (vgl. *Rappaport AM* [1960], S 561-577; *Rappaport AM* [1976], S 215-243) bezeichnet wird (vgl. *Gumucio JJ, Miller DL* [1982], pp 647-648):

- Zone 1: Zentrale Zone ( $21,0\mu\text{m} \pm 0,3$  (vgl. *Loud AV* [1968], p 31)); hoher Nährstoff- und Sauerstoffgehalt, oxidative Prozesse, Vorgänge der Glukoneogenese sowie der Acetylierung von Fettsäuren.
- Zone 2: Intermediäre Zone ( $20,8\mu\text{m} \pm 0,3$  (vgl. *Loud AV* [1968], p 31)); mäßiger Nährstoff- und Sauerstoffgehalt.
- Zone 3: Periphere Zone ( $20,8\mu\text{m} \pm 0,2$  (vgl. *Loud AV* [1968], p 31)); venöser Sauerstoffgehalt, wenig Nährstoffe, hohe Metabolitenkonzentration, anaerobe Stoffwechselfvorgänge, Entgiftungsprozesse und Liponeogenese. (vgl. z.B. *Welsch U* [2003], S 349-351)

Dieses Schema hat für die Betrachtung physiologischer und pathologischer Veränderung in der Leber besondere Bedeutung.

Im Jahre 1954 legte Eger (vgl. *Eger W* [1954], S 255-267) eine weitere Einteilung des Zentralvenenläppchens vor. Er unterscheidet zwischen zentralem und peripherem Funktionsfeld. Diese Vorgehensweise zeigt jedoch mit den Zonen 1 und 3 des Rappaport-Schemas deutliche Übereinstimmungen, da das zentrale Funktionsfeld Ort der Glykogenbildung und des Fettumsatzes ist und das periphere als Reserve- oder Speicherfeld dient.

Das **Portalvenenläppchen** zeichnet sich durch eine im Querschnitt dreieckige Form aus, deren Spitzen durch Zentralvenen dreier unmittelbar benachbarter klassischer Leberläppchen begrenzt werden. Aus funktioneller Sicht steht das Gallengangssystem im Vordergrund, wodurch der exokrine Drüsencharakter der Leber zum Ausdruck kommt. (vgl. z.B. *Schiebler TH, Schmidt W* [2002], S 585)

Das **Periportalfeld** ist charakterisiert durch die Glisson-Trias, die durch die Endäste der Vena portae (Venae interlobulares) und Arteria hepatica (Arteriae interlobulares) sowie die ableitenden Gallengänge (Ductuli interlobulares) gebildet wird (vgl. *Welsch U* [2003], S 351-353).

### 1.3.3 Zelltypen der Leber

In der Leber sind die folgenden Zelltypen zu unterscheiden:

- Hepatozyten,

- Sinusendothel,
- Ito-Zellen,
- Pit-Zellen und
- Kupfferzellen.

Da die **Hepatozyten** nur eine geringe Ausdifferenzierung aufweisen, sind sie in der Lage, verschiedenste Funktionen zu übernehmen. Sie weisen im Zentrum einen rundlichen, hellen Zellkern auf, der meist diploid ist. Des Weiteren sind die Leberzellen polygonal gebaut und haben einen Durchmesser von ungefähr 25µm. Der polare Aufbau der Hepatozyten ist einerseits bedingt durch den an den Gallencanaliculus angrenzenden schmalen Gallepol und andererseits durch den an einen Sinusoiden angrenzenden breiten Blutpol. Im Gallepol, der Mikrovilli trägt, findet die Galleproduktion statt. Durch Haftkomplexe und ringförmige Rundumverschlüsse, die jeweils aus Desmosomen, Zonula adhaerens und Zonula occludens bestehen, erfolgt eine ausreichende Isolierung des Gallepols gegenüber seiner Umgebung. Der Blutpol, der wie der Gallepol zahlreiche Mikrovilli trägt, bietet eine besonders aktive Austauschfläche zwischen Blut und Leberzelle, wobei die Austauschvorgänge in beide Richtungen erfolgen können. (vgl. *Welsch U* [2003], S 353-356)

Das Zytoplasma der Hepatozyten enthält zahlreiche Mitochondrien (800 bis 1000 pro Zelle) und reichlich glattes und raues endoplasmatisches Retikulum. Sie haben des Weiteren zahlreiche Lysosomen sowie Peroxisomen und dienen dem Körper als Glykogenspeicher. (vgl. *Kollmar O* [2000], S 18)

Der **Disse-Raum** (benannt nach dem deutschen Anatom Joseph Disse (1852-1912)) ist ein schmaler kapillarer Spaltraum (Durchmesser 0,5 bis 3µm) zwischen den Wänden der Sinusoide und denen der Leberzellen, der nur elektronenmikroskopisch nachweisbar ist. Er enthält Blutplasma, das durch das fenestrierte Sinusendothel in den Disse-Raum übergetreten ist. Somit steht der Disse-Raum im Dienste des Stoffaustauschs. (vgl. *Schiebler TH, Schmidt W* [2002], S 586)

Die **Sinusoide**, deren Form durch die Hepatozyten bestimmt ist, sind weitleumige Blutkapillaren mit einer diskontinuierlichen Basalmembran. Auf Grund dieser Eigenschaft ist ein reger Stoffaustausch möglich; lediglich Blutzellen werden zurückgehalten. Auf dem faserigen Bindegewebegerüst liegen das Sinusendothel, die Kupfferzellen und die Pit-Zellen. Zwischen diesem Bindegewebe und den Hepatozyten befinden sich die Ito-Zellen. (vgl. *Fahimi HD* [1982], pp 495-500; *Campra JL, Reynolds TB* [1982], pp 632-633)

Die parasinusoidalen **Ito-Zellen** (hepatische Sternzelle, Lipozyten) sind fett-speichernde interstitielle Zellen der Leber, die sich innerhalb des Disse-Raumes befinden. Sie dienen als Hauptspeicher für Retinol und enthalten feinste Vitamin A-haltige Fetttropfchen. Ihre Hauptaufgabe ist die Bildung und Erhaltung des interlobulären Bindegewebes des Disse-Raumes. Unter pathologischen Gegebenheiten, wie etwa anhaltenden Hepatitiden und schweren chronischen Leberschäden (Leberzirrhose, Leberfibrose) werden die Ito-Zellen zu myofibroblastenähnlichen Zellen aktiviert. Diese nun lipidtropfenarmen Zellen produzieren vorwiegend Proteoglykane und Kollagenfibrillen. Diese Substanzen gelangen in den Disse-Raum und blockieren den Stoffaustausch. (vgl. *Wake K* [1980], pp 303-353; *Fahimi HD* [1982], pp 502-503; *Ramadori G* [1991]), pp 47-158)

Die selten vorkommenden osmophile Granula-enthaltenden **Pit-Zellen** befinden sich zwischen Sinusendothel und Hepatozyten. Bis heute ist ihre genaue Funktion nicht erforscht. Sie werden als leberspezifische Subpopulation der NK-Zellen (natural killer cells) oder als leberassoziierte Lymphozyten bezeichnet. Auf Grund ihrer Zugehörigkeit zu den NK-Zellen besteht ihre Aufgabe in der Bekämpfung virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen. (vgl. *Burt AD et al.* [1993], pp 21-38)

**Kupfferzellen** (Sternchenzellen) stellen die größte Population von Monozyten (Blutmakrophagen) dar. Sie sind vorwiegend im Lumen der hepatischen Sinusoide angesiedelt und zeigen eine endozytotische Aktivität gegen Fremdstoffe, die auf hämatogenem Weg in die Leber gelangen (vgl. *Naito M et al.* [2004], p 16) und somit aus dem Blutkreislauf entfernt werden (vgl. *Dan C, Wake K* [1985], p 75). (vgl. *McCuskey RS et al.* [1983], p 362) Unter den systemischen Makrophagen haben sie die größte Kapazität zur Phagozytose. Außerdem sind sie die ersten immunkompetenten Zellen, die mit Endotoxinen, die im Gastrointestinaltrakt aufgenommen werden, in Kontakt kommen. Diese Endotoxine stimulieren sowohl die Phagozytose als auch die inflammatorische Cytokinproduktion der Kupfferzellen. (vgl. *Yano H et al.* [2004], p 151; *Jones EA, Summerfield JA* [1982], pp 507-523)

#### 1.4 Experimentelle Anwendung und Fragestellung

Neueste experimentelle (vgl. *Müller L et al.* [2004], S 317-318; *Yamasaki M et al.* [1999], pp 401-411) und klinische (vgl. *Kokudo N et al.* [2001], pp 267-272) Untersuchungen lassen vermuten, dass die Pfortaderastokklusion trotz Leberatrophie eine vermehrte proliferative Aktivität auch im betroffenen Tumor bewirken kann. Auf Grund des Sachverhaltes, dass die Pfortaderastokklusion eine Hypoxie verursacht und Hypoxie einer der stärksten Stimulatoren der Angiogenese über Expression von

vascular endothelial growth factor (VEGF) ist, könnte das präoperative Vorgehen (Pfortaderastokklusion) in der Tat über eine vermehrte Neubildung von Gefäßen eine Zunahme des Tumorwachstums bewirken. Umgekehrt könnte die hypoxievermittelte vermehrte Proliferation von Tumorzellen mit einer ebenfalls vermehrten Apoptose einhergehen, da Hypoxie apoptotischen Zelltod induziert, sodass nicht notwendiger Weise ein vermehrtes Tumorwachstum einsetzen muss. Eine Klärung dieser Problemstellung erscheint damit für den klinisch tätigen Leberchirurgen von entscheidender Bedeutung zu sein.

Mit dem vorliegenden Versuchsvorhaben soll daher untersucht werden, inwieweit die Pfortaderastligatur ein vermehrtes Tumorwachstum über hypoxieinduzierte VEGF- und platelet-derived growth factor (PDGF)-vermittelte Angiogenese verursacht. Des Weiteren soll die vorliegende Untersuchung einen klinisch relevanten Beitrag zu der Fragestellung leisten, inwieweit die bisher gängige Pfortaderastokklusion in der präoperativen Behandlung von ausgedehnten Lebertumoren beibehalten werden kann oder aber diese modifiziert beziehungsweise nicht mehr durchgeführt werden sollte.

Um die Auswirkungen der Pfortaderastligatur in einem tierexperimentellen Modell zu erforschen, kann zur *in vivo* fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Mikrogefäßstrombahn der Leber auf bereits umfangreiche Erfahrungen zurückgegriffen werden (vgl. *Vollmar B et al.* [1998], pp 1544-1553). Mit Hilfe dieser Technik können Mikrohämodynamik, Gewebeoxygenierung, leukozytäre Antwort, Kupfferzellaktivierung, Itozellfunktion und endotheliale sowie hepatozytäre Apoptose und Nekrose *in vivo* untersucht werden (vgl. *Schäfer T et al.* [2003], pp 660-667; *El-Gibaly AM et al.* [2004], pp 1553-1562). Untersuchungen konnten des Weiteren nachweisen, dass die Reifung von neugebildeten Mikrogefäßen in Tumoren nicht nur von VEGF, sondern vom Zusammenspiel zwischen VEGF und PDGF abhängt (vgl. *Erber R et al.* [2004], pp 338-340). In aufwändigen Vorarbeiten konnte ferner ein standardisiertes Modell der solitären Tumorimplantation in der Leber etabliert werden (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 453-460).

Die hier vorgestellte tierexperimentelle Studie besteht aus zwei Teilprojekten. Zum einen sollen die Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf die Mikrozirkulation und Angiogenese der Leber untersucht werden. Hierfür wird der linke Leberlappen nach Pfortaderastligatur in einer akuten Versuchsreihe nach 30 und 60 Minuten und in einer Langzeitversuchsreihe nach drei, sieben und 14 Tagen intravitalmikroskopisch, histologisch, immunhistochemisch und mit Western Blot-Analysen untersucht, um die mikrozirkulatorische Antwort, mikrovaskuläre Umbau und ebenso deren

Konsequenzen auf die hepatische parenchymatöse Zellproliferation und Apoptose zu analysieren. Zum anderen sollen die Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf das Tumorwachstum von Lebertumoren untersucht werden. Hierfür wird BALB/c Mäusen ein solitärer, syngener CT26.WT Tumor (vgl. *Wang M et al.* [1995], pp 4685-4692; *Suh KW et al.* [1999], pp 218-219) gemäß einem etablierten Lebermetastasenmodell in den linken Leberlappen implantiert (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 453-460). Gleichzeitig wird der linke Pfortaderast ligiert. Nach drei, sieben und 14 Tagen erfolgt die intravitalmikroskopische Analyse der Tumorgröße und Metastasierung, der Tumorzellapoptose, der Gewebeoxygenierung, der mikrovaskulären Perfusion sowie der Tumorangiogenese. Die Analyse der Expression von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, HGF (hepatocyte growth factor) und TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), wird mit Hilfe von Western Blot durchgeführt. Des Weiteren werden Proliferation und Apoptose immunhistochemisch über PCNA und Caspase-3 dargestellt. Lebertumore ohne Pfortaderastokklusion dienen zur Kontrolle. Zur Untersuchung des Langzeitüberlebens nach PBL dienen Tiere mit einem Untersuchungszeitraum von 21 Tagen. Die Auswertung dieser Tiere beschränkt sich vor allem auf die Ermittlung des Tumolvolumens.

## 2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen waren Teil eines Versuchsvorhabens, welches von der lokalen Kreispolizeibehörde über die Tierschutzbeauftragte und das Veterinäramt des Saarpfalzkreises in 66424 Homburg/Saar genehmigt wurde. Die Finanzierung erfolgte im Rahmen von HOMFOR 2004/2005 zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses. Für die selbstständige Durchführung der Versuche erhielt der Antragsteller eine Ausnahmegenehmigung. Die Versuche wurden gemäß den UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (UKCCCR [1998], pp 1-10) und den Interdisciplinary Principles and Guidelines for the Care and Use of Animals in Research, bearbeitet von der National Academy of Science und veröffentlicht von den National Institutes of Health (NIH [1996], o.S.), durchgeführt. Die Experimente und die Tierhaltung entsprachen den Richtlinien der Tierschutzgenehmigung und standen unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes, Frau Dr. med. vet. M. Frings.

### 2.1 Versuchstierart und -haltung

Für die Versuche wurden zwölf bis 16 Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse (vgl. Fotoseite im Anhang) mit einem Körpergewicht von  $19,6 \pm 0,2$ g verwendet. Die Beschaffung der Tiere erfolgte mindestens zwei Wochen vor der Versuchsdurchführung bei Charles River WIGA (Deutschland) GmbH in Sulzfeld.

Die Tiere wurden bei temperatur- und luftfeuchtigkeitskontrollierten Verhältnissen (Raumtemperatur: 22 - 24°C, Luftfeuchtigkeit: ~60%) in einem geregelten zwölf Stunden Nacht/zwölf Stunden Tag Rhythmus (vgl. *Jilge B, Kunz E* [2004], pp 311-325) bei *ad libitum* Zugang zu Wasser und rohfaserreicher fester Nahrung (Haltungsfutter Ratte/Maus, Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage, Deutschland; zur Futterzusammensetzung vgl. Anhang) zu jeweils zehn Tieren in Käfigen in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gehalten (vgl. *Ritskes-Hoitinga M* [2004], pp 470-474). 24 Stunden vor dem Versuch wurden die Tiere zur Adaption in Einzelkäfige umgesetzt und bei Langzeitversuchen auch postoperativ dort gehalten.

## 2.2 Versuchsanordnung und -ablauf

### 2.2.1 Anästhesie, Laparotomie und Verschluss des Abdomens

Die Versuche wurden in Vollnarkose durchgeführt. In Abhängigkeit vom Körpergewicht (KG) des Tieres wurde 20mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und 75mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketanest®, Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) intraperitoneal injiziert (vgl. *Buerge T, Weiss T* [2004], pp 521-523; *Shimizu S* [2004], pp 534-535).

Anschließend erfolgte die Rasur des Abdomens, der Flanken und des distalen Thorax mit einem Elektrorasierer (Elektra II GH 204, Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland). Der rasierte Bereich wurde durch Aufsprühen einer Desinfektionslösung (Softasept® N, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Um ein Austrocknen der Augen zu vermeiden, wurde den Tieren Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) lokal verabreicht. Anschließend wurde das Tier am Schwanz und an den vier Extremitäten mit Pflaster (Leukosilk® 10mm, Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland) in Rückenlage auf einer Korkplatte ausgestreckt fixiert.

Um ein Zurückfallen der Zunge und eine damit einhergehende Beeinträchtigung der Atmung zu vermeiden, wurde die Zunge des Tieres mit einer Pinzette leicht nach links aus der Maulöffnung herausgezogen.

Für die einzelnen mikrochirurgischen Schritte gelangte ein Operationsmikroskop (Leica M 651, Leica Camera AG, Solms, Deutschland) mit Kamera (Leica IC A, Leica Camera AG), Monitor (RM-W100 Sony Trinitron, Sony Deutschland GmbH, Köln, Deutschland) und Videoanschluss (Video Cassette Recorder NV-SV120, Panasonic Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz.

Die Eröffnung des Abdomens erfolgte über eine mediane Laparotomie, wobei im ersten Schritt nur die Haut mit einer groben Schere und in einem weiteren Schritt die Linea Alba, also nur Faszie und keine Muskulatur, mit einer feinen Schere durchtrennt und das Xyphoid beidseits von den Bändern gelöst wurde. Die Auslagerung der Bauchdecke erfolgte rechts und links mit Hilfe im oberen Drittel der Laparotomie angesetzten Klemmchen, die jeweils über ein 5mm hohes Klötzchen gelagert wurden, um eine Höhenregulierung der Abdominalwand zu gewährleisten. Das Xyphoid wurde mit einem zusätzlichen Klemmchen über den Kopf des Tieres aufgespannt (vgl. Abbildung 2.1).

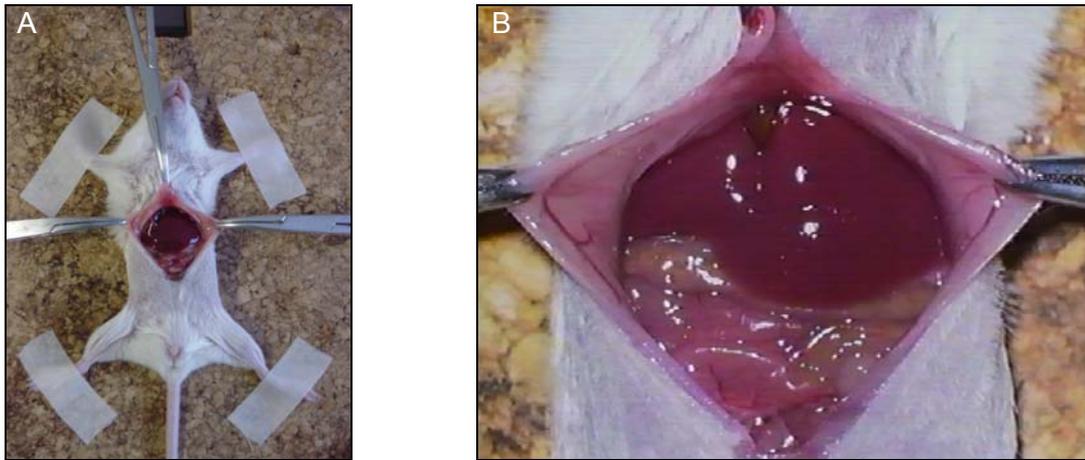


Abb. 2.1: Laparotomie (A: Übersichtsaufnahme, B: OP-Mikroskop 10x)

Anschließend wurden zunächst die den LL und LM fixierenden Bänder gelöst. Mit der Mikroschere wurden die Bänder zwischen LM und Zwerchfell (Ligamentum falciforme hepatis), LL und Zwerchfell (Ligamentum triangulare sinistrum) sowie LL und Lc (Omentum minus und Ligamentum hepatogastricum omenti minoris) durchtrennt. Alle Angaben zur Lokalisation werden aus der Sicht des Tieres angegeben. Die Angaben des LL beziehen sich immer auf den umgedrehten Leberlappen. (Nomenklatur analog zu *Aprahamian M, Freund Y* [2004])

Um bei der Präparation keine Parenchymverletzungen zu verursachen, wurden in mikrochirurgischer Technik nur feuchte Tupfer (Wattestäbchen (kleiner Kopf), unsteril, Fink & Walter GmbH, Merchweiler, Deutschland) verwendet.

Bei den weiteren Operationsschritten wurde mit äußerster Sorgfalt darauf geachtet, dass die Unterseite des LL nicht berührt wurde, um Artefakte vor allem im Rahmen der Intravitalmikroskopie (IVM) zu vermeiden.

Nach Durchführung der PBL und/oder Tumorzellinjektion, je nach Zugehörigkeit der Tiere zu den Versuchsgruppen, wurde in das offene Abdomen 1ml NaCl appliziert und die einzelnen Leberlappen, die Milz, der Magen und der Darm anatomisch repositioniert.

Die Laparotomie wurde allschichtig mit 5-0 Prolene (5-0, C-1, blau monfil, Pronova™, Ethicon GmbH) beginnend über dem Xyphoid verschlossen.

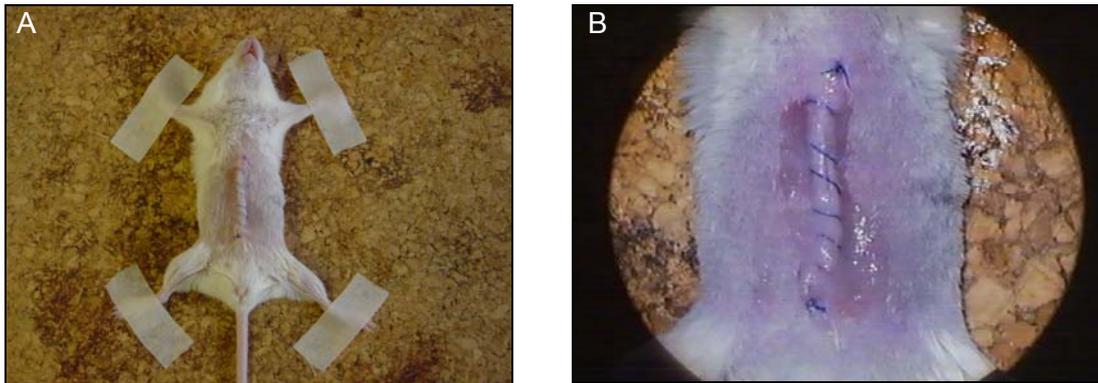


Abb. 2.2: Naht der Laparotomie (A: Übersichtsaufnahme; B: OP-Mikroskop 6x)

Nach Abschluss der Operation wurden die Tiere wieder in Einzelkäfige mit Einstreu verbracht, wobei sie für die ersten postoperativen Stunden unter eine Rotlichtlampe (IR 801 100W, efbe Elektrogeräte GmbH, Bad Blankenburg, Deutschland) gelegt wurden, um eine Auskühlung zu vermeiden.

Die Tiere hatten im weiteren Verlauf *ad libitum* Zugang zu Nahrung und Wasser. Mindestens einmal pro Tag wurden die Tiere auf die Fellbeschaffenheit und das Verhalten untersucht. Bei einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes oder anderer Komplikationen wären die Tiere euthanasiert und aus dem Versuch genommen worden. Dies war jedoch bei keinem der Versuchstiere notwendig.

### 2.2.2 Pfortaderastligatur

Der LL wird von der linken Vena portae versorgt (VPLL). Über portal-portale beziehungsweise portal-venöse Shunts kann die Blutversorgung des LL retrograd über den LM versorgt werden (VPLM). Aus diesem Grund wurden zur Unterbindung des portalvenösen Blutflusses des LL sowohl die VPLL als auch die VPLM ligiert.

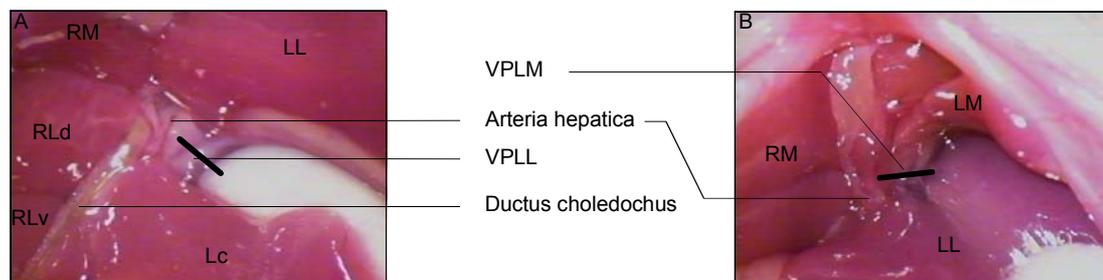


Abb. 2.3: Operationssitus, A: PBL der VPLL (40x) und B: PBL der VPLM (25x)

Hierzu wurde in 40-facher Vergrößerung die jeweilige Pfortader von ihrer begleitenden Arterie freipräpariert und zuerst die VPLL mit 9-0 Ethilon® (Ethilon® schwarz monofil 9-0, 0,3 metric BV-4, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) sowie anschließend die VPLM mittels Durchstichligatur (9-0 Ethilon®) ligiert.

Die Abbildung 2.4 zeigt als Fotoserie die genaue Vorgehensweise bei der PBL (vgl. auch Abbildung 1.1):

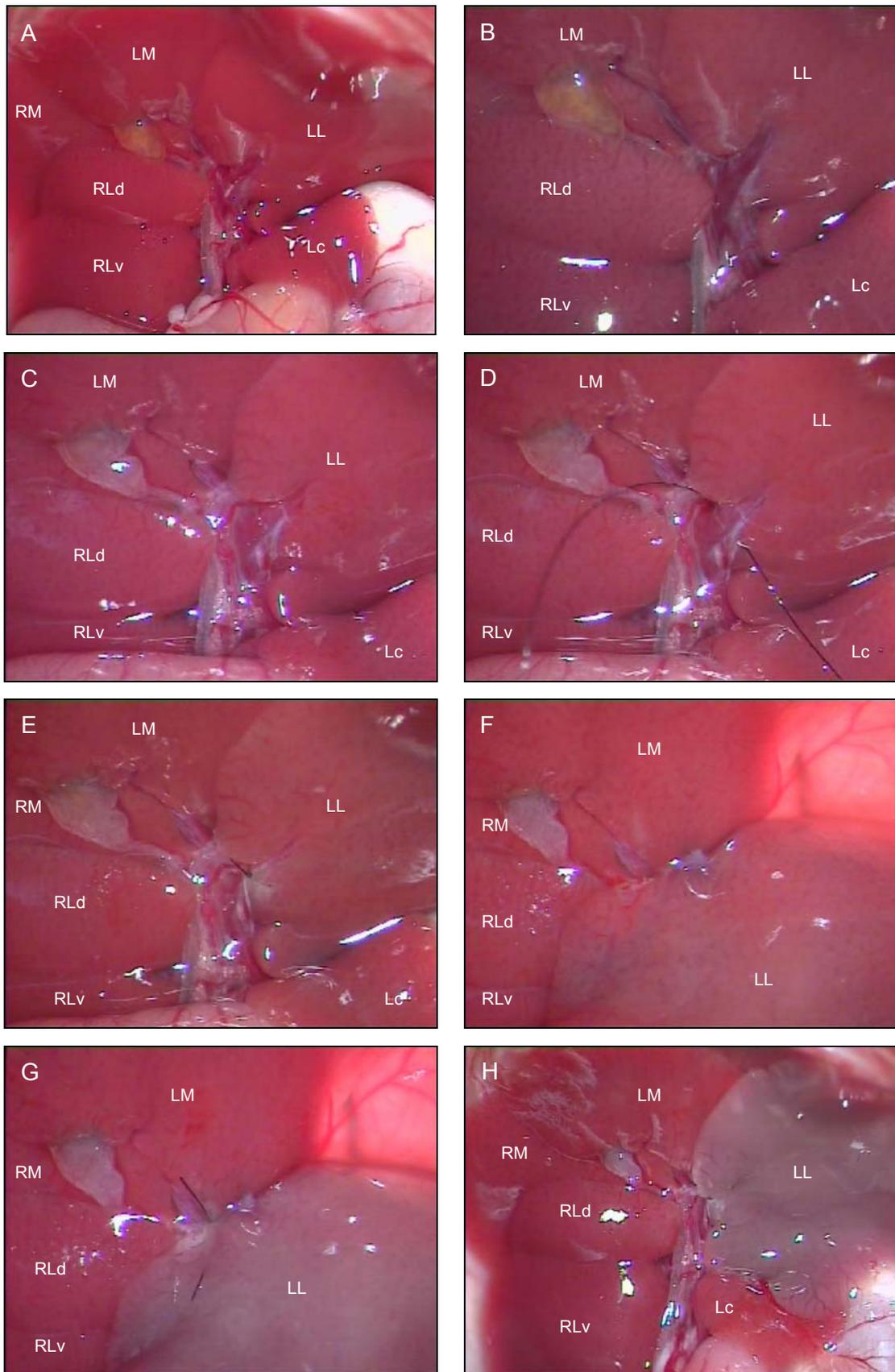


Abb. 2.4: Fotoserie PBL  
 A: Leberübersicht vor PBL (16x), VPLL-PBL: B - E (25x), VPLM-PBL: F - G (25x),  
 H: Leberübersicht nach PBL (16x)

### 2.2.3 Tumorzellimplantation

Es wurden CT26.WT-Zellen (LGC Promochem, Wesel, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (Zellkulturmedium des Roswell Park Memorial Institute) mit L-Glutamine, Penicillin/Streptomycin und 10% FCS (Foetal Bovine Serum Gold; alles von PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) im Brutschrank (Cellstar Intermed, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Für die Implantation wurden die Zellen aus der ersten und zweiten Passage verwendet. Die Zellen wurden mit Trypsin (0,5g Viralex Trypsin/l, 0,2g EDTA/l) in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ohne Calcium, Magnesium und Natriumbikarbonat; PAA Laboratories GmbH) von der Kulturschale abgelöst und dann mit RPMI (PAA Laboratories GmbH) gewaschen. Nach dreiminütigem Zentrifugieren bei 1600 Umdrehungen pro Minute wurde der Überstand abpipettiert und zur Einstellung der Zellzahl ein Aliquot der Zellsuspension 1:60 mit Trypanblau 0,4% (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und PBS (PAA Laboratories GmbH) verdünnt (50µl PBS + 9µl Trypanblau + 1µl Zellen) und in eine Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,100mm, Volumen 0,0025mm<sup>2</sup>, Plan Optik GmbH, Elsoff, Deutschland) gegeben (vgl. *Naumann A et al.* [2002], S 523; *Phillips HJ* [1973], pp 406-407; *Schärfe J* [2004], S 335). Die Zellen wurden ausgezählt und die Zellzahl auf  $5 \times 10^5$  Zellen in PBS (PAA Laboratories GmbH) eingestellt. Für jedes Tier wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Tumorzellen (TU-Zellen) in 10µl PBS in eine Mikroliterspritze (Hamilton 25µl, 32G, Hamilton Co., Bonaduz, Schweiz) aufgezogen (vgl. z.B. *Tisch M et al.* [2002], S 922). Zur Untersuchung des Langzeitüberlebens nach PBL wurden  $1 \times 10^5$  TU-Zellen aufgezogen. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte unmittelbar vor der TU-Zellimplantation. Die Implantation erfolgte subkapsulär auf der Unterseite des LL. Hierfür wurde der LL gedreht und über eine Komresse ohne die Unterseite des LL zu berühren ausgelagert. (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], p 454)

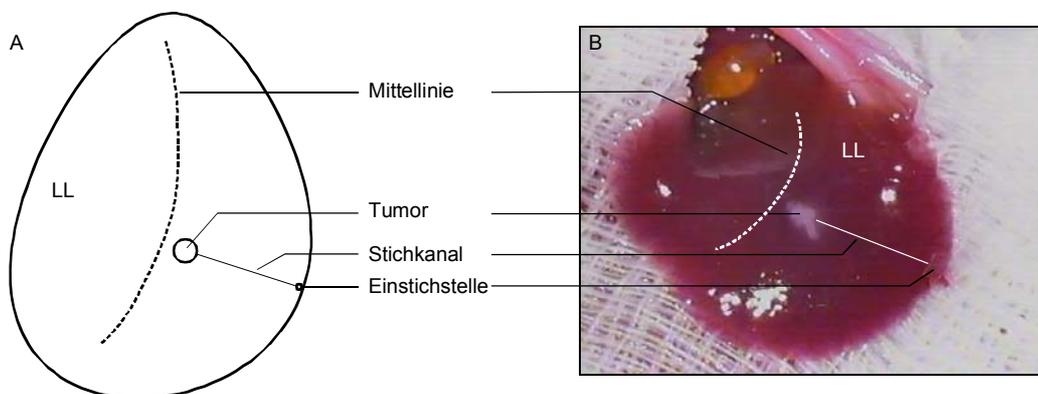


Abb. 2.5: TU-Platzierungsstelle (A: schematisch; B: *in situ* nach Injektion 16x)

Der LL wurde mit einem Tupfer am linken Rand leicht fixiert. Die Kanüle der Hamiltonspritze wurde subkapsulär von der linken Seite des LL eingeführt und langsam bis kurz vor die Mittellinie des LL vorgeschoben. Die TU-Zellen wurden über zwei Minuten appliziert, um ein lokales, isoliertes, subkapsuläres Depot zu erzielen (vgl. Abbildung 2.6). (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], p 454)

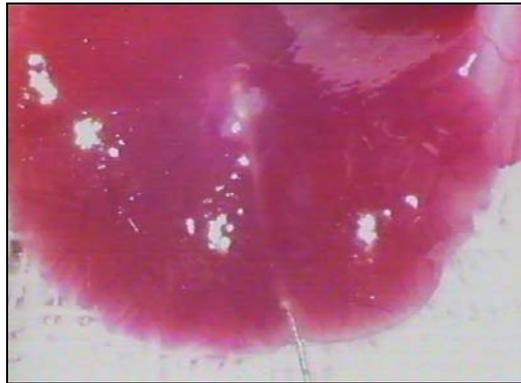


Abb. 2.6: TU-Implantation (OP-Mikroskop 25x)

Anschließend wurde die Kanüle zurückgezogen und die Einstichstelle mit Histoacryl® Gewebekleber (Aesculap AG & Co. KG) unter Zuhilfenahme einer 0,5-10µl-Pipettenspitze (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) verschlossen (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 454-455).

Im Anschluss daran wurde der LL mit NaCl (Ecotainer® NaCl 0,9% B. Braun, B. Braun Melsungen AG) befeuchtet und wieder in seine anatomische Position zurückgedreht (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], p 455).

#### **2.2.4 Zweite OP zur Nachuntersuchung**

Für die im Folgenden aufgeführten Nachuntersuchungen wurden die Tiere erneut narkotisiert und das Abdomen rasiert (vgl. Abschnitt 2.2.1). Das Abdomen der in Rückenlage fixierten Tiere wurde über eine mediane Laparotomie erneut eröffnet und der Schnitt über beidseitige transverse subcostale Inzisionen erweitert, wobei für die muskuläre Schnittführung ein Coagulator (Bovie®, Cautery High Temperature, Aaron Medical Corporation, St. Petersburg, USA) zum Einsatz gelangte, um den Blutverlust so gering wie möglich zu halten.

Das Abdomen wurde durch leichten Zug an den beiden segelförmigen abdominalen Haut-Muskellappen jeweils beidseits nach cranial aufgespannt (vgl. Fotoseite im Anhang).

Bei den Tieren der Gruppen 0 und I wurden, wie in Abschnitt 2.2.1 aufgeführt, die den LM und LL fixierenden Strukturen gelöst. Bei den Tieren der Gruppen II bis XIII wurden eventuell zwischenzeitlich aufgetretene intraabdominelle Adhäsionen gelöst. Im Anschluss daran wurde das Tier in Linksseitenlage auf der Korkplatte des Rotationstisches fixiert. Diese strenge Positionierung ist notwendig, um eine uneingeschränkte Perfusion des LL zu gewährleisten. (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 453-460; *Menger MD et al.* [1991], pp 158-169)

Von der linken Seite der Maus wurde in das Abdomen ein Löffel positioniert und in den Auslagerungsarm eingespannt. Eine feuchte Kompresse wurde über den Löffel bis an den Leberhilus herangelegt, um bei der Positionierung des LL Zug am Leberhilus zu vermeiden. Danach wurde der LL mit Hilfe von zwei Tupfern (Wattestäbchen (kleiner Kopf), unsteril, Fink & Walter GmbH) durch rollende Bewegungen leicht gedreht und auf der feuchten Kompresse ausgelagert und die Position der Unterseite des LL eingestellt, ohne den Blutfluss des LL zu kompromittieren. Die Unterseite des LL wurde anschließend mit NaCl (Ecotainer® NaCl 0,9% B. Braun, B. Braun Melsungen AG) befeuchtet und auf selbiger ein rundes Deckglas mit 12mm Durchmesser (Deckgläser Ø 12mm No. 1, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG., Marienfeld, Deutschland) zur Vermeidung der Austrocknung des LL positioniert (vgl. Fotoseite im Anhang). (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], p 455)

Zur Stabilisierung des Tieres erfolgte bis zur Durchführung der weiteren Untersuchungen, wie IVM, eine 15-minütige Wartezeit.

### **2.3 Einteilung der Versuchsgruppen**

Für die Untersuchungen zur Auswertung der Pfortaderastligatur auf die Leber wurden die Tiere in folgende Gruppen randomisiert eingeteilt (vgl. Tabelle 2.1).

Gruppe	OP	Messzeitpunkte	Zahl der Versuchstiere (n)
0	sham-PBL	- $\frac{1}{2}$ h; $\frac{1}{2}$ h; 1h	n = 4
I	PBL	- $\frac{1}{2}$ h; $\frac{1}{2}$ h; 1h	n = 8
II	PBL	- $\frac{1}{2}$ h, $\frac{1}{2}$ h, 14d	n = 4
III	PBL	3d	n = 8
IV	PBL	7d	n = 8
V	PBL	14d	n = 8

Tab. 2.1: Einteilung der tierexperimentellen Versuchsgruppen (Gruppe 0 - V)

Die Gruppe 0 diente als sham-operierte Kontrollgruppe. Nach Erhebung der Ausgangsmesswerte wurden die Pfortaderäste freipräpariert, jedoch nicht ligiert (sham-PBL). Danach wurden die Tiere 30 Minuten und 60 Minuten nach sham-PBL nachuntersucht. In der Gruppe I (Baseline-Gruppe) wurde nach Erhebung der Ausgangsmesswerte die PBL durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere gemäß der Kontrollgruppe 30 Minuten und 60 Minuten nach PBL nachuntersucht (vgl. Abbildung 2.7).

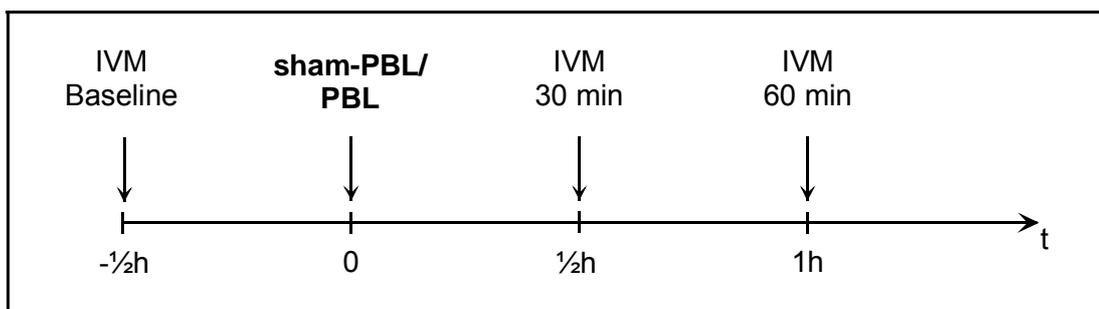


Abb. 2.7: Beobachtungszeitpunkte der Gruppen 0 und I mittels IVM

Die Gruppe II diente zur genauen Dokumentation der HABR. Hierfür wurden zu den Zeitpunkten Baseline, 30 Minuten und 14d nach PBL mit Hilfe der Laser-Doppler-Flow-Messung (LDF) sowohl der arterielle als auch der venöse linkshepatische Blutfluss separat gemessen (vgl. Abbildung 2.8).

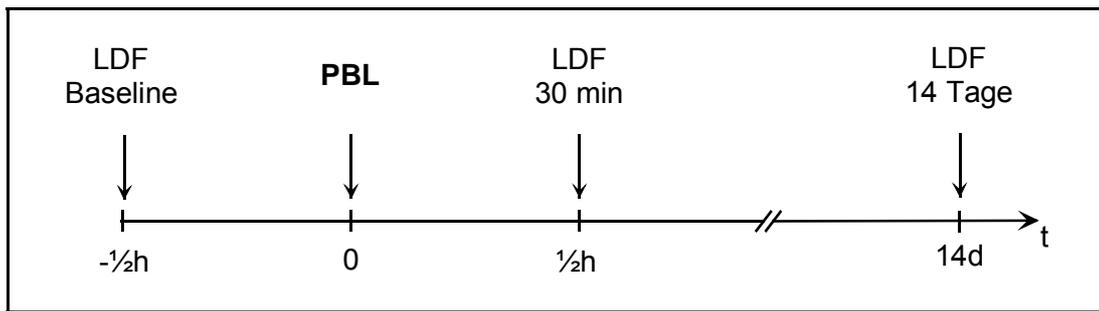


Abb. 2.8: Beobachtungszeitpunkte der Gruppe II mittels LDF-Messung

In den Gruppen III bis XI wurden die Tiere nach der Pfortaderastligatur je 3d, 7d und 14d im Rahmen einer zweiten OP nachuntersucht (vgl. Abbildung 2.9).

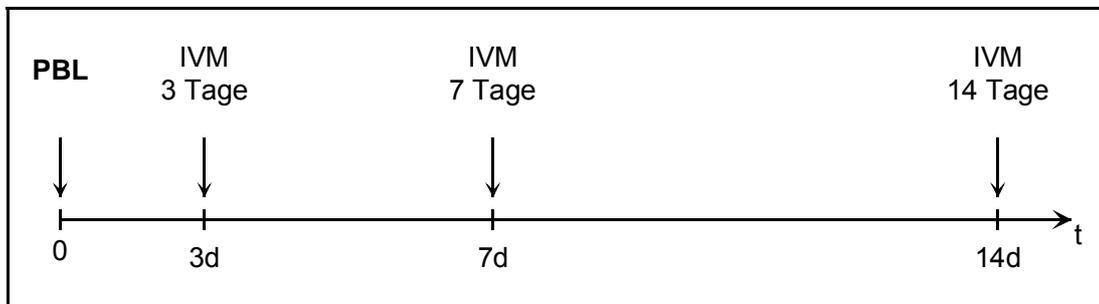


Abb. 2.9: Beobachtungszeitpunkte der Gruppen III bis V mittels IVM

Für die Untersuchungen zur Auswirkung der PBL auf den implantierten TU wurden die Tiere in die folgenden Gruppen (n=8) randomisiert eingeteilt. Tiere, denen TU-Zellen implantiert worden waren, wurden im Rahmen dieser ersten OP mit PBL beziehungsweise sham-PBL behandelt. Die Tiere wurden jeweils am darauf folgenden 3d, 7d und 14d im Rahmen einer zweiten OP nachuntersucht. Folgende Versuchsgruppen wurden somit miteinander verglichen (vgl. Tabelle 2.2).

Gruppe	OP	Messzeitpunkte	Zahl der Versuchstiere (n)
VI	Tumor, sham-PBL	3d	n = 8
VII	Tumor, PBL	3d	n = 8
VIII	Tumor, sham-PBL	7d	n = 8
IX	Tumor, PBL	7d	n = 8
X	Tumor, sham-PBL	14d	n = 8
XI	Tumor, PBL	14d	n = 8

Tab. 2.2: Einteilung der tierexperimentellen Versuchsgruppen (Gruppe VI - XI)

Zur Untersuchung des Langzeitüberlebens nach PBL wurden ferner Tiere nach Randomisierung mit einer PBL oder einer sham-Therapie behandelt und nach 21d nachuntersucht (vgl. Tabelle 2.3). Die Nachuntersuchungen beinhalteten keine LDF-Messungen und keine IVM-Untersuchungen.

Gruppe	OP	Messzeitpunkte	Zahl der Versuchstiere (n)
XII	Tumor, sham-PBL	21d	n = 8
XIII	Tumor, PBL	21d	n = 8

Tab. 2.3: Einteilung der tierexperimentellen Versuchsgruppen (Gruppe XII und XIII)

## 2.4 Untersuchungstechniken und erhobene Parameter

### 2.4.1 Makrohämodynamikanalyse mittels LDF

Der Blutfluss im Hilus und die Mikrozirkulation des LL wurden mittels LDF ermittelt. Für die Messungen mittels LDF wurde ein floLAB Server mit Sonde (floLAB server, Laser Doppler Perfusion Monitor, Moor Instruments Ltd, Millwey/Axminster/Devon, England) verwendet. (vgl. *Eipel C et al.* [2005], pp 477-484) Prinzip der LDF ist es, das reflektierende Licht in ein akustisches oder visuelles Signal umzuwandeln, um Änderungen in der Mikrozirkulation zu erkennen. Mit dieser Methode lassen sich

wiederholbare Messungen des Blutflusses sowohl von großen Gefäßen als auch von kleinen Kapillaren durchführen ohne dabei das Gewebe zu verletzen.

Die LDF wurde bei den Tieren der Gruppen 0 und I von dem LL-Gewebe durchgeführt. Der Zeitpunkt der Messung lag immer vor der IVM, das heißt es gab drei LDF-Messungen:  $Flow_{Baseline}$ ,  $Flow_{30 \text{ min}}$  und  $Flow_{60 \text{ min}}$ . Für die Durchführung dieser Messungen wurde eine Halterung mit Feinjustierung der Sonde verwendet.

Bei der Gruppe II wurden der Pfortaderast und der Ast der Leberarterie des LL freipräpariert. Hierbei wurde mit zwei spitzen Pinzetten gefäßfern präpariert, um einen Vasospasmus zu verhindern. Nach Präparation wurde jeweils ein Gefäß von der Umgebung durch schwarze Folie isoliert und dann eine LDF-Messung durchgeführt. Somit war gewährleistet, dass immer nur der Fluss in dem jeweiligen Gefäß gemessen wurde. Danach wurde dies für das andere Gefäß wiederholt. Dies geschah zu den Zeitpunkten Baseline, 30 Minuten und 14d.

Bei den Langzeitversuchen (Gruppe III bis XI) wurde die LDF immer am Leberhilus vor der TU-Implantation bei der ersten Operation und vor der IVM bei der zweiten Operation durchgeführt.

Bei den Tieren zur Untersuchung des Langzeitüberlebens (Gruppe XII und XIII) wurden keine LDF-Messungen durchgeführt.

Es wurden pro Untersuchung immer zehn Messwerte erfasst und dokumentiert.

## **2.4.2 Mikrozirkulationsanalyse mittels IVM**

### **2.4.2.1 Durchführung und Geräteanordnung**

Für die IVM wurde der LL ausgelagert und auf eine höhenverstellbare Plattform gelagert, so dass die Unterseite des Leberlappens horizontal zum Mikroskop positioniert wurde. Dies gewährleistete adäquate Blickfelder für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie. Die Oberfläche des Leberlappens wurde mit einem Deckglas bedeckt, um ein Austrocknen des Gewebes und einen Einfluss des Umgebungssauerstoffes zu vermeiden. (vgl. Abschnitt 2.2.4; vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 453-460) Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen in der Epi-Illuminationstechnik wurde ein modifiziertes Intravitalmikroskop (AttoArc HBO 100W, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) mit Kameraeinheit (FK 6990B-IQ, Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland), Timer (Video Timer VTG 33, FOR-A UK Limited, Chessington Surrey, England), Monitor (RM-668 Sony Trinitron, Sony Deutschland GmbH) und Videoan-

schluss (Video Cassette Recorder AG-7350, Panasonic Deutschland GmbH) verwendet (vgl. *Menger MD et al.* [1991], pp 158-169; *McCuskey RS et al.* [1979], pp 73-74). Als Filter kam ein Filterblock zum Einsatz, der es ermöglichte, problemlos zwischen den verschiedenen Filtern zu wechseln. Dieser war mit folgenden Filtern (alle von Carl Zeiss Jena GmbH) bestückt:

- blauer Filter (Filter No. 09, BP 450-490, FT 510, LP 515),
- UV-Filter (Filter No. 02, G 365, FT 395, LP 420) und
- grüner Filter (Filter No. 15, BP 546/12, FT 580, LP 590).

Als Objektive (alle von Carl Zeiss Jena GmbH) wurden verwendet:

- 5x Long Distance-Objektiv (Plan-NEOFLUAR<sup>®</sup>, 5x/0,15, ∞/0,17),
- 10x Long Distance-Objektiv (Plan-NEOFLUAR<sup>®</sup>, 10x/0,30, ∞/0,17) und
- 20x Wasser-Immersionsobjektiv (ACROPLAN<sup>®</sup>, 2x/0,50 Ph2, ∞/0).

Abbildung 2.10 zeigt den intravitalmikroskopischen Arbeitsplatz in schematischer Form.

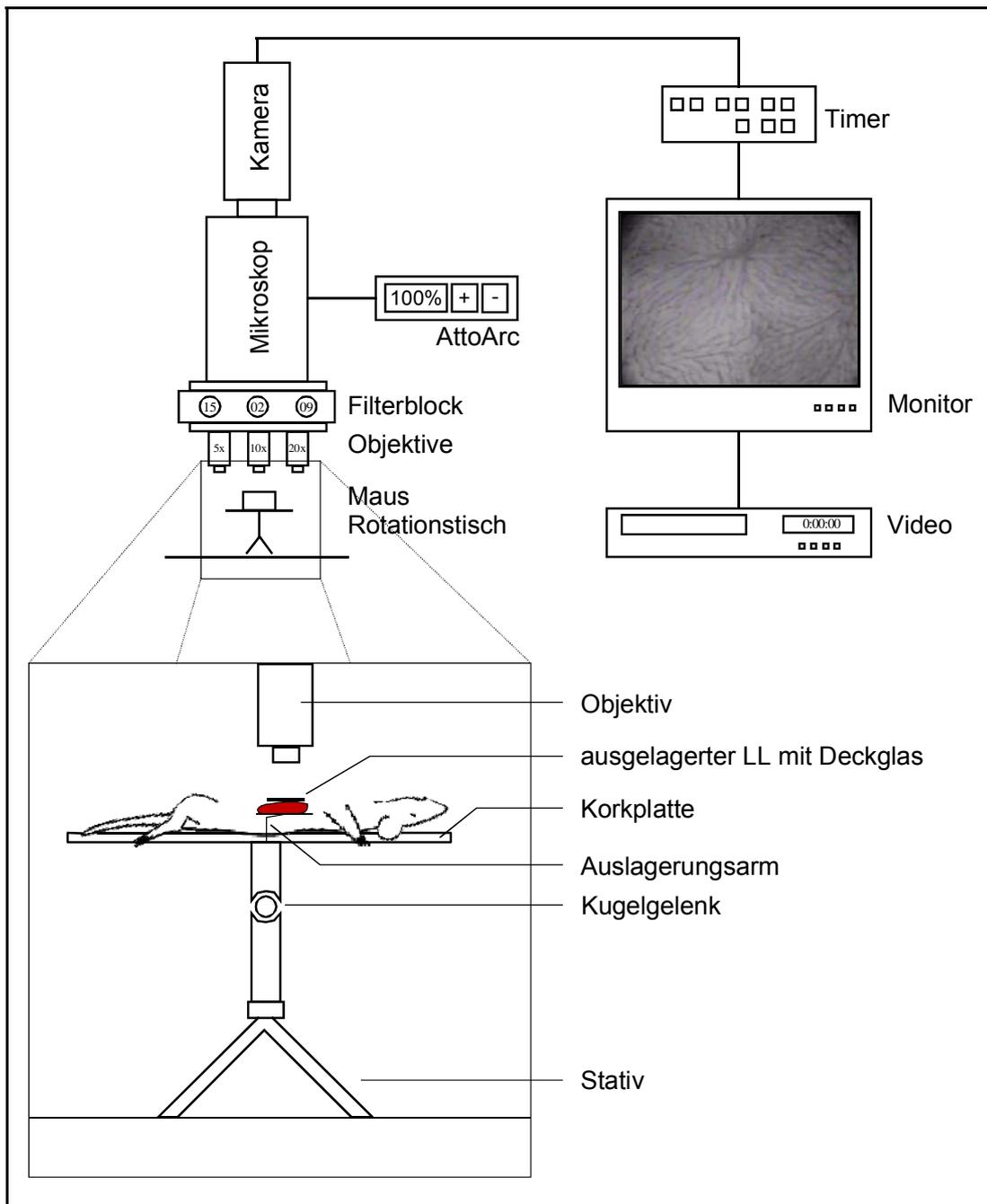


Abb. 2.10: Aufbau des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes (schematisch; vgl. z.B. *Laschke MW [2002], S 23*)

Die Maus wurde auf dem Rotationstisch unter das Intravitalmikroskop positioniert (vgl. Abbildung 2.11).

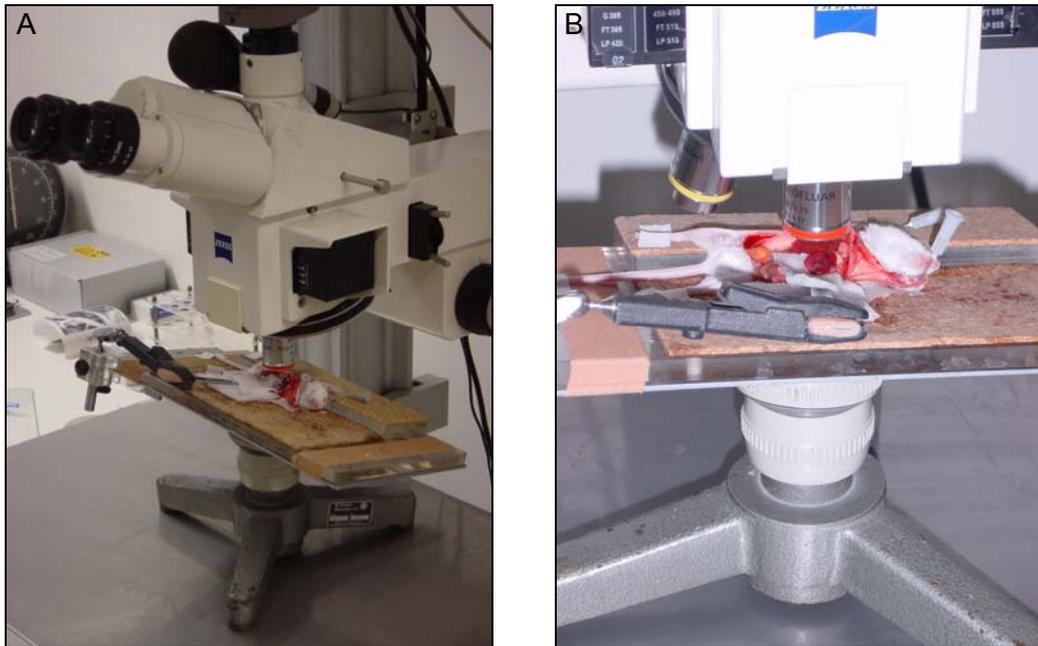


Abb. 2.11: IVM (A: Übersichtsaufnahme; B: Detailaufnahme)

Zu Beginn der IVM, noch vor Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe, wurden im nahe-ultravioletten Filtersystem (UV-Filter) zur Erfassung der hepatozellulären, parenchymatösen **NADH-Autofluoreszenz** (reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) mikroskopische Felder erfasst. Hierzu war es erforderlich, das jeweilige IVM-Feld 20 Sekunden zu bestrahlen, um das Ito-Zellen-assoziierte (= Sternzellen-assoziierte) Vitamin A auszubleichen. (vgl. z.B. *Richter S et al.* [2001], p 194; vgl. *Vollmar B et al.* [1997a], pp 164-173) Danach wurde eine jeweils zehnssekündige Aufnahme bei einer Lichtstärke von 75 und 100% durchgeführt, wobei die Licht- und Kontrastautomatik der Kamera ausgeschaltet und die Zusatzblenden des Intravitalmikroskopes einheitlich eingestellt wurden, um kontrollierte Versuchsbedingungen und somit eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (vgl. z.B. *Duebener LF et al.* [2001], p 261). Die NADH-Autofluoreszenz wird in arbitrary units (aU) angegeben. (vgl. z.B. *Vollmar B et al.* [1997a], p 166)

Im Anschluss daran wurden den Versuchstieren Fluoreszenzfarbstoffe und Latex-Partikel retrobulbär in den venösen Plexus ophthalmicus (Augengeflecht) mit einer Feindosierspritze (Feindosierspritze 1 ml/0,01ml Omnican®-F 1ml, B. Braun Melsungen AG) injiziert (vgl. *Shimizu S* [2004], pp 535-536).

Die Analyse der Angioarchitektur und mikrovaskulären Perfusion erfolgte nach retrobulbärer Kontrastmittelgabe von **Natrium-Fluoreszein** (2µmol/kg KG; C.I. 45350, VWR International GmbH; C<sub>20</sub>H<sub>10</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) in der Blaulicht Epi-Illumination (blauer Fil-

ter). Die Aufnahmen wurden bei einer Lichtstärke von 70 bis 100% und einer Aufnahmedauer von 30 Sekunden pro Feld durchgeführt.

Die leukozytäre Adhäsion innerhalb der Lebersinusoide wurde nach *in vivo* Färbung der weißen Blutzellen mit **Rhodamin 6G** ( $2\mu\text{mol/kg KG}$ ; R 4127, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland;  $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{HCl}$ ) in Grünlicht Epillumination (grüner Filter) gemessen. Die 30-sekündigen Aufnahmen erfolgten bei einer Lichtstärke von 15 bis 50%.

Parenchymatöse Zellen wurden durch *in vivo* Kernfärbung mit **Bisbenzimid** ( $2\mu\text{mol/kg KG}$ ; Hoechst; H 33342, B2261, Sigma-Aldrich Chemie GmbH;  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O} \cdot 3\text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) im UV-Filter dargestellt (vgl. Schäfer *T et al.* [2003], pp 660-667). Da durch diesen Filter die Vitamin-A-reichen Fetttropfen der Ito-Zellen (= hepatische Sternzellen) autofluoreszieren und somit die angefärbten Chromatin-Fragmente überstrahlt werden, musste bei den Bisbenzimid-Aufnahmen zunächst das Vitamin A dieser Zellen durch 20-sekündige Bestrahlung mit einer Lichtstärke von 60 bis 100% zersetzt werden. Erst danach wurden die angefärbten Chromatin-Fragmente sichtbar und 20 Sekunden mit dem Videomodul des Intravitalmikroskops aufgenommen.

Die **Latex-Partikel** (Fluoresbrite<sup>®</sup> YG Microspheres 1,0  $\mu\text{m}$ , Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland) haben im Lieferzustand eine Konzentration von  $4,55 \times 10^{10}$  Partikel/ml. Für die Injektion wurden  $5\mu\text{l}$  Fertig-Partikellösung mit  $195\mu\text{l}$  PBS (PAA Laboratories GmbH) in einem Eppendorf-Hütchen (Reaktionsgefäß 1,5ml, Carl Roth GmbH & Co. KG) gemischt, um eine Injektionslösung von  $200\mu\text{l}$  mit einer Konzentration von  $2,275 \times 10^6$  Partikeln zu erhalten. Um ein Verkleben der Partikel zu vermeiden, wurde die Lösung zunächst fünf Minuten in ein Ultraschallbad (Sonorex Super RK255H, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland) gegeben und danach drei Minuten auf einem Schüttel-Mischgerät (Reax top, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) mit 2400 Vibrationen pro Minute gerüttelt. Daraufhin wurde die Lösung in eine Feindosierspritze (Feindosierspritze 1ml/0,01ml Omnican<sup>®</sup>-F 1ml, B. Braun Melsungen AG) aufgezo-gen und noch einmal drei Minuten mit Hilfe des Schüttel-Mischgeräts (Reax top, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG) mit 2400 Vibrationen pro Minute gerüttelt, bevor sie den Tieren retrobulär injiziert wurde. Nach fünf Minuten Wartezeit erfolgten im blauen Filter die 20-sekündigen Aufnahmen pro IVM-Feld bei einer Lichtstärke von 70 bis 100%.

### 2.4.2.2 Mikrozirkulatorische Parameter

Die Messung der hepatischen mikrozirkulatorischen Parameter erfolgte off-line in einer Bild-zu-Bild Analyse der videoaufgezeichneten Bilder mit einem computerassistierten Bildanalyzesystem (CapImage, Version 6.02; Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Die Datenanalyse erfolgte in Unkenntnis der Behandlung der Versuchstiere.

Die **sinusoidale Dichte** [ $\text{mm}^{-1}$ ] wurde innerhalb der midzonalen Region des Leberazinus als totale Anzahl der **sichtbaren** Sinusoide, die eine  $500\mu\text{m}$ -Rasterlinie schneiden, gemessen. (vgl. *Vollmar B et al.* [1998], pp 1544-1553) Die **funktionelle sinusoidale Dichte** [ $\text{mm}^{-1}$ ] wurde als Zahl der **perfundierten** Sinusoide, die die  $500\mu\text{m}$ -Rasterlinie schneiden, gemessen. Der **Anteil der perfundierten Sinusoide** stellt den Prozentsatz von perfundierten Sinusoiden im Verhältnis zu der Zahl aller sichtbaren Sinusoide dar. Der **sinusoidale Durchmesser** [ $\mu\text{m}$ ] wurde senkrecht zum Gefäßverlauf gemessen. Die **Anzahl der Leukozyten**, die länger als 20 Sekunden an der sinusoidalen Wand adhärirten, wurden als Zellen pro Mikroskopfeld gezählt und werden als Anzahl pro  $\text{mm}^2$  angegeben. (vgl. *Schäfer T et al.* [2003], pp 660-667) Die **Anzahl apoptotischer Zellen** wurde durch Auszählen der Zellen, die eine Kondensation mit Bisbenzimid-gefärbten Kernen zeigten, gemessen und wird pro  $\text{mm}^2$  Mikroskopfeld angegeben (vgl. *Westermann S et al.* [1999], pp 881-889). Die **hepatozelluläre NADH-Fluoreszenz** wurde in midzonalen Regionen der Azini densitometrisch mit Hilfe computerassistierter Graulevelmessung (CapImage) am Ende einer zwanzigsekündigen Belichtung des Untersuchungsfeldes gemessen und in aU angegeben (vgl. *Vollmar B et al.* [1997a], pp 164-173). Zur Untersuchung der **Kupferzellaktivität** wurden die Anzahl der Latex-Partikel, die länger als 20 Sekunden an der sinusoidalen Wand adhärirten, gezählt. Sie wurden als Zellen pro Mikroskopfeld notiert und werden als Anzahl pro  $\text{mm}^2$  angegeben.

Für die gruppenspezifische Anwendung der IVM wurde eine variantenspezifische Vorgehensweise gewählt:

- Variante I: erfasst Tiere aus Gruppen ohne TU-Implantation
  - Variante Ia: Akutversuche, umfasst die Tiere der Gruppen 0 und I,
  - Variante Ib: erfasst Langzeitversuche, bei denen ausschließlich eine PBL durchgeführt wurde, das heißt es handelt sich um die Tiere der Gruppen III bis V und
- Variante II: subsumiert die Langzeitversuche, bei denen ein Tumor implantiert wurde, das heißt sie erfasst die Gruppen VI bis XI.

Tiere der Gruppen II, XII und XIII erhielten keine IVM-Untersuchungen.

Bei den **Akutversuchen** (Variante Ia) wurden in den drei IVM-Untersuchungen (Baseline, 30 Minuten, 60 Minuten) die Felder randomisiert auf dem gesamten LL ausgewählt. Zunächst wurden in der 10-fachen Vergrößerung einige Übersichtsbilder im blauen Filter erstellt und danach verschiedene Aufnahmen in der 20-fachen Vergrößerung angefertigt, die der Auswertung am Cap-Image (Cap-Image, Version 6.02) dienen. Die 60-minütige Untersuchung der Variante Ia entspricht der Variante Ib, mit Ausnahme des Lokalisationsortes der LDF-Messung.

Tabelle 2.4 zeigt zusammenfassend die Vorgehensweise (Variante Ia und Ib) bei der IVM für die 20-fache Vergrößerung und die Kriterien der Cap-Image-Auswertung, die sich ausschließlich auf die Bilder der 20-fachen Vergrößerung beschränkt.

IVM Untersuchung	Variante Ia			Variante Ib	Cap-Image-Auswertung (Angaben pro Bildeinheit)
	Baseline	30 Minuten	60 Minuten		
1. LDF-Messung	LL-Gewebe	LL-Gewebe	LL-Gewebe	Leberhilus	–
2. Natrium-Fluoreszein (20x Objektiv)	10 Felder	10 Felder	10 Felder		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Gefäßdichte</li> <li>- Länge/Feld der Gefäße</li> <li>- Perfundierte Gefäße</li> <li>- Perfundierter Gefäßanteil</li> <li>- Gefäßdurchmesser (fünf Gefäße)</li> </ul>
3. Rhodamin 6G (20x Objektiv)	10 Felder	10 Felder	10 Felder		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anzahl der Sticker</li> </ul>
4. NADH (20x Objektiv)	je 1 Feld mit 75% und 100% Lichtstärke	je 1 Feld mit 75% und 100% Lichtstärke	je 1 Feld mit 75% und 100% Lichtstärke		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Grauwertbestimmung (fünf Gewebeorte)</li> </ul>
5. Bisbenzimid (20x Objektiv)	–	–	10 Felder		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anzahl der Apoptosen</li> </ul>
6. Latex-Partikel (20x Objektiv)	–	–	10 Felder		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anzahl der Latex-Partikel</li> </ul>

Tab. 2.4: IVM und Cap-Image der Varianten Ia und Ib

Bei den Tieren der **Langzeitversuche** mit TU-Implantation (Variante II) wurde zunächst in der 5-fachen Vergrößerung im blauen Filter der gesamte TU in Übersichtsbilder aufgenommen. Im Rahmen der Cap-Image-Auswertung konnte dann mit Hilfe dieser Bilder der TU ausgemessen (Fläche und Durchmesser) werden. In der 10-fachen Vergrößerung im blauen Filter wurde der gesamte TU-Rand aufgenommen. Diese Bilder dienen der Auswertung der Zahl der vom TU wegführenden Gefäße, der Breite und der prozentualen Anteile der angiogenic front der Circumferenz des TU im Cap-Image.

In der 20-fachen Vergrößerung wurde der LL in vier Felderarten unterteilt:

- A-Felder = Normale Leber,
- B-Felder = Tumorrand,
- C-Felder = Tumorgefäß und
- D-Felder = Tumorzentrum.

Abbildung 2.12 zeigt dies schematisch.

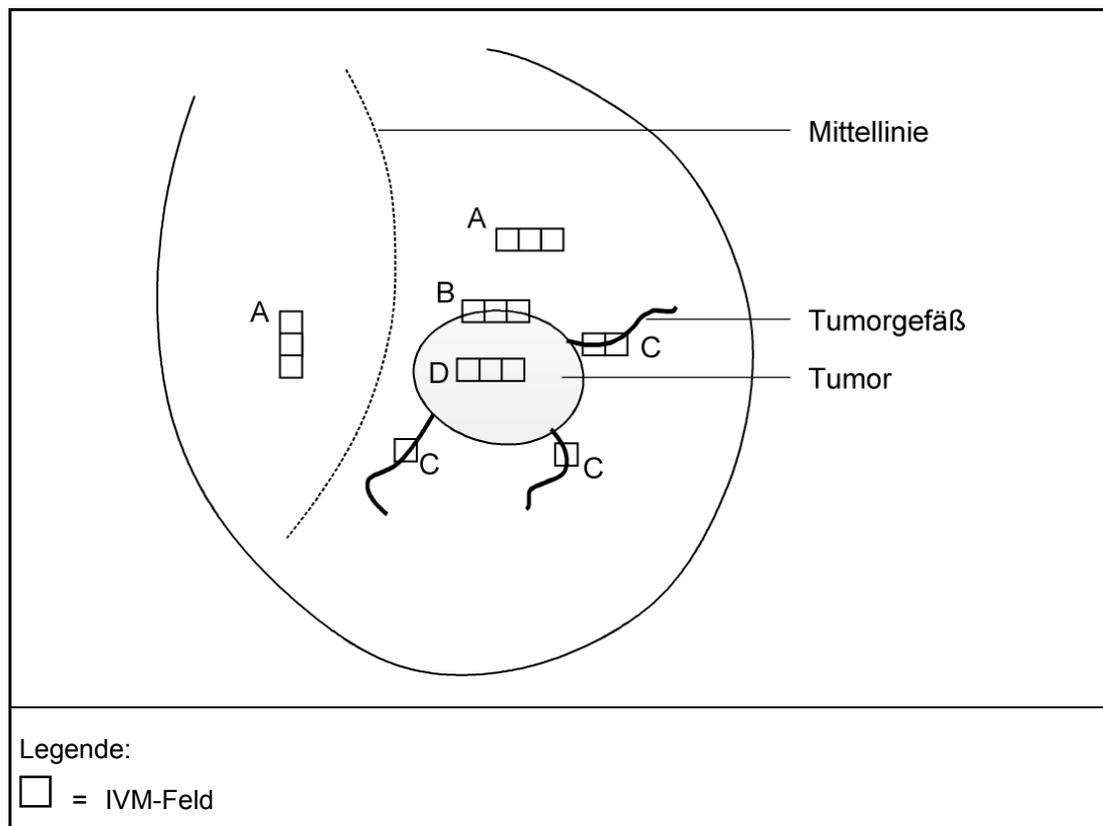


Abb. 2.12: Einteilung des LL der TU-Tiere für IVM (schematisch)

Tabelle 2.5 gibt sowohl die IVM-Vorgehensweise als auch die Cap-Image-Auswertung bei den Langzeitversuchen mit TU-Implantation in der 20-fachen Vergrößerung wieder.

Untersuchung \ IVM	Variante II			Cap-Image-Auswertung (Angaben pro Bildeinheit)
	PBL	TU	PBL + TU	
<b>1. LDF-Messung</b>	Leberhilus	Leberhilus	Leberhilus	–
<b>2. Natrium-Fluoreszein</b> (20x Objektiv)	10 Felder	3 A-Felder 3 B-Felder 3 C-Felder 3 D-Felder	3 A-Felder 3 B-Felder 3 C-Felder 3 D-Felder	- Gefäßdichte A, B, D - Perfundierte Gefäße A, B, D - Perfundierter Gefäßanteil A, B, D - Gefäßdurchmesser A, B, C, D (fünf Gefäße) - Länge/Fläche der Gefäße C, D - Flächengröße der Gefäße C, D
<b>3. Rhodamin 6G</b> (20x Objektiv)	10 Felder	3 A-Felder 3 B-Felder 3 C-Felder 3 D-Felder	3 A-Felder 3 B-Felder 3 C-Felder 3 D-Felder	- Anzahl der Sticker
<b>4. NADH</b> (20x Objektiv)	je 1 Feld mit 75% und 100% Lichtstärke	je 1 Feld mit 75% und 100% Lichtstärke	je 1 Feld mit 75% und 100% Lichtstärke	- Grauwertbestimmung (fünf Gewebeorte)
<b>5. Bisbenzimid</b> (20x Objektiv)	10 Felder	3 A-Felder 3 B-Felder 3 C-Felder 3 D-Felder	3 A-Felder 3 B-Felder 3 C-Felder 3 D-Felder	- Anzahl der Apoptosen
<b>6. Latex-Partikel</b> (20x Objektiv)	10 Felder	3 A-Felder 3 B-Felder 3 C-Felder 3 D-Felder	3 A-Felder 3 B-Felder 3 C-Felder 3 D-Felder	- Anzahl der Latex-Partikel

Tab. 2.5: IVM und Cap-Image der Variante II

Nach der abschließenden Blutentnahme erfolgte die Entnahme der gesamten Leber, wobei zunächst schrittweise die restlichen Leberbänder gelöst wurden. Hierbei handelt es sich im Einzelnen um das Ligamentum triangulare dextrum, die Ligamenti coronarii dextrum et sinistrum und das Ligamentum hepatoduodenale omenti minoris. Anschließend wurden nacheinander die Pfortader, der Ductus hepaticus, die Vena und Arteria renalis dexter, die infrahepatische Vena cava und die suprahepatische Vena cava durchtrennt. Die Versuchstiere starben durch Entbluten.

### **2.4.3 Laborchemische Untersuchungen**

Nach Abschluss der letzten IVM-Untersuchung des Tieres wurde die Bifurkation der Aorta freipräpariert und mit einer abgebogenen 27G  $\frac{3}{4}$  Kanüle (BD Microlance™ 3, BD Medical Pharmaceutical Systems) zur Blutabnahme punktiert (vgl. *Lushbough CH, Moline SW* [1961], pp 305-308; *Fukuta K* [2004], pp 545-546).

Das entnommene Blut wurde in ein Serum-Röhrchen (Probengefäß 1,3ml Z zur Serumgewinnung, Inhalt: Präparierungsträger/Gerinnungsaktivator, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) asserviert und anschließend drei Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Universal 30RF, Andreas Hettich GmbH & Co. KG). Von dem Serum wurden Aliquots gewonnen und bei -80°C eingefroren. Die Aktivität der Aspartataminotransferase (ASAT), Alaninaminotransferase (ALAT) und Laktatdehydrogenase (LDH) wurden mit Hilfe enzymatischer Methoden mit einem selektiven Probenautoanalysator (Roche/Hitachi 717®, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) bestimmt. (vgl. *Bergmeyer HU et al.* [1978], pp 58-73)

## **2.5 Histologie, Immunhistochemie und Western Blot**

### **2.5.1 Lebergewicht, Tumolvolumen und Gewebeasservierung**

Der LL wurde vollständig von der Restleber auf einer Korkplatte getrennt, in dem die Gefäße, die den LL noch mit der Restleber verbunden haben, nämlich im einzelnen VPLL, VPLM, Arteria hepatica und Ductus hepaticus, durchtrennt wurden. Der LL sowie die Restleber wurden jeweils mit einer Analysewaage (Analytical Plus, OHAUS GmbH Deutschland, Gießen, Deutschland) gewogen. Der LL wurde für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen und die Berechnung des TU-Volumens mit Hilfe eines tissue slicer (McIlwain Tissue Shopper; Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland) in 1mm-dicke Proben geschnitten. Diese Schnitte wurden mit Hilfe eines Video-Stereomikroskops (Leica IC A, Leica Camera

AG) auf Video aufgenommen. Das TU-Volumen wurde mit folgender Gleichung (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 455; *Kollmar O et al.* [2006], p 266) errechnet:

$$\text{Tumolvolumen [ mm}^3 \text{ ]} = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{a}{2} \times \frac{b}{2} \times \frac{c}{2},$$

wobei a, b und c den drei senkrecht ausgerichteten TU-Durchmessern entsprechen. Diese Durchmesser wurden im Cap-Image (Cap-Image, Version 6.02) ausgemessen.

Eine Probe wurde in vierprozentigem Formaldehyd (siehe Probe 1) und eine in flüchtigem Stickstoff (siehe Probe 2) gelagert.

### 2.5.2 HE-Färbung und Immunhistochemie (PCNA und Caspase-3)

Probe 1 wurde in Einbettkassetten (Einbettkassette mit Deckel, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) 48 Stunden in Formaldehyd 4% (Carl Roth GmbH & Co. KG) gelagert und danach zwei Stunden mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend durchliefen die Proben eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol, Carl Roth GmbH & Co. KG):

- ein Durchgang à 30 Minuten in 70% Alkohol,
- ein Durchgang à 30 Minuten in 80% Alkohol,
- ein Durchgang à 30 Minuten in 90% Alkohol und
- vier Durchgänge à 30 Minuten in 100% Alkohol.

Danach wurden die Proben dreimal je eine halbe Stunde in Xylol (Carl Roth GmbH & Co. KG) gegeben. Anschließend wurden sie in Paraffin (Granopent<sup>®</sup> „P“, Paraffin in Plättchen, Carl Roth GmbH & Co. KG) eingebettet, in dem sie mit Sakura Tissue-Tek<sup>®</sup> (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, USA) bei -4°C 20 Minuten lang heruntergekühlt wurden. Es wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica SM2000R, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland) 5µm-dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträgern (Objektträger, ca. 76x26mm, geputzt/gebrauchsfertig, Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) fixiert. Die fixierten Schnitte wurden entparaffiniert und anschließend für die Routinehistologie gemäß Standardverfahren mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung).

Die Auswertung erfolgte an einem Olympus BX 60-Lichtmikroskop (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einer angeschlossenen Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc; Carl Zeiss Jena GmbH). Für die semiquantitative Analyse der intralobulären Nekrose, zytoplasmatischen Scholligkeit und Vakuolisie-

ung wurde folgende Einteilung angewendet: >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte).

Als immunhistochemische Färbungen wurden zum einen die PCNA-Färbung (Proliferating cell nuclear antigen), die die proliferative Aktivität der Hepatozyten anzeigt, angefertigt und zum anderen die Caspase-3-Färbung durchgeführt, die apoptotische Zellen färbt. Die PCNA- und Caspase-3-Färbungen wurden mit Hilfe der indirekten Immunperoxidasetechnik durchgeführt. Hierfür wurden die entparaffinierten Schnitte zunächst mit dreiprozentigem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren, und anschließend mit zweiprozentigem Ziegennormalserum inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Als primäre Antikörper wurden ein monoklonaler Maus-anti-pan-PCNA-Antikörper (PC10; 1:50; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und ein polyklonaler Kaninchen-anti-Maus-cleaved-Caspase-3-Antikörper (Asp175; 1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Der cleaved Caspase-3-Antikörper weist endogene Bruchstücke nach, jedoch nur kurze Fragmente (17/19 kDa) von aktivierter Caspase-3 und nicht die vollständige Länge der Caspase-3. Als sekundärer Antikörper wurde für die Färbung der Streptavidin-Biotin-Komplex-Peroxidase ein biotinkoppler Ziegen-anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet (1:200, LSAB 2 System HRP, Dako Deutschland GmbH). 3,3' Diaminobenzidin (Dako Deutschland GmbH) wurde als Chromogen verwendet. Die Schnitte wurden mit Hemalaun nach Mayer gegengefärbt und mit dem Lichtmikroskop untersucht. Die Einteilung für die semiquantitative Analyse der hepatozellulären Proliferation und Apoptose war >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte).

Als negative Kontrolle wurden Schnitte von jeder Spezies einem geeigneten IgG-Isotyp-Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) als primärem Antikörper unter den gleichen Bedingungen ausgesetzt, um die Spezifität der Antikörperbindung zu bestimmen. Alle Kontrollfärbungen wurden als negativ bewertet.

### 2.5.3 Western Blot

Aus den Proben 2 wurde eine 1mm x 5mm große Probe entnommen und in einem Aluminium-Röhrchen (hergestellt aus: Alu-Folie, Stärke 0,03mm = 30µm, Carl Roth GmbH & Co. KG) ohne Fixiermedium zunächst in Flüssigstickstoff bei -168°C schockgefroren und dann bei -80°C in einem Gefrierschrank (Ultima II, Revco, Kendro Laboratory Products) gelagert. Diese kryokonservierten Leberproben wurden mit einem Low Salt-Lysepuffer, bestehend aus 10mM TRIS, pH 7,5, 10mM NaCl, 0,1mM EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid), 0,5% Triton X 100, 0,02%

NaN<sub>3</sub>, unter Zusatz eines Proteinaseinhibitorcocktails (1:50; Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und PSMF (1:100; Phenylmethylsulfonylfluorid, Carl Roth GmbH & Co. KG) mit Hilfe eines Hochleistungsdispersiergerätes (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik der IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Das Homogenisat wurde daraufhin für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 4°C mit 16000 Umdrehungen pro Minute für 30 Minuten zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, Deutschland). Der Überstand wurde als Gesamtzellextrakt abpipettiert. Die auf diese Weise gewonnenen Aliquots wurden auf Eis gelagert und unverzüglich zur Proteinbestimmung verwendet. Die Konzentration der Proteinextrakte wurde spektrophotometrisch mit der Methode nach Lowry (vgl. *Lowry OH et al.* [1951], pp 265-275) 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-Aldrich Chemie GmbH) für 5 Minuten in kochendem Wasserbad denaturiert, und anschließend in einer Konzentration von 60µg/Bande in die Geltaschen transferiert. (vgl. *Schreiber E et al.* [1989], p 6419)

Die Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 10%; Sodium Dodecylsulfate) elektrophoretisch bei einer konstanten Spannung von 100V im Sammelgel (15 Minuten) und von 140V im Trenngel (1 Stunde) nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Als Molekulargewichtsstandard diente der Rainbow highrange Marker (Amersham Biosciences, Piscataway, USA). Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in einem Transferpufferbad für das anschließende Membran-Blotting equilibriert. Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden anschließend während einer Dauer von zwei Stunden in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bei einer angelegten Spannung von 50V auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2µm; Polyvinylidenfluorid, Bio-Rad Laboratories) transferiert. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Membranen mit einer fünfprozentigen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry Milk; Bio-Rad Laboratories) in TBS-T (Tris Buffered Saline mit Tween 20) für 30 Minuten inkubiert. Nach Waschen mit TBS-T wurden die Primärantikörper für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem entsprechenden IgG-Peroxidase-markierten Sekundärantikörper für 90 Minuten. Im Anschluss wurden die Membranen fünfmal mit TBS-T gewaschen und nachfolgend der Chemilumineszenzmethode (ECL, Amersham Biosciences) unterzogen. Dazu wurden die Membranen nach einminütiger Inkubation mit dem ECL-Reagenz

in Autoklavierfolie verpackt und zur Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) 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 Proteinbeladung und des -transfers wurde ein monoklonaler  $\beta$ -Aktin-Antikörper als interner Standard eingesetzt. In sämtlichen Western Blot-Analysen wurde die densitometrisch ermittelte Dichte rechnerisch auf gleiche  $\beta$ -Aktin-Konzentrationen korrigiert. Die Analyse der Röntgenfilme erfolgte mit einem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc, Amersham Biosciences) und einem Quantifizierungsprogramm (Quantity One - Geldoc, Amersham Biosciences). (vgl. *Slotta JE* [2006], S 47-48)

Primär-antikörper	Ursprung	Verdünnung	Bezugsquelle	Sekundär-antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
$\beta$ -Aktin	mouse	1:5000	Sigma-Alderich Chemie GmbH	sheep-anti-mouse-IgG-Peroxidase	1:5000	Amersham Biosciences
iNOS	rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland	donkey-anti-rabbit-IgG-Peroxidase	1:5000	Amersham Biosciences
eNOS	Rabbit	1:350	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland	donkey-anti-rabbit-IgG-Peroxidase	1:5000	Amersham Biosciences
VEGF	rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	donkey-anti-rabbit-IgG-Peroxidase	1:5000	Amersham Biosciences
HGF	goat	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	rabbit-anti-goat-IgG-Peroxidase	1:2000	Dako Deutschland GmbH
TGF- $\alpha$	rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	donkey-anti-rabbit-IgG-Peroxidase	1:5000	Amersham Biosciences

Tab. 2.6: Western Blot-Primär- und Sekundärantikörper (eNOS : endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, iNOS : induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase)

## 2.6 Datenerfassung und Statistik

Direkt zu erhebende Daten wie das KG wurden bereits während der OP in ein Protokoll eingetragen. Die IVM-Untersuchungen wurden auf Videobänder aufgenommen und zu einem späteren Zeitpunkt offline durch eine „Bild-zu-Bild“-Auswertung und -Analyse mit Hilfe eines computerunterstützten Bildanalyse-systems (CapImage, Version 6.02) ausgewertet (vgl. z.B. *Zysk SP et al.* [2003], S 307).

Die Datenerfassung erfolgte während der Analyse der Videobänder auf Erhebungsbögen. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung kamen die Pro-

gramme SigmaStat und SigmaPlot (Jandel Coporation, San Rafael, California, USA) zur Anwendung. (vgl. *Richter S* [1998], S 26)

Alle Werte werden als Mittelwert  $\pm$  mittlere Standardabweichung (SEM) angegeben. Nach dem Test der Normalität- und Homogenitäts-Hypothese der Varianz der Gruppen wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mit einer one-way Analyse der Varianz (ANOVA) gefolgt von einem post-hoc Test (Dunnett's or Dunn's test) berechnet. Der post-hoc Test beinhaltet eine Korrektur des  $\alpha$ -Fehlers, um die verschiedenen Vergleiche zu kompensieren. Für wiederholte Messungen wurden die Unterschiede mit einer one-way Analyse der Varianz für wiederholte Messungen (RM ANOVA) gefolgt von einem geeigneten post-hoc Test (Dunnett's test) berechnet. Die statistische Signifikanz wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf den ligierten Leberlappen

Die PBL hat den allgemeinen Zustand der Versuchstiere nicht beeinflusst. Alle Versuchstiere erholten sich postoperativ ohne Zwischenfälle. Dennoch zeigten die Versuchstiere drei Tage nach PBL ein signifikant reduziertes Körpergewicht ( $16,6 \pm 0,6\text{g}$ ;  $p < 0,05$ ) gegenüber den präoperativen Werten ( $19,1 \pm 0,5\text{g}$ ) und der sham-operierten Kontrollgruppe ( $19,5 \pm 0,5\text{g}$ ). Interessanterweise erholte sich das Körpergewicht im weiteren Zeitverlauf auf Werte von  $20,1 \pm 0,8\text{g}$  nach sieben Tagen und  $19,3 \pm 0,4\text{g}$  nach 14 Tagen, welche sich nicht signifikant von den präoperativen Messungen unterscheiden ( $20,1 \pm 0,6\text{g}$  und  $19,9 \pm 0,6\text{g}$ ).

#### 3.1.1 Makrohämodynamikanalyse mittels LDF

Analysen des linkshilären Blutflusses durch die LDF zeigten, dass PBL eine signifikante Reduktion auf ~50% an Tag drei, verglichen mit den präoperativen Baseline-Messungen, bewirkte (vgl. Abbildung 3.1). Dennoch war an Tag 14 die Perfusion des linken Leberhilus mit Flussraten ( $86,6 \pm 14,7\%$ ), die sich nicht signifikant von den Messungen vor PBL und von den Messungen der sham-operierten Kontrollgruppe unterschieden, vollkommen normalisiert (vgl. Abbildung 3.1).

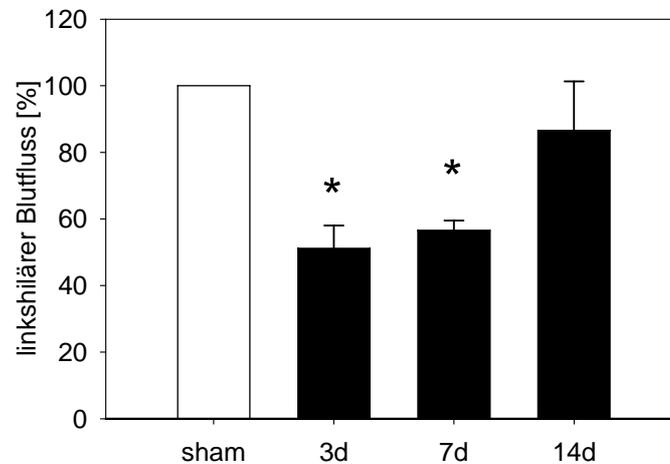


Abb. 3.1: Linkshilärer Blutfluss

Gemessen durch LDF, der den LL und LM versorgt, in sham-operierter Kontrollgruppe (sham) wie auch an den Tagen drei, sieben und 14 nach PBL. Die Werte sind in Prozent des initialen linkshilären Blutflusses vor PBL angegeben. Der linkshiläre Blutfluss zeigt an Tag drei und sieben einen Rückgang, aber an Tag 14 eine Erholung Richtung Normalniveau. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham.

Zusätzlich wurden differenzierte LDF-Analysen des arteriellen und portalvenösen linkshepatischen Blutflusses durchgeführt, um die Einflüsse einer HABR zu untersuchen. Diese Messungen zeigten unter Baseline-Bedingungen einen portalvenösen Blutfluss von  $447,7 \pm 13,9$  aU und einen arteriellen hepatischen Fluss von  $200,8 \pm 11,1$  aU. 30 Minuten nach PBL ist der portalvenöse Blutfluss null, wohingegen Messungen des arteriellen hepatischen Flusses signifikant erhöhte Werte zeigten. Nach 14 Tagen ist der arterielle hepatische Blutfluss mit Werten von  $581,3 \pm 11,6$  aU annähernd genauso hoch wie der gesamte Blutfluss von Leberarterie und Pfortader zu Baseline-Bedingungen. Dies weist deutlich auf eine HABR hin (vgl. Abbildung 3.2).

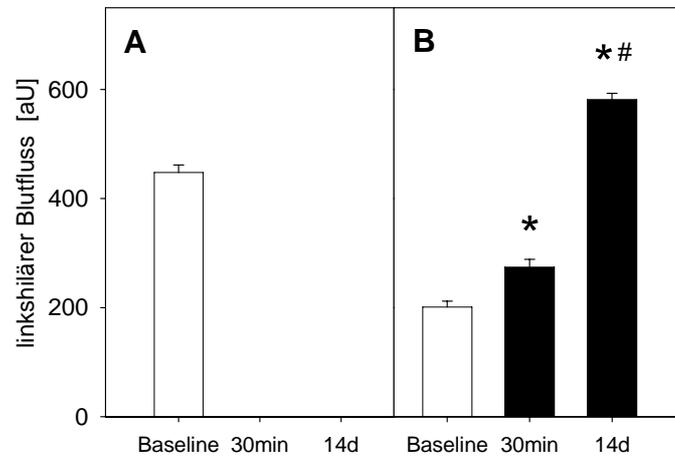


Abb. 3.2: Messungen des portalvenösen (A) und arteriellen (B) linkshepatischen Blutflusses  
Gemessen mittels LDF sowohl zur Baseline als auch 30 Minuten und 14 Tage nach PBL. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. Baseline; # $p < 0,05$  vs. 30 Minuten.

Ferner war auffällig, dass nach der PBL eine deutliche Blaufärbung des LM, aber vor allem des LL zu erkennen war (vgl. Abbildung 3.3).

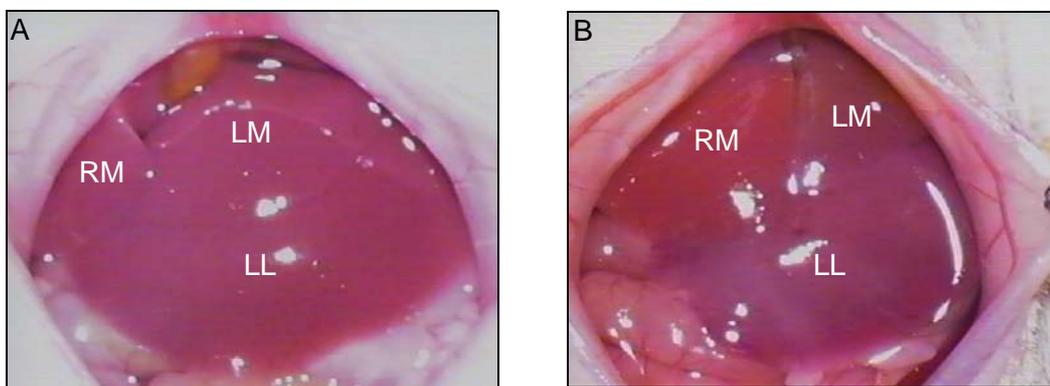


Abb. 3.3: Färbung der Leberlappen (A: vor PBL, B: nach PBL; OP-Mikroskop 16x)

### 3.1.2 Mikrozirkulationsanalyse mittels IVM

Die Analyse der **NADH-Autofluoreszenz** als Indikator des mitochondrialen Redoxstatus zeigte einen signifikanten Anstieg innerhalb der ersten 60 Minuten nach PBL, was eine Verschlechterung der Gewebeoxygenierung bedeutet (vgl. Abbildung 3.4). Interessanterweise zeigte sich von Tag drei bis Tag 14 ein wiederhergestelltes Niveau verglichen mit der Baseline-Gruppe (vgl. Abbildung 3.4). Dies entspricht einer normalen Gewebeoxygenierung während des weiteren Zeitverlaufs nach PBL.

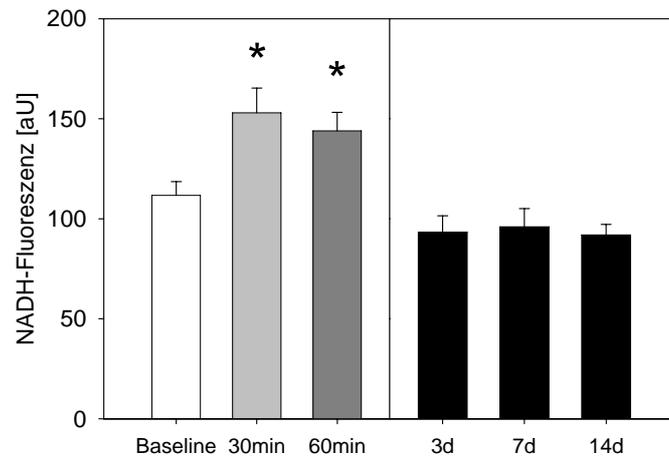


Abb. 3.4: Quantitative Analyse der NADH-Fluoreszenz des hepatischen parenchymalen Gewebes als Indikator für den mitochondrialen Redoxstatus  
Die densitometrische Grauwertbestimmung zeigt eine verschlechterte Oxygenierung (ansteigende NADH-Werte) des LL direkt nach PBL verglichen mit der Baseline-Gruppe. Interessanterweise erholt sich während des Remodellings über den vierzehntägigen Untersuchungszeitraum der mitochondriale Redoxstatus, was sich in der Normalisierung der Gewebeoxygenierung zeigt. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. Baseline.

In der Intravitalfluoreszenzmikroskopie mit dem Kontrastmittel **Natrium-Fluoreszein** zeigte sich die Leber der Baseline-Gruppe vor PBL mit einer regulären mikrovaskulären Architektur und einer fast 100%-igen sinusoidalen Perfusion (vgl. Abbildungen 3.5 und 3.6). Die PBL führte zu einem signifikanten Ausfall von 80% der perfundierten Sinusoide innerhalb der ersten 30 Minuten nach Ligatur, was sowohl ein Perfusionsversagen von einzelnen Sinusoiden als auch von gesamten sinusoidalen Netzwerken innerhalb der lobulären Strukturen einschloss (vgl. Abbildungen 3.5 und 3.6). Diese reduzierte funktionelle sinusoidale Dichte erreichte in den folgenden 14 Tagen des Untersuchungszeitraumes keine Normalwerte (vgl. Abbildung 3.5C). Detaillierte Analysen zeigten jedoch, dass innerhalb des zweiwöchigen Zeitintervalls nach PBL ein Remodelling des LL verbunden mit einer allgemeinen Ausdünnung der absoluten Anzahl der Sinusoide (vgl. Abbildung 3.6C) stattfand. Obwohl die funktionelle sinusoidale Dichte auf 50% reduziert blieb (vgl. Abbildung 3.5C), näherte sich der Anteil von perfundierten Sinusoiden Werten von bis zu 80% an (vgl. Abbildung 3.6D).

Der initiale Rückgang der sinusoidalen Perfusion nach PBL war mit einer Akkumulation von Natrium-Fluoreszein innerhalb der periportalen Region der Azini assoziiert (vgl. Abbildung 3.5B), was einer reduzierten hepatozellulären Clearancefunktion entspricht. Interessanterweise lässt sich eine Akkumulation von Natrium-Fluoreszein

als Indikator für eine hepatozelluläre Dysfunktion innerhalb des späteren vierzehntägigen Untersuchungszeitraums nicht mehr nachweisen (vgl. Abbildung 3.6B).

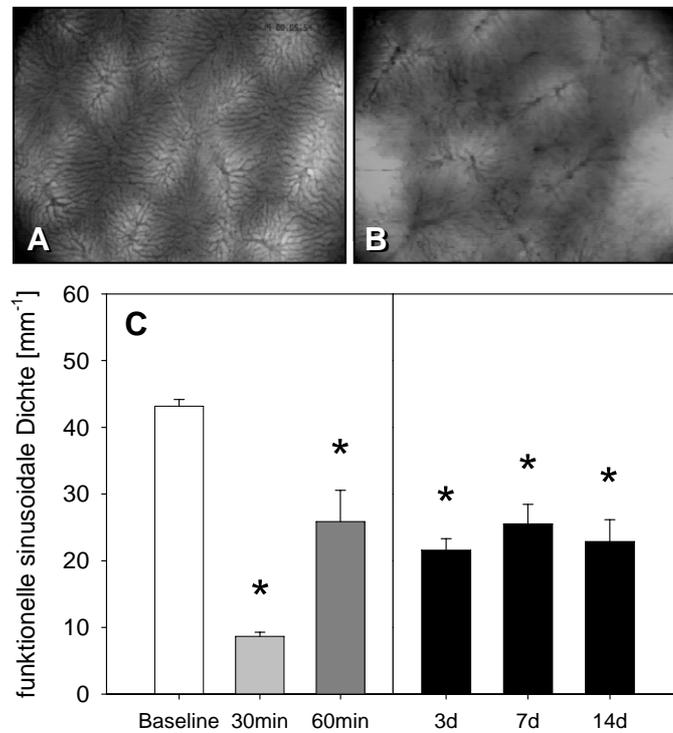


Abb. 3.5: Intravitalfluoreszenzmikroskopie der Unterseite des LL vor (A) und 30 Minuten nach PBL (B)

Zu beachten sind die homogene Anordnung der hepatischen Lobuli und die sinusoidalen Netzwerke innerhalb der jeweiligen hepatischen Lobuli unter Baseline-Bedingungen (A). 30 Minuten nach PBL (B) erscheint das sinusoidale Mikrogefäßnetzwerk durch ein Perfusionsversagen sowohl der einzelnen Sinusoide als auch ganzer sinusoidaler Netzwerke innerhalb der lobulären Struktur inhomogen. Zu beachten ist die Akkumulation von Natrium-Fluoreszein innerhalb der periportalen Regionen, die durch die reduzierte hepatozelluläre Clearancefunktion bedingt ist. Darstellung C zeigt die quantitative Analyse der funktionellen sinusoidalen Dichte, die durch die Anzahl der perfundierten Sinusoide innerhalb der mid-zonalen Region sowohl vor (Baseline) als auch 30 und 60 Minuten, drei, sieben und 14 Tage nach PBL gemessen wurde. PBL verursacht eine massive Reduktion der funktionellen sinusoidalen Dichte nach 30 Minuten, die sich nicht zum Normalniveau innerhalb der vierzehntägigen Untersuchungsperiode erholt. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. Baseline. Vergrößerung (A, B)  $\times 40$ .

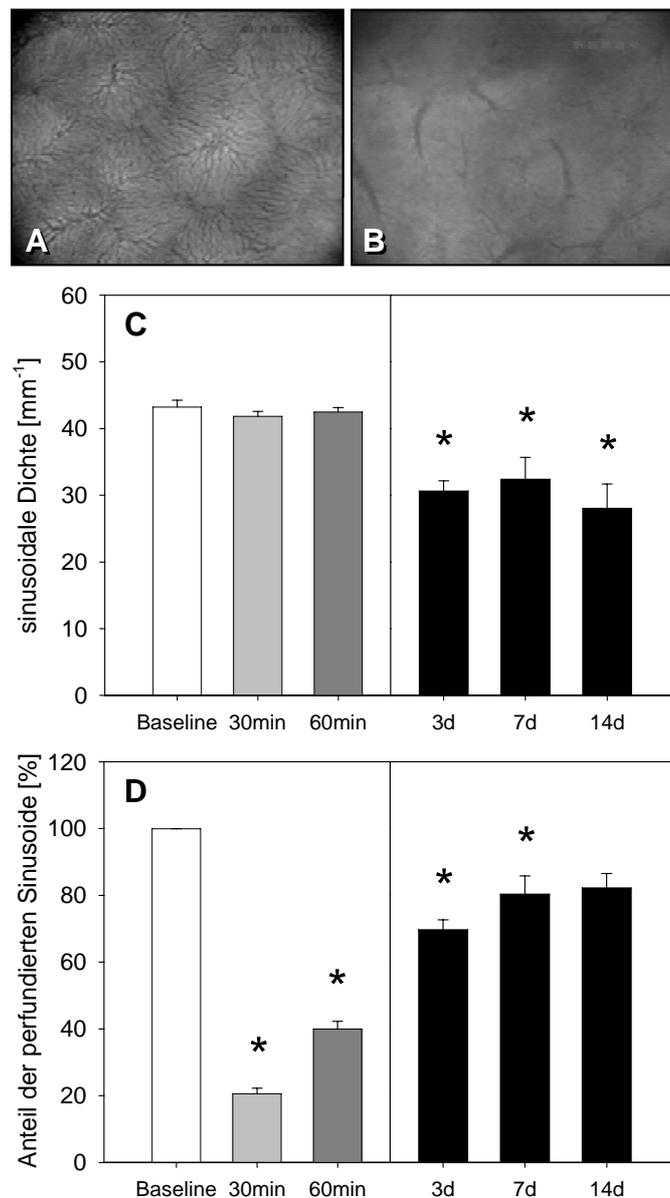


Abb. 3.6: Intravitalfluoreszenzmikroskopie der Unterseite des LL vor (A) und 14 Tage nach PBL (B)

Zu beachten ist die Restauration der sinusoidalen Netzwerke an Tag 14, die jedoch mit einer reduzierten sinusoidalen Dichte verbunden ist. Interessanterweise kann eine Akkumulation von Natrium-Fluoreszein als Indikator einer hepatozellulären Dysfunktion nicht mehr nachgewiesen werden. Darstellungen C und D zeigen die quantitative Analyse der Dichte der sinusoidalen Netzwerke (sowohl perfundierte als auch nichtperfundierte Gefäße eingeschlossen; C) und des Anteils von perfundierten Sinusoiden (angegeben als prozentualer Anteil von allen sichtbaren Gefäßen; D) sowohl vor (Baseline) als auch 30 und 60 Minuten, drei, sieben und 14 Tage nach PBL. Unter Baseline-Bedingungen sind fast alle sichtbaren Gefäße perfundiert. Im Gegensatz dazu führt PBL zu einer initialen Reduktion des Anteils der perfundierten Sinusoide auf 20% (D). Während der folgenden 14 Tage nach PBL kommt es zu einem Remodelling des LL, was mit einer Ausdünnung der Anzahl der Sinusoide (C) verbunden ist. Diese führen jedoch nur bis zu ~80% des Blutflusses. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. Baseline. Vergrößerung (A, B)  $\times 40$ .

Da die Angiogenese normalerweise mit einer Vasodilatation verbunden ist, wurde der sinusoidale Durchmesser vor und nach PBL analysiert. Innerhalb der ersten 60 Minuten nach PBL war der sinusoidale Durchmesser nicht verändert. Im weiteren Zeitverlauf induzierte PBL eine signifikante ( $p < 0,05$ ) sinusoidale Dilatation, die am Ende des vierzehntägigen Untersuchungszeitraums am deutlichsten war (vgl. Abbildung 3.7).

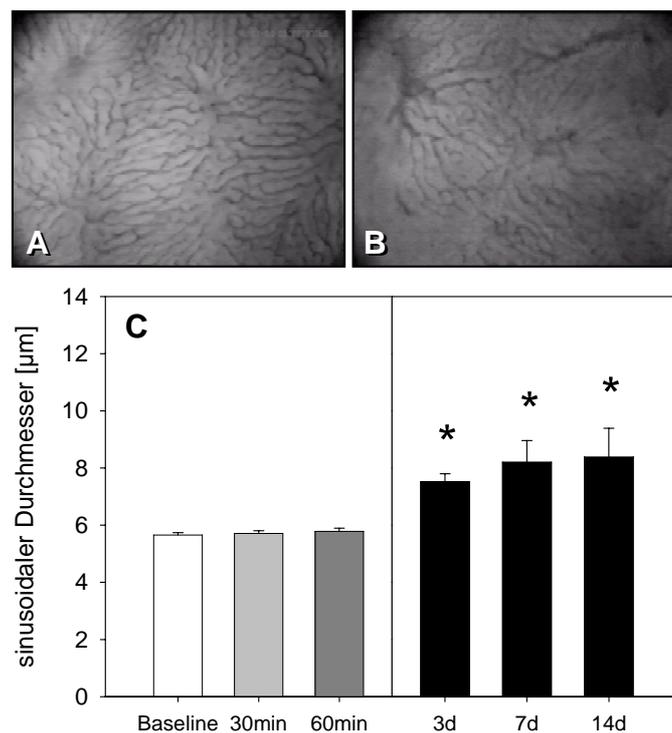


Abb. 3.7: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Analyse des sinusoidalen Durchmessers innerhalb der midzonalen Region des LL zur Baseline (A) und 14 Tage nach PBL (B)

Zu beachten ist die sinusoidale Dilatation nach PBL (B). Die quantitative Analyse des sinusoidalen Durchmessers zeigt eine Dilatation des sinusoidalen Lumens an Tag drei, sieben und 14 nach PBL (C). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. Baseline. Vergrößerung (A, B)  $\times 80$ .

Die intravitalmikroskopischen Analysen der inflammatorischen leukozytären Adhärenz an der sinusoidalen Gefäßwand mittels **Rhodamin 6G** zeigten schon innerhalb der ersten 60 Minuten nach PBL einen signifikanten Anstieg der Anzahl an adhären-ten Zellen (vgl. Abbildung 3.8). Dies zeigte sich am deutlichsten an Tag drei und blieb bis Tag 14 nach PBL signifikant erhöht (vgl. Abbildung 3.8).

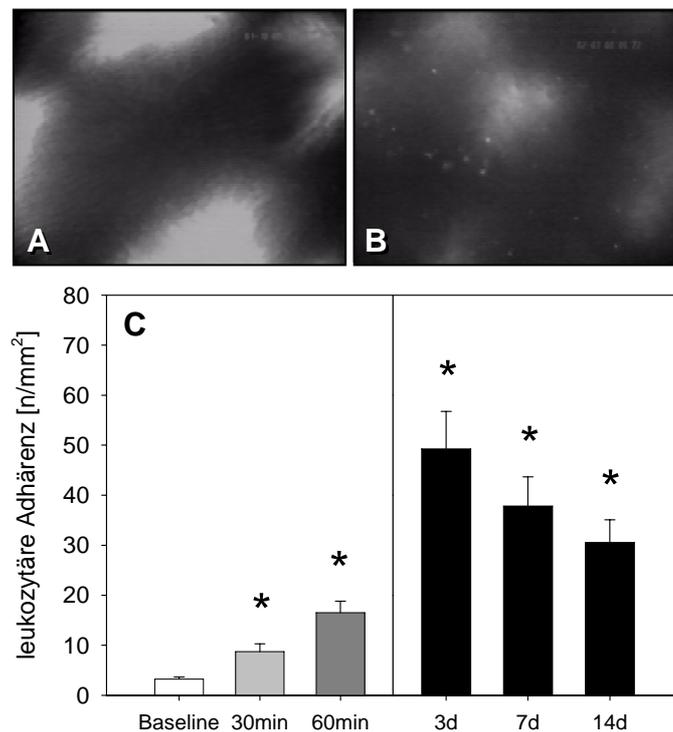


Abb. 3.8: Intravitalmikroskopische Analyse der sinusoidalen leukozytären Adhärenz zur Baseline (A) und drei Tage nach PBL (B). Zu beachten ist die massive Zunahme der Zahl von adhärenenten Leukozyten nach PBL (B). Abbildung C zeigt die quantitative Analyse der leukozytären Adhärenz, gemessen als Zellanzahl pro  $\text{mm}^2$  mikroskopischen Felds, vor (Baseline) als auch 30 und 60 Minuten, drei, sieben und 14 Tage nach PBL. Die PBL induziert eine signifikante leukozytäre Adhärenz schon innerhalb der ersten 60 Minuten, die jedoch an Tag drei am deutlichsten und an Tag 14 immer noch signifikant erhöht ist. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. Baseline. Vergrößerung (A, B)  $\times 80$ .

Die quantitative Analyse des apoptotischen Zelltods wurde mit Hilfe der Intravitalmikroskopie mit **Bisbenzimid** an Hand von nukleärer Kondensation untersucht und zeigte, dass die PBL signifikant eine hepatozelluläre Apoptose induzierte. Im Gegensatz zu nekrotischem Zelltod (siehe unten) zeigte sich interessanterweise der apoptotische Zelltod an Tag sieben und 14 nach PBL am deutlichsten (vgl. Abbildung 3.9).

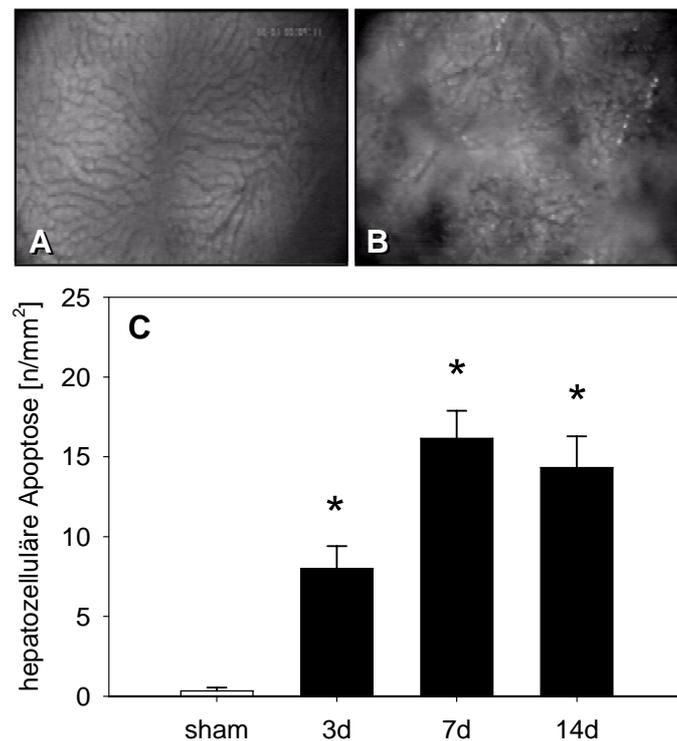


Abb. 3.9: Intravitalmikroskopische Analyse des apoptotischen Zelltods (*in vivo* Bisbenzimid-Färbung) der sham-operierten Kontrollgruppe (A) und der Versuchstiere drei Tage nach PBL (B)

Zu beachten ist der massive Anstieg der Anzahl von apoptotischen Zellen nach PBL (B). Abbildung C zeigt die quantitative Analyse des apoptotischen Zelltods, gemessen als Anzahl von apoptotischen Zellen pro  $\text{mm}^2$  mikroskopischen Felds, in der sham-operierten Kontrollgruppe und in Versuchstieren an Tag drei, sieben und 14 nach PBL. Die PBL induziert einen signifikanten Anstieg des apoptotischen Zelltods, der an Tag sieben und 14 am deutlichsten ist. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B)  $\times 80$ .

Intravitalmikroskopische Untersuchungen der Phagozytoseaktivität der leberständigen Makrophagen (Kupfferzellen) wurde mittels **Latex-Partikel** durchgeführt. Die Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen ergab im gesamten vierzehntägigen Untersuchungszeitraum eine signifikante Erniedrigung der Phagozytoseaktivität der Kupfferzellen (vgl. Abbildung 3.10).

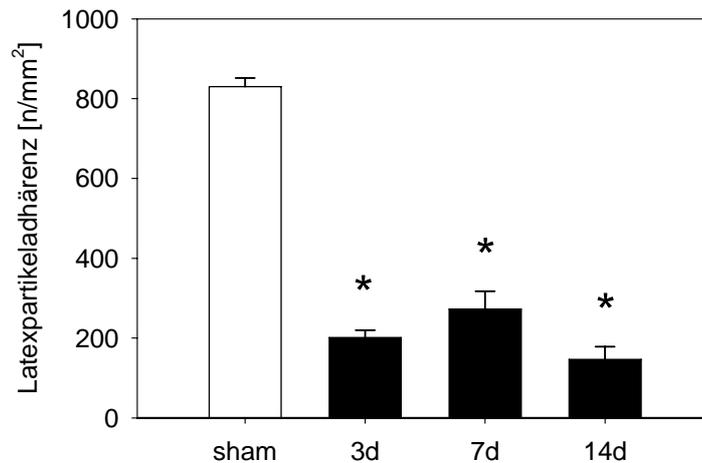


Abb. 3.10: Intravitalmikroskopische Analyse der Kupfferzellaktivität mittels Latexpartikeln  
Zu beachten ist der signifikante Abfall der Anzahl von adhärennten Latexpartikeln an Tag drei, sieben und 14 nach PBL. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham.

### 3.1.3 Laborchemische Untersuchungen

Der Serumspiegel der ASAT-Aktivität als Indikator für einen hepatozellulären Schaden zeigte einen signifikanten Anstieg nach PBL mit Höchstwerten an Tag drei (vgl. Abbildung 3.11). Parallel dazu zeigten ebenfalls die Werte von ALAT und LDH einen Anstieg nach PBL, jedoch konnte ein Höchstwert erst mit einer Verspätung bis Tag sieben dokumentiert werden ( $718,9 \pm 134,6$  U/L und  $2361,8 \pm 389,3$  U/L versus sham-operierter Kontrollgruppe:  $95,3 \pm 10,7$  U/L und  $1116,3 \pm 190,6$  U/L;  $p < 0,05$ ).

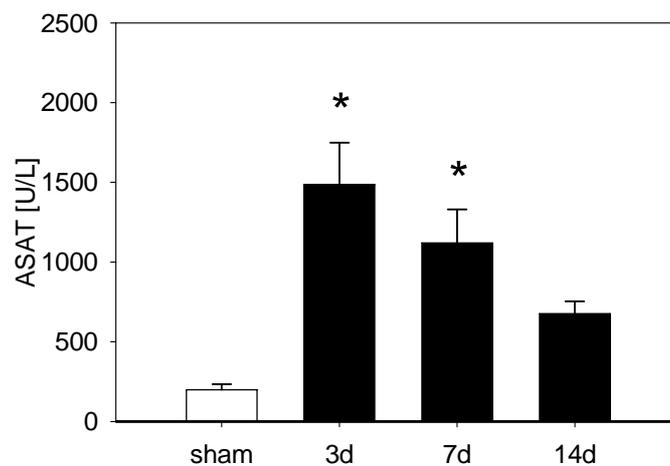


Abb. 3.11: ASAT-Aktivität  
Der Serumspiegel der ASAT-Aktivität als Indikator für hepatozellulären Schaden zeigt einen signifikanten Anstieg nach PBL mit Höchstwerten an Tag drei. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham.

### 3.1.4 Lebergewicht

Das Gesamtlebergewicht stieg nach PBL leicht an mit einem signifikanten Höchstwert an Tag sieben ( $1,01 \pm 0,07\text{g}$ ) im Vergleich zu der sham-operierten Kontrollgruppe ( $0,86 \pm 0,02\text{g}$ ;  $p < 0,05$ ). In Abhängigkeit zu der Reduktion des linkshilären Blutflusses atrophierte der LL rasch nach PBL mit Minimalwerten des Gesamtlebergewichtes von  $15,9 \pm 1,9\%$  an Tag sieben (vgl. Abbildung 3.12B). Interessanterweise stieg das Gewicht des ligierten Leberlappens an Tag 14 nach PBL wieder auf  $22,0 \pm 4,0\%$  an (vgl. Abbildung 3.12B).

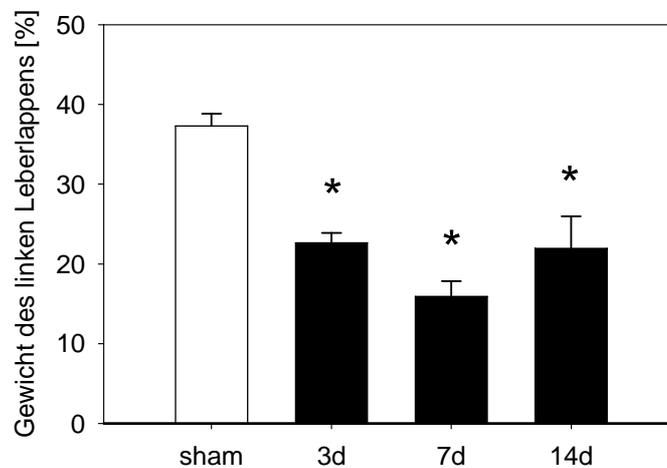


Abb. 3.12: Gewicht des LL

Darstellung des Gewichts des LL, angegeben in Prozent des Gesamtlebergewichts. PBL induziert eine schnelle und signifikante Atrophie des ligierten LL. An Tag 14 konnte jedoch ein Wiederanstieg beobachtet werden. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham.

### 3.1.5 HE-Färbung, Immunhistochemie und Western Blot

Die **HE-gefärbten Schnitte** zeigten eine vermehrte zytoplasmatische Scholligkeit und Vakuolisierung der parenchymatösen Zellen, was an Tag 14 nach PBL am deutlichsten war (vgl. Abbildung 3.13). Interessanterweise war dieser hepatozelluläre Umbau nicht auf die perizentrale Geweberegion begrenzt, sondern zeigte sich homogen in den gesamten Azini (vgl. Abbildung 3.13).

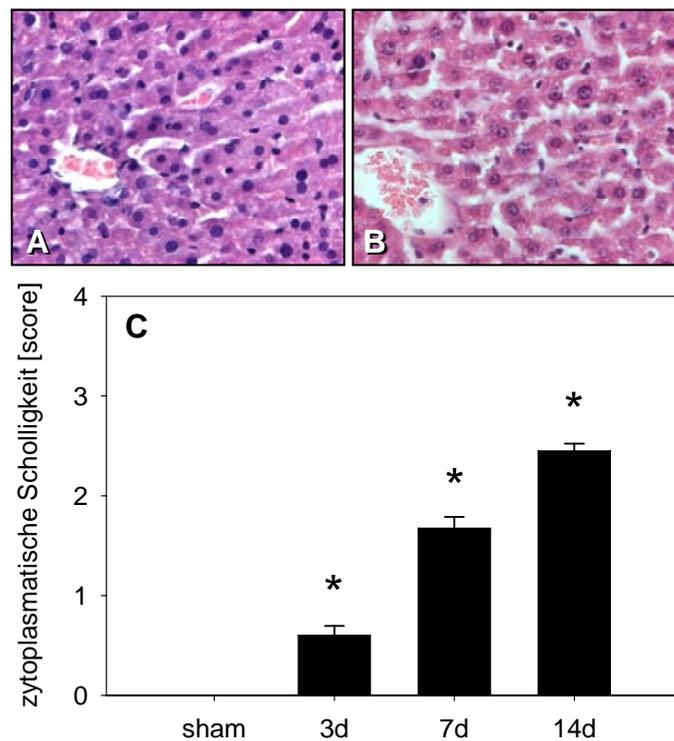


Abb. 3.13: Histologische Analysen (A, B) und semi-quantitative Auswertung (C) der zytoplasmatischen Scholligkeit in Hepatozyten des LL (HE-Färbung)

Während das Lebergewebe der sham-operierten Kontrollgruppe keine Zeichen der zytoplasmatischen Scholligkeit und Vakuolisierung aufweist (A, C), zeigt das Lebergewebe nach PBL eine wachsende Anzahl von diesen intrazellulären Veränderungen bis Tag 14 (B, C). Score: Zellen mit zytoplasmatischer Scholligkeit und Vakuolisierung >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B)  $\times 175$ .

Weiterhin induzierte die PBL ausgeprägte Nekrosen mit deutlicher Karyolyse innerhalb des ligierten LL, die gelegentlich gesamte Azini oder sogar eine Konfluenz mehrerer Azini betraf (vgl. Abbildung 3.14). Dies war verbunden mit einer massiven leukozytären Infiltration innerhalb des Randes der nekrotischen Bereiche an Tag drei sowie einer deutlichen sinusoidalen leukozytären Adhärenz, welche intravital-mikroskopisch analysiert wurde.

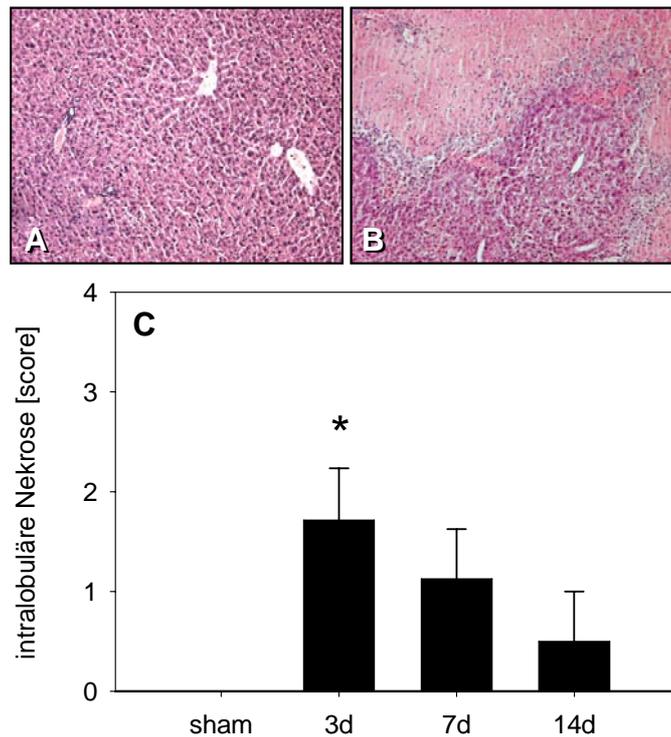


Abb. 3.14: Histomorphologische Charakteristika in HE-Färbung der sham-operierten Versuchstiere (A) und der Versuchstiere an Tag drei nach PBL (B). Die sham-operierte Kontrollgruppe zeigt eine intakte lobuläre Struktur mit unberührtem parenchymatöses Gewebe (A). PBL induziert eine ausgeprägte Nekrose mit einer deutlichen Karyolyse im ligierten LL, die gelegentlich umgebende gesamte Azini oder sogar die Konfluenz von mehreren Azini betrifft (B). Zu beachten ist die massive leukozytäre Infiltration innerhalb des Nekroserandes (B). Die semiquantitative Analyse des Verlaufs der intrazellulären Nekrosen im LL zeigt eine frühe Entwicklung der parenchymatösen Nekrosen nach PBL (C). Score: hepatozelluläre Nekrose >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B) x44.

Die Zellproliferation wurde immunhistochemisch mittels **PCNA-Färbung** untersucht, die eine nur geringe Antwort innerhalb der ersten sieben Tage nach PBL zeigte. Dennoch war an Tag 14 eine deutliche Zunahme der PCNA-gefärbten Zellkerne zu sehen, was eine verspätete proliferative Antwort auf die PBL zeigt (vgl. Abbildung 3.15).

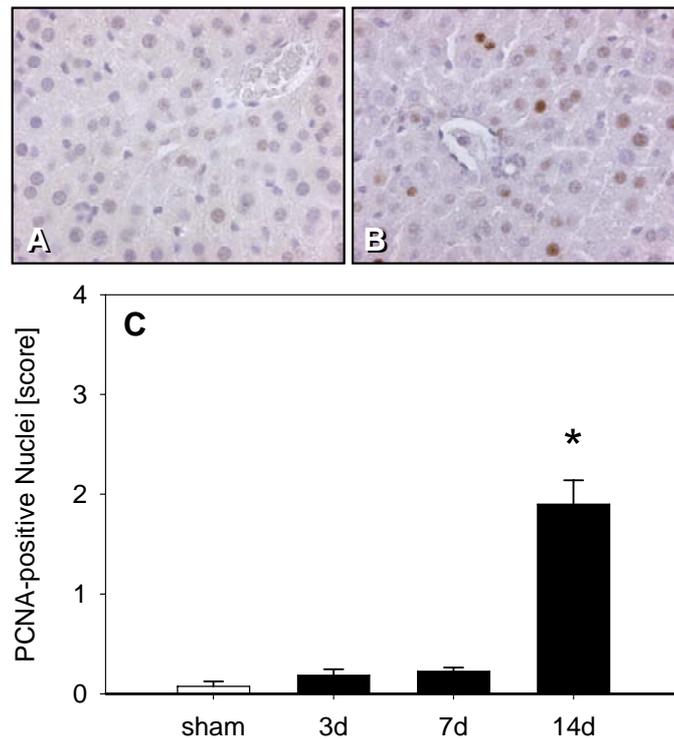


Abb. 3.15: PCNA-Immunohistochemie, als Indikator der zellulären Proliferation, einer sham-operierten Leber (A) im Vergleich zu einer Leber 14 Tage nach PBL (B). Abbildung C zeigt die semiquantitative Analyse der Zellen mit PCNA-positiven Nuklei in der Kontrollgruppe und an Tag drei, sieben und 14 nach PBL. Zu beachten ist der signifikante Anstieg der Anzahl der PCNA-positiven Nuklei an Tag 14 nach PBL (B, C). Score: PCNA-positive Nuklei >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B)  $\times 175$ .

Um die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) bei dem mikrozirkulatorischen Remodelling nach PBL zu untersuchen, wurden die Expression von eNOS und iNOS mittels **Western Blot** untersucht. Diese Analysen zeigten eine eher schwache Expression von eNOS an Tag 0 und einen leichten Expressionsanstieg innerhalb der ersten sieben Tage nach PBL. An Tag 14 jedoch war die eNOS-Expression signifikant erhöht mit Werten, die verglichen mit Tag 0 dreimal höher waren (vgl. Abbildung 3.16). Analysen der iNOS-Expression zeigten an Tag drei und sieben nach PBL einen leichten, aber nicht signifikanten Abfall. An Tag 14 waren die Werte vergleichbar hoch wie an Tag 0 (vgl. Abbildung 3.16).

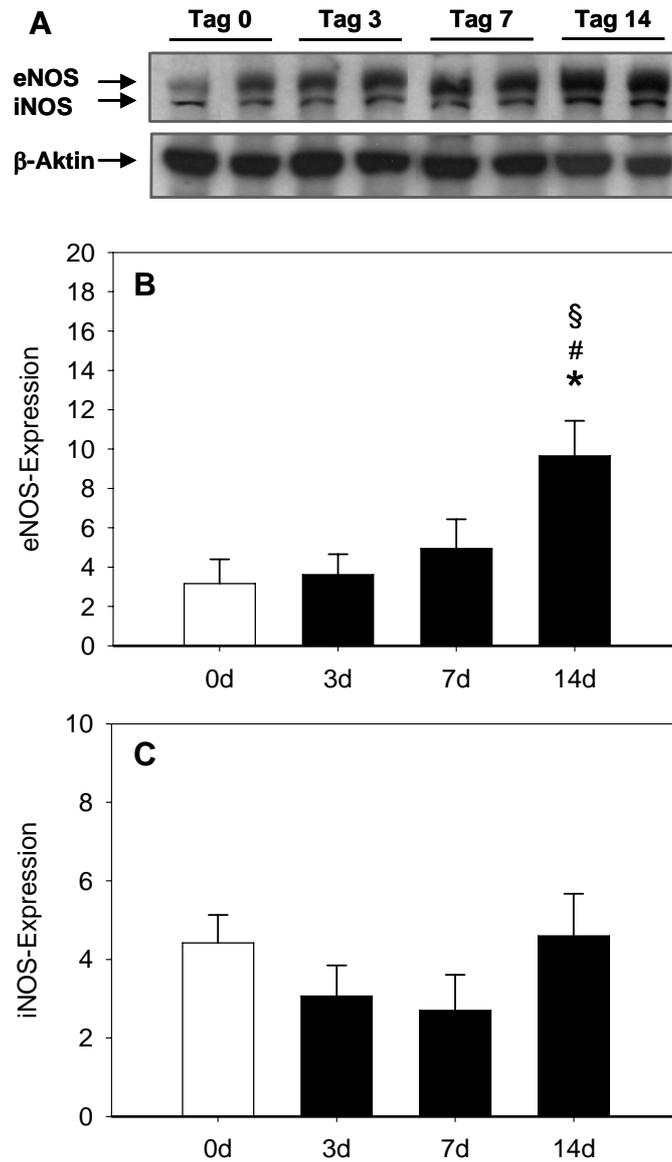


Abb. 3.15: Expression der eNOS und iNOS-Proteine

Western Blot-Analysen von eNOS und iNOS nach PBL (A). Die Untersuchungen zeigen, dass eNOS an Tag 14 signifikant ansteigt mit Werten, die dreimal höher sind als solche, die an Tag 0 gemessen wurden (B). Untersuchungen der iNOS-Expression zeigen, dass die PBL an Tag drei und sieben zu einem leichten, aber nicht signifikanten Abfall der Werte führt. An Tag 14 gleichen sich die Werte an die von Tag 0 an (C). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham; # $p < 0,05$  vs. 3 Tage und § $p < 0,05$  vs. 7 Tage.

### 3.2 Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf das Tumorwachstum

Die TU-Implantation hat den allgemeinen Zustand der Versuchstiere nicht beeinflusst. Alle Versuchstiere erholten sich postoperativ ohne Zwischenfälle.

#### 3.2.1 Makrohämodynamikanalyse mittels LDF

Analysen des linkshilären Blutflusses mittels LDF zeigten zum Zeitpunkt Baseline keinen signifikanten Unterschied der Blutflusswerte. 14 Tage nach PBL zeigte sich jedoch ein signifikant erniedrigter linkshilärer Blutfluss (vgl. Abbildung 3.16).

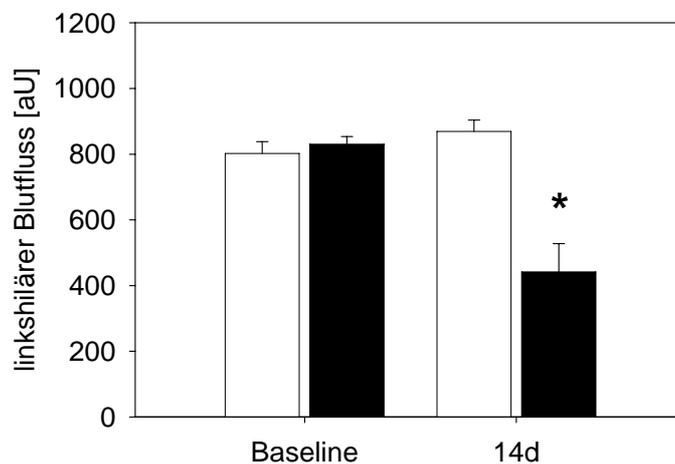


Abb. 3.16: Linkshilärer Blutfluss von Tieren mit (■) und ohne (□) PBL Gemessen durch LDF, der den LL und LM versorgt, zum Zeitpunkt Baseline wie auch an Tag 14 nach TU-Implantation. Der linkshiläre Blutfluss zeigt an Tag 14 einen signifikanten Rückgang. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham.

#### 3.2.2 Mikrozirkulationsanalyse mittels IVM

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie des TU-Randes mit dem Kontrastmittel **Natrium-Fluoreszein** zeigte sowohl nach drei als auch nach sieben Tagen eine signifikante Erniedrigung der abfließenden Venolendichte. Innerhalb der ersten 14d führte der reduzierte Blutfluss ( $442 \pm 86$  vs.  $869 \pm 34$  aU) zu einer verzögerten Entwicklung der Gefäß-/Invasionsfront der Tumoren (keine Gefäßfront an Tag 3 nach PBL), zu einer reduzierten Dichte an TU-Gefäßen ( $29 \pm 5$  vs.  $47 \pm 8$  cm/cm<sup>2</sup>) und einer reduzierten funktionellen Kapillardichte in der normalen Leber ( $25,8 \pm 2,2$  vs.  $39,3 \pm 0,9$  mm<sup>-1</sup>). (vgl. Abbildungen 3.17)

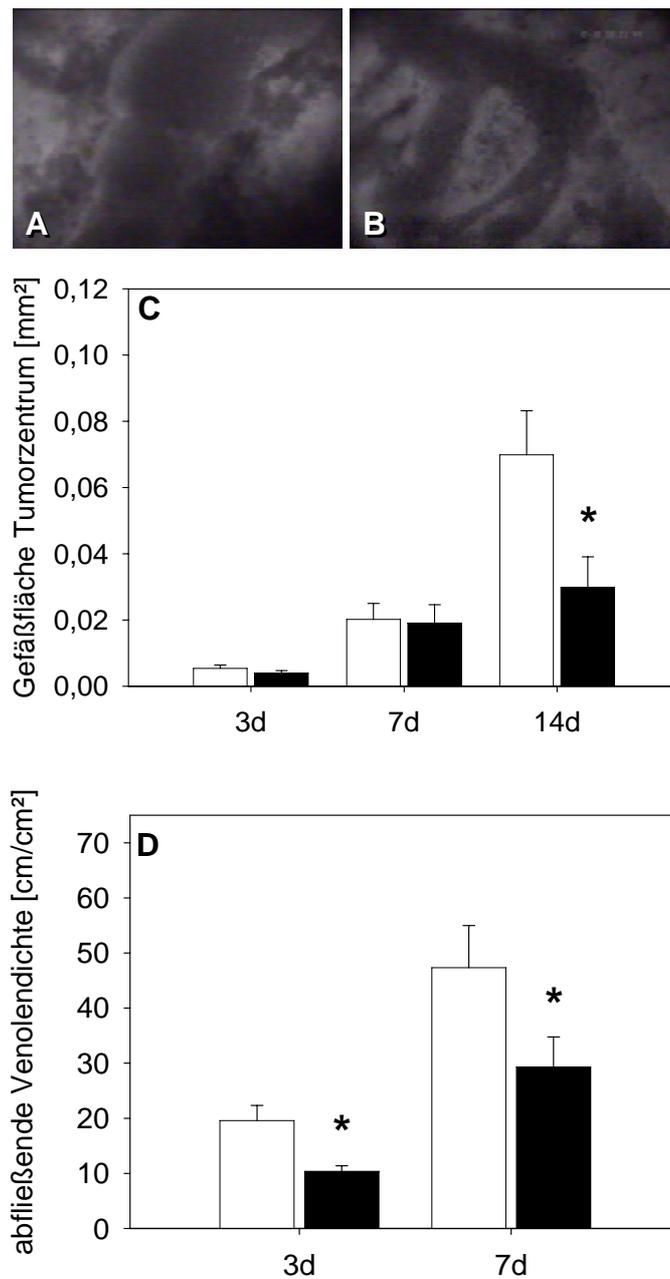


Abb. 3.17: Intravitalfluoreszenzmikroskopie des TU-Zentrums (A, B, C) an Tag drei, sieben und 14 nach TU-Implantation und des TU-Randes (D) an Tag drei und sieben nach TU-Implantation von Tieren mit (■) und ohne (□) PBL. Zu beachten ist nach anfänglich ähnlicher Entwicklung die signifikant erniedrigte Gefäßfläche im TU-Zentrum nach 14 Tagen in der PBL-behandelten Gruppe (B) im Vergleich zu der sham-PBL-Gruppe (A). Die abfließende Venolendichte ist sowohl nach drei als auch sieben Tagen signifikant erniedrigt (D). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B)  $\times 40$ .

Analysen nach intravitraler **Rhodamin 6G**-Injektion zeigten, dass die PBL des Weiteren initial zu einer verstärkten leukozytären Infiltration sowohl im TU als auch in der normalen Leber führte.

### 3.2.3 Tumorzvolumen und Lebergewicht

Innerhalb der ersten 14 Tage kommt es zu einem massiven TU-Wachstum im LL. Durch die PBL wurde das TU-Volumen nach 14d signifikant auf <20% der Kontrolltumoren reduziert. Interessanterweise kommt es im weiteren Zeitverlauf innerhalb von 21 Tagen zu einer Angleichung des TU-Volumens der beiden Gruppen (vgl. Abbildung 3.18). Der prozentuale Anteil des LL am Gesamtlebergewicht ist im gesamten 14-tägigen Untersuchungszeitraum signifikant erniedrigt (vgl. Abbildung 3.18D).

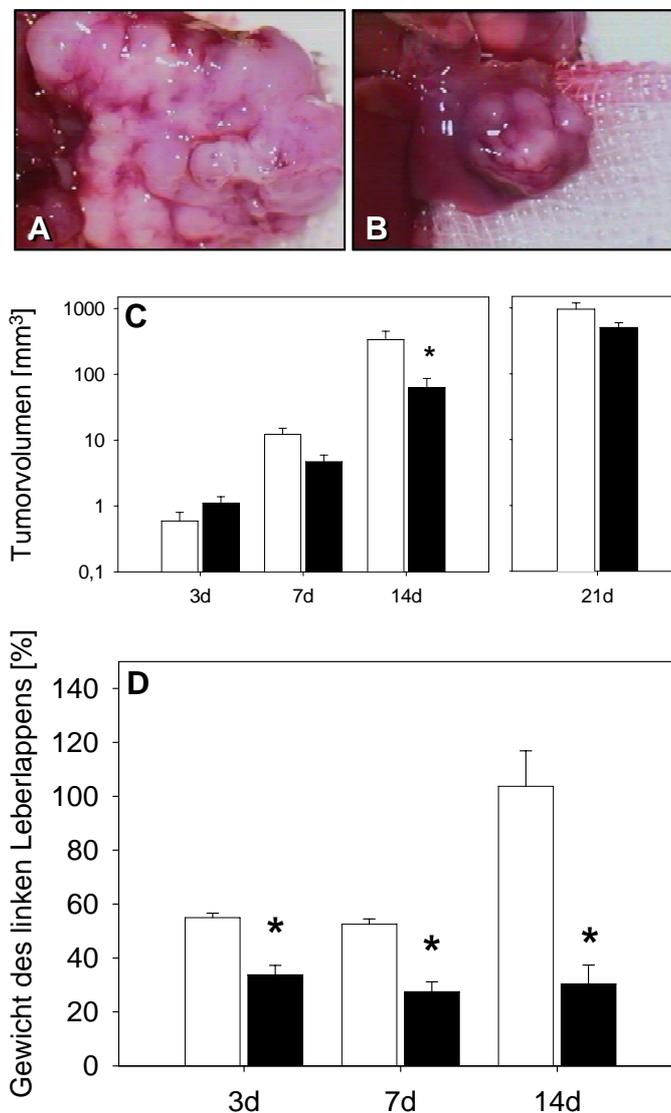


Abb. 3.18: TU-Volumen (A, B, C) und Gewicht des LL von Tieren mit (■) und ohne (□) PBL. Innerhalb von 14 Tagen ist das TU-Volumen der PBL-Gruppe (B) signifikant erniedrigt gegenüber der Kontrollgruppe (A). Nach 21 Tagen ist der Unterschied im TU-Volumen nicht mehr signifikant unterschiedlich (C). Darstellung des Gewichts des LL, angegeben in Prozent des Gesamtlebergewichts (D). PBL induziert eine

schnelle und signifikante Atrophie des ligierten LL im gesamten Untersuchungszeitraum. Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B)  $\times 10$ .

Die Rate an Peritonealkarzinose und Lungenmetastasen wurde durch die PBL nicht beeinflusst.

### 3.2.4 Immunhistochemie und Western Blot

Die immunhistochemischen Analysen der Zellproliferation mittels **PCNA** zeigten im Bereich der Leberzellen innerhalb der ersten sieben Tage nach PBL eine eher geringe Antwort. An Tag 14 jedoch, kam es zu einem Anstieg der Anzahl an PCNA-positiv gefärbten Nuklei, was einer von uns bereits gezeigten verspäteten proliferativen Antwort auf die PBL entspricht (vgl. Abbildung 3.19D). Im Bereich der TU-Zellen zeigte sich nach einer anfänglichen Reduktion nach 14 Tagen eine signifikante Erhöhung (vgl. Abbildung 3.19).

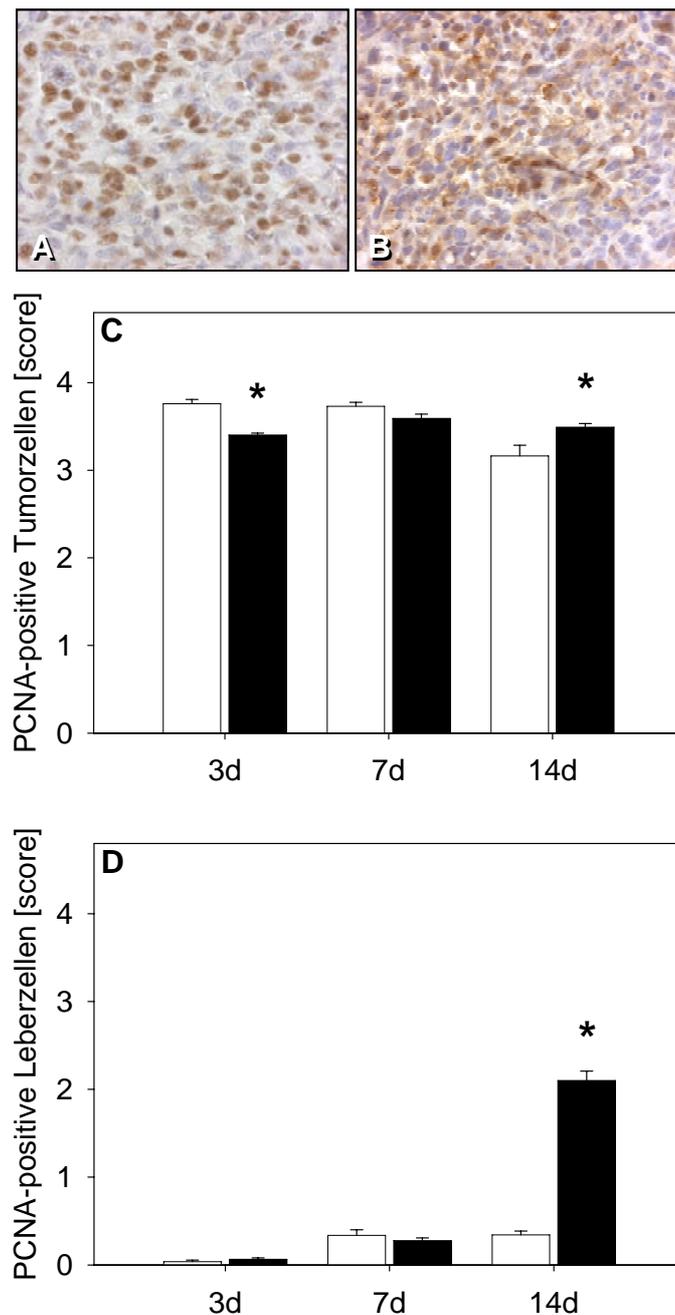


Abb. 3.19: PCNA-Immunohistochemie, als Indikator der zellulären Proliferation, des TU-Zentrums (A, B, C) und der Leberzellen (D) von Tieren mit (■) und ohne (□) PBL. Abbildung C zeigt die semiquantitative Analyse der Zellen mit PCNA-positiven Nuklei im TU-Zentrum an Tag drei, sieben und 14 nach PBL. Nach anfänglicher Reduktion kommt es an Tag 14 zu einem signifikanten Anstieg in der PBL-Gruppe (B) verglichen mit der sham-Gruppe (A). Abbildung D zeigt die semiquantitative Analyse der Zellen mit PCNA-positiven Nuklei im Bereich der normalen Leber mit einem signifikanten Anstieg an Tag 14. Score: PCNA-positiv Nuklei >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B) x175.

Der Nachweis des apoptotischen Zelltods erfolgte immunhistochemisch mittels **Caspase-3-Färbung** und wurde semiquantitativ analysiert. Im Bereich der TU-Zellen ist nach einer anfänglichen Reduktion der Zellen mit Caspase-3-positiven Nuklei an Tag drei und sieben ein signifikanter Anstieg an Tag 14 nach PBL zu beachten (vgl. Abbildung 3.20). Im Bereich der normalen Leber bewirkte die PBL eine im gesamten Untersuchungszeitraum signifikant erhöhte Apoptoserate (vgl. Abbildung 3.21).

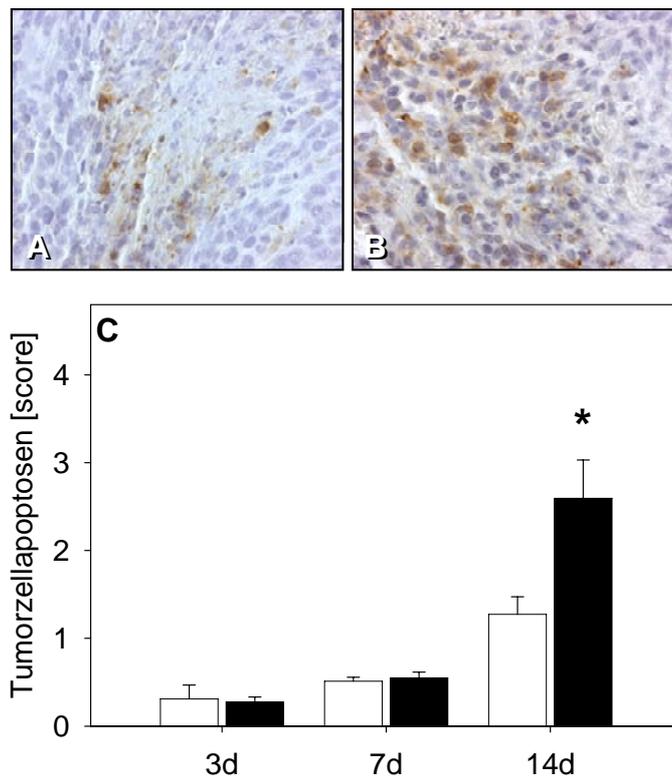


Abb. 3.20: Caspase-3-Immunohistochemie, als Indikator der zellulären Apoptose, des TU-Zentrums von Tieren mit (■) und ohne (□) PBL  
Abbildung C zeigt die semiquantitative Analyse der Zellen mit Caspase-3-positiven Nuklei von TU-Zellen an Tag drei, sieben und 14 nach PBL. Zu beachten nach anfänglicher Reduktion der signifikante Anstieg der Anzahl der Caspase-3-positiven Nuklei an Tag 14 nach PBL (A: sham, B: PBL, C). Score: Caspase-3-positiv Nuklei >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B)  $\times 175$ .

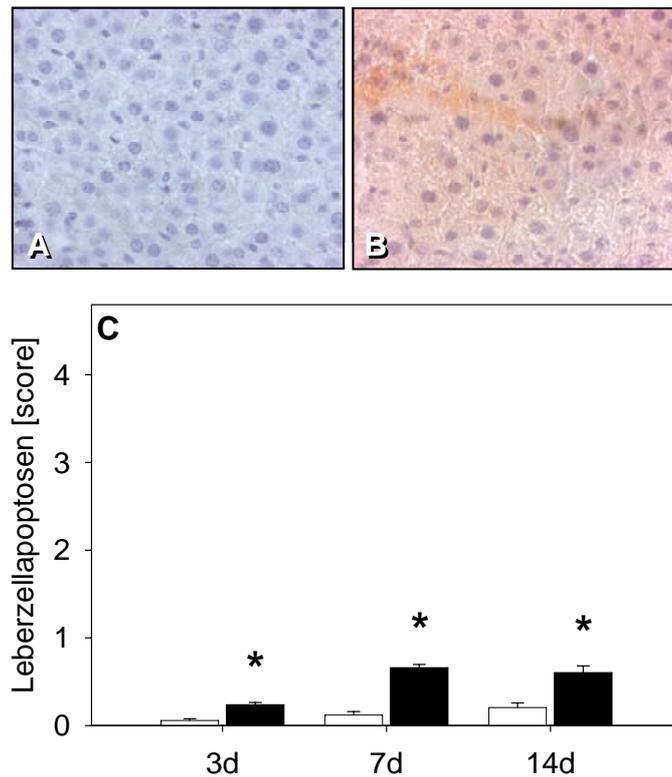


Abb. 3.21: Caspase-3-Immunohistochemie, als Indikator der zelluläre Apoptose, der Leberzellen von Tieren mit (■) und ohne (□) PBL  
Abbildung C zeigt die signifikant erhöhte Apoptoserate im Bereich der normalen Leber im gesamten Untersuchungszeitraum (A: sham, B: PBL, C). Score: Caspase-3-positive Nuklei >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. sham. Vergrößerung (A, B)  $\times 175$ .

Somit bewirkte die PBL nach 14d eine im Vergleich zu den Kontrollen hoch signifikant gesteigerte Apoptose- und Proliferationsrate von sowohl TU-Zellen ( $3,16 \pm 0,12$  vs.  $3,49 \pm 0,04$  Score) als auch Hepatozyten ( $0,34 \pm 0,05$  vs.  $2,10 \pm 0,11$  Score).

Um die Bedeutung von Wachstumsfaktoren bei der Entwicklung des TU-Wachstums nach PBL zu untersuchen, wurden die Expression von VEGF, HGF und TGF- $\alpha$  im an den TU angrenzenden Gewebe mittels **Western Blot** untersucht. Die VEGF-Analysen zeigten innerhalb der ersten sieben Tage eine ähnliche Expressionsstärke in beiden Gruppen. An Tag 14 jedoch ging die signifikante sinusoidale Dilatation im Bereich des TU-Randes mit einer deutlich gesteigerten VEGF-Expression einher (vgl. Abbildung 3.22).

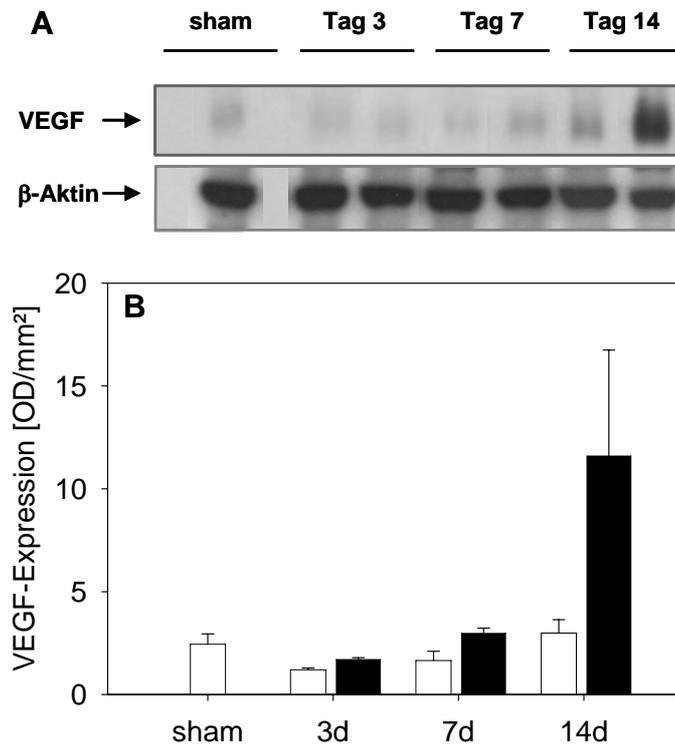


Abb. 3.22: Expression des VEGF-Proteins von Tieren mit (■) und ohne (□) PBL  
Western Blot-Analysen von VEGF nach PBL (A). Die Untersuchungen zeigen,  
dass VEGF an Tag 14 ansteigt (B). Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die Analysen von HGF und TGF- $\alpha$  zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die VEGF-Expression. Nach einer eher geringen Expressionsstärke innerhalb der ersten sieben Tage kommt es an Tag 14 zu einem Anstieg sowohl der HGF- als auch TGF- $\alpha$ -Expression in der PBL-Gruppe (vgl. Abbildung 3.23).

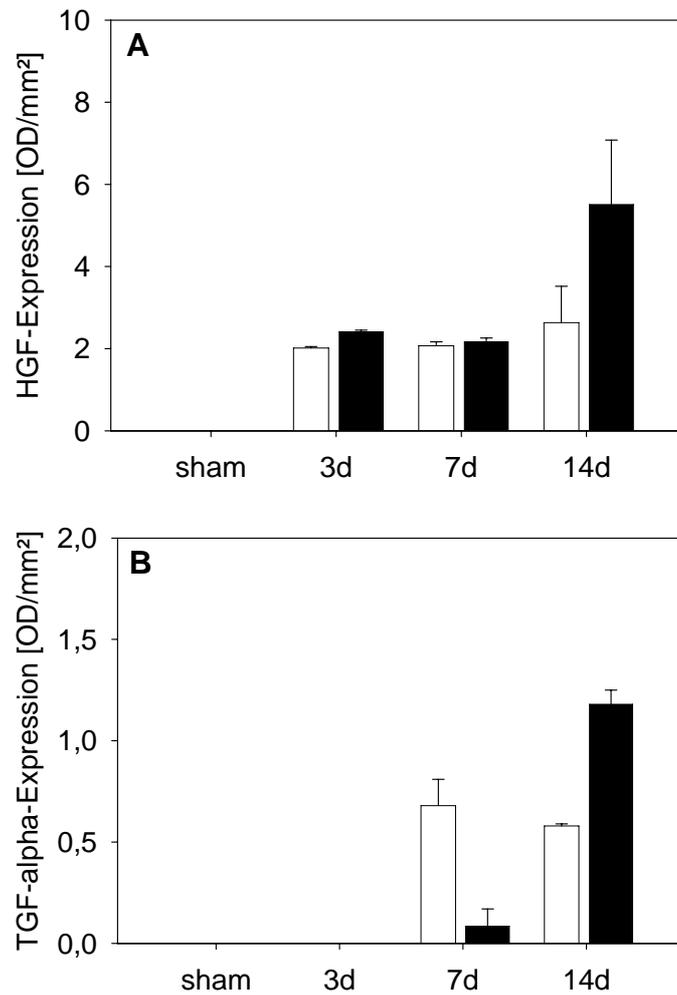


Abb. 3.23: Expression der HGF- und TGF- $\alpha$ -Proteine von Tieren mit (■) und ohne (□) PBL. Western Blot-Analysen von HGF (A) und TGF- $\alpha$  (B). Die Untersuchungen zeigen, dass sowohl HGF als auch TGF- $\alpha$  an Tag 14 ansteigen. Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die gesteigerte Proliferation der TU-Zellen ging somit mit einer gesteigerten Expression von VEGF, HGF und TGF- $\alpha$  im an den TU angrenzenden Gewebe einher. Im Einklang mit diesen Beobachtungen hatten die Tumoren 21 Tage nach PBL im Vergleich zu den Kontrollen zwar noch ein geringeres Tumolvolumen, jedoch nicht mehr signifikant unterschiedlich.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 4.1.1 Diskussion des Modells

Die vorliegende Studie diente zum einen der detaillierten Analyse der mikrohämodynamischen, zellulären und molekularen Auswirkungen der PBL auf den ligierten Leberlappen nach 30 und 60 Minuten sowie nach drei, sieben und 14 Tagen. Zum anderen wurden die Auswirkungen der PBL auf das TU-Wachstum nach drei, sieben, 14 und 21 Tagen untersucht. Die Experimente wurden an spontanatmenden, anästhesierten und laparotomierten Mäusen durchgeführt.

Um Untersuchungen über die Auswirkungen operativer Eingriffe auf die hepatische Mikrozirkulation durchzuführen, stehen grundsätzlich zwei **Modelle** zur Verfügung, nämlich *in vitro*- und *in vivo*-Modelle. Bei *in vitro*-Modellen besteht zum einen die Möglichkeit, die Untersuchungen an isolierten Zellen beziehungsweise Zellkulturen (vgl. Keller GA et al. [1985], pp 87-95; Lemasters JJ et al. [1987], pp 78-81; Oda M et al. [1990], pp 103-128; Babbs CF et al. [1991], pp H123-H129; Mayadas TN et al. [1993], pp 541-554) und zum anderen Untersuchungen an isoliert perfundierten Organen (vgl. Griffen WO et al. [1970], pp 1474-1479; Marotto ME et al. [1988], pp 585-590; Konno H et al. [1992], pp 1211-1214; Lindert KA et al. [1992], pp G345-G350) durchzuführen. Im Gegensatz dazu werden bei *in vivo*-Modellen die Untersuchungen in intakten Organismen (vgl. Menger MD et al. [1991] pp 158-169; Eriksson E, Lisander B [1972], pp 202-210) durchgeführt. Dabei muss die Wahl des Modells problembezogen erfolgen (vgl. Wortha HP, Adams J [1992], S 18-19; Trampisch HJ, Windeler J [2000], S 19-23), also abhängig von den der Studie zugrunde liegenden Fragestellungen und Hypothesen. Studien zur Aufklärung einzelner zellulärer Mechanismen oder Zell-Zell-Interaktionen erlauben durch die Reduktion des Modells auf isolierte Zellen, Zellverbände, Gewebe oder Organe eine eher „deterministische“ Betrachtungsweise (vgl. Wortha HP, Adams J [1992], S 18-19; Richter S [1998], S 62), das heißt die Analyse spezifischer Ursache-Wirkungs-Beziehungen. Der Nachteil solcher *in vitro*-Modelle beziehungsweise *ex vivo*-Modelle liegt jedoch in der mangelhaften Berücksichtigung von typischen Interaktionen innerhalb eines Organismus. So können Interaktionen zwischen den einzelnen Organsystemen, welche durch makro- und mikrozirkulatorische Parameter, neuronale Steuerungsmechanismen, metabolische Faktoren sowie humorale Kaskadensysteme vermittelt werden, nicht berücksichtigt werden (vgl. McCuskey RS [2003], p 1324). Im Gegensatz

dazu berücksichtigen *in vivo*-Modelle, wie das in der vorliegenden Arbeit gewählte, die interferierenden lokalen und systemischen, positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen in der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer oder pathophysiologischer Prozesse (vgl. *Menger MD, Lehr HA* [1993], pp 519-522). (vgl. *Richter S* [1998], S 62; *Slotta JE* [2006], S 66)

Der Nachteil der intravitalmikroskopischen Analyse der Lebermikrozirkulation besteht in der unvermeidlichen Notwendigkeit der **Narkose** des Versuchstieres, um die chirurgische Präparation durchzuführen. Die in diesem Rahmen notwendige Anästhesie erfolgte mittels intraperitonealer Injektion eines Xylazinhydrochlorid-Ketaminhydrochlorid-Gemisches. **Xylazin** ist ein in der Veterinärmedizin sehr weit verbreitetes, antagonistisches Sedativum, Muskelrelaxans und Analgetikum aus der Klasse der Thiazinamine (vgl. *Tacke S* [2003], S 150). Es wirkt als  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist an peripheren postsynaptischen und zentralen post- und präsynaptischen  $\alpha_2$ -Rezeptoren (vgl. *Steidl T, Göbel T* [2005], S 23; *Hellebrekers LJ* [2000], S 77). Nach Injektion wird Xylazin rasch absorbiert und bewirkt eine ausgeprägte Sedation und Hypnose über etwa 30 Minuten (vgl. *García-Villar R et al.* [1981], pp 87-92). Xylazin wird in der Leber metabolisiert und über die Nieren sowie biliär ausgeschieden (vgl. *Steidl T, Göbel T* [2005], S 22). **Ketamin** gehört zu der Gruppe der Phencyclidinderivate (vgl. *Kretz FJ, Schäffer J* [2006], S 37). Ketamin ist vor allem ein N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA)-Rezeptorantagonist (vgl. *Ensinger H* [2005], S 279). Über diese Rezeptoren werden vielfältigste Wirkungen auf zerebraler und spinaler Ebene vermittelt. Sie spielen unter anderem eine entscheidende Rolle bei der Verarbeitung sensorischer Informationen, bei der Nozizeption, bei Bewegungsabläufen und bei der Regulierung von Gefäßtonus und Blutdruck. Darüber hinaus bindet Ketamin auch an Opioidrezeptoren. Ketamin ist das einzige Hypnotikum, das auch analgetisch wirksam ist. (vgl. *Toussaint S* [2006], S 14; *Lüllmann H et al.* [2003], S 13) Eine Analgesie ist für etwa 30 Minuten gewährleistet. Ketamin wird in der Leber vor allem über Demethylierung und Hydroxylierung metabolisiert (vgl. *Reich DL, Silvey G* [1989], pp 186-197; *Adams HA, Werner C* [1997], S 1026-1042). Die Metaboliten und Originalsubstanz werden über die Nieren ausgeschieden (vgl. *Adams HA, Werner C* [1997], S 1026-1042). Die Kombination **Xylazin-Ketamin** führt nach intraperitonealer Applikation zu einer guten Allgemeinanästhesie (vgl. *Steidl T, Göbel T* [2005], S 68). Xylazin verhindert die Muskelkrämpfe, die durch das Ketamin ausgelöst werden (vgl. *Otto K* [2004], p 559), und die beiden Wirkstoffe ergänzen sich gut in ihrer analgetischen Wirkung. Xylazin wirkt viszeral analgetisch (vgl. *Tacke S* [2003], S 150), im Gegensatz zum Ketamin, das eine somatische Analgesie bewirkt (vgl. *Hellebrekers LJ* [2000], S 78-79). Zusätzlich mindert die

sympathomimetische Wirkung des Ketamins die durch Xylazin verursachte Bradykardie und atrioventrikuläre Blöcke (vgl. *Tacke S* [2003], S 150). Trotz der bekannten Induktion leberspezifischer Enzyme und seiner Einflüsse auf das kardiovaskuläre und respiratorische System wurde die Kombination aus Xylazin und Ketamin verwendet, da sie neben einer schnellen Narkoseeinleitung den Vorteil der Unterdrückung nozizeptiver Reflexe bietet. Ferner bewirkt sie trotz nur einmaliger Applikation eine lang anhaltende und tiefe Narkose. Die Enzyminduktion ist bei der laborchemischen Analyse der Lebertransaminasen zu bedenken, wenn anhand der Serumkonzentrationen der Transaminasen auf das Ausmaß der Leberschädigung geschlossen wird (vgl. *Thompson JS et al.* [2002], pp 63-67). Bei der Verwendung von Xylazin-Ketamin ist die genaue Einhaltung der Dosis essentiell, da die oben genannten unerwünschten Wirkungen in höherer Dosierung zu Blutdruckabfall, myokardialer Insuffizienz und Atemdepression führen. (vgl. *Thompson JS et al.* [2002], pp 63-67).

Das in der vorliegenden Studie durchgeführte **chirurgische Modell** beinhaltete die Laparotomie der Versuchstiere, die Präparation der Leber sowie die Auslagerung des LL zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation. Hierbei besteht generell die Möglichkeit einer signifikanten Veränderung der Leberperfusion infolge des unvermeidlichen chirurgischen Traumas (vgl. *Gelman SI* [1976], pp 881-883; *Bohrer SL et al.* [1981], pp 325-328). Jedoch sind vergleichende Messungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie am nicht-anästhesierten und nicht-laparotomierten Tier aus methodischen und ethischen Gründen nicht durchführbar. Sowohl die in dieser Studie vorgenommenen Bestimmungen der Leberenzyme als auch die Beurteilung der lichtmikroskopischen Präparate ergaben keinen Hinweis auf einen funktionellen oder strukturellen Leberschaden innerhalb der Kontrollgruppe. Darüber hinaus betrug die sinusoidale Perfusionsrate unter Kontrollbedingungen fast 100%, was ebenfalls physiologischen Verhältnissen nahe kommt (vgl. *Menger MD et al.* [1991], pp 158-169; *Post S et al.* [1993b], pp 152-166). Dies deckt sich mit den Ergebnissen von *Vollmar et al.* (vgl. *Vollmar B et al.* [1992], pp 421-430), die in einem Rattenmodell zeigen konnten, dass die Leberperfusion durch eine Laparotomie nicht signifikant beeinflusst wird. (vgl. *Richter S* [1998], S 63, *Slotta JE* [2006], S 67)

Um die Intravitalmikroskopie durchführen zu können, wurden die in Rückenlage fixierten Tiere um 45° in der Sagittalebene nach links geneigt. Der LL wurde mit seiner Unterseite nach oben rotiert, um auf einer Kompresse gelagert zu werden. Eine Beeinträchtigung der Perfusion durch übermäßigen Zug oder Torsion am Gefäßhilus ließ sich somit vermeiden. Bei der Auslagerung wurde darauf geachtet, dass der LL mit der Unterseite nach oben, exakt horizontal in Herzhöhe des Versuchstieres zu

liegen kam. Hierdurch konnte ein hydrostatischer Effekt, der die hepatische Mikrozirkulation und den venösen Rückstrom zum Herzen beeinflussen könnte, ausgeschlossen werden. (vgl. *Richter S* [1998], S 63-64; *Slotta JE* [2006], S 67-68)

Für die **PBL** wurde die linke Pfortader, die den LL versorgt, freipräpariert und ligiert. Um intrahepatischen portalvenösen Blutfluss über Shunts des LM zu vermeiden (vgl. *Li X et al.* [2003], pp 1339-1346), wurde zusätzlich die Pfortader des LM freipräpariert und ebenfalls mit ligiert. In sham-operierten Versuchstieren (Kontrollgruppe) wurden die entsprechenden Pfortaderäste freipräpariert, aber nicht ligiert. Bei der Präparation der einzelnen Pfortaderäste wurde peinlichst darauf geachtet, Gefäßfern zu präparieren. Somit konnte ein Gefäßspasmus und damit Untersuchungsartefakte vermieden werden. In Voruntersuchungen konnten so mit Hilfe von LDF-Messungen vor und direkt nach Präparation ähnliche Blutflusswerte, sowohl in der Leberarterie als auch in der Pfortader gemessen werden. Weitere LDF-Untersuchungen konnten zeigen, dass nach Ligatur der Blutfluss in dem Pfortaderast null war. Ferner wurde darauf geachtet, den Gallengang nicht zu verletzen und Blutungen zu vermeiden. (vgl. *Kollmar O et al.* [2007], pp G1534-G1542)

Für die **TU-Implantation** wurde auf ein etabliertes Lebermetastasenmodell eines KRK zurückgegriffen (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 453-460). Kollmar et al. konnten zeigen, dass das Wachstum isolierter Lebertumore für experimentelle Studien von der Lokalisation der Implantation, der TU-Zellzahl, der verwendeten Kanüle, dem TU-Volumen und der Verschlusstechnik der Punktionsstelle abhängt. In dem CT26.WT-Tumormodell der Maus kann ein einheitliches TU-Wachstum am besten durch die Implantation von  $1 \times 10^5$  TU-Zellen in 10 $\mu$ l PBS erreicht werden. Die Punktion mit einer 32G-Kanüle in den paramedianen Bereich des LL und der Verschluss der Punktionsstelle mit Acrylkleber spielen hierbei auch eine Rolle. Mit dieser festgelegten TU-Platzierung direkt subkapsulär an der Unterseite des LL, ist es mit diesem Modell sehr gut möglich, TU-Wachstumseigenschaften mit Angiogenese und Mikrozirkulation zu untersuchen. Das Modell ist sehr gut reproduzierbar und entspricht in hohem Maße den Wachstumseigenschaften von isolierten Lebertumoren und -metastasen bei Patienten. (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 458) In der vorliegenden Studie wurden für die Tiere des Langzeitüberlebens nach 21 Tagen, wie in diesem Modell empfohlen,  $1 \times 10^5$  TU-Zellen verwendet. Allen anderen Versuchsgruppen wurden  $5 \times 10^5$  TU-Zellen implantiert (vgl. *Weber SM et al.* [1999], p 188). Somit war die TU-Masse in dem insgesamt vierzehntägigen Untersuchungszeitraum größer und konnte somit besser intravitalmikroskopisch und histologisch untersucht werden.

## 4.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

### 4.1.2.1 Makrohämodynamikanalyse mittels LDF

Bei der **LDF** wird monochromatisches Laserlicht auf das Gewebe ausgestrahlt. Die Frequenz des reflektierten gebrochenen Lichtes ist ein Resultat der Interaktion von fließenden Erythrozyten. Dieses Phänomen wurde im Jahre 1975 von Stern erstmalig beschrieben (vgl. *Stern MD* [1975], p 56). Prinzip der LDF ist es, das reflektierende Licht in ein akustisches oder visuelles Signal umzuwandeln, um Änderungen in der Mikrozirkulation zu erkennen. Mit dieser Methode lassen sich wiederholbare Messungen des Blutflusses sowohl von großen Gefäßen als auch von kleinen Kapillaren durchführen, ohne dabei das Gewebe zu verletzen. Gleichwohl müssen einige Probleme bedacht werden. Es ist davon auszugehen, dass LDF nach Gefäßverschluss gewöhnlich Werte größer als „0“ erzielt. Dies wird durch die Brown'sche Bewegung der Makromoleküle im Interstitium hervorgerufen. Diese „Biologische Null“ („biological zero“; vgl. *Tenland T et al.* [1983], p 83) sollte bei klinischen und experimentellen Auswertungen berücksichtigt werden. Ferner gibt es unter physiologischen, nicht-ischämischen Bedingungen Änderungen des LDF-Signals, die durch Änderungen der arteriolen Aktivität oder durch atmungsabhängige Veränderungen des Blutflusses in den Venolen hervorgerufen werden. (vgl. *Colantuoni A et al.* [1994], pp 156-158) Auch wenn die LDF-Technologie einfach durchzuführen ist und nur wenig Zeit für eine Messung benötigt wird, ist zu beachten, dass Bewegungen des Gewebes während der Messung zu Artefakten führen können. Ferner ist die Durchdringtiefe des Laserlichts durch das Gewebe auf etwa 2 mm begrenzt. Dies hat zur Konsequenz, dass mit der LDF nur die Perfusion oberflächlicher Gefäße gemessen werden kann.

### 4.1.2.2 Mikrozirkulationsanalyse mittels IVM

Als Untersuchungsmethode der hepatischen Mikrozirkulation diene die **intravitale Fluoreszenzmikroskopie**, die als so genannte direkte Technik die Möglichkeit hat, dynamische Phänomene über einen längeren Zeitraum detailliert, qualitativ und quantitativ zu analysieren (vgl. *McCuskey RS* [2003], p 1324; *Zeintl H et al.* [1986], pp 1-10; *Menger MD et al.* [1991], pp 158-169). All diese Eigenschaften geben der Intravitalmikroskopie die prinzipielle Überlegenheit in der Untersuchung der Mikrozirkulation gegenüber indirekten Verfahren wie der LDF (vgl. *Koo A* [1986], pp 347-358; *Arvidsson D et al.* [1988], pp G471-G476; *Almond NE, Wheatley AM* [1992], pp G203-G209, *Menger MD, Messmer K.* [1993], pp 27-33; *Vollmar B et al.* [1994a], pp

1421-1431; *Wheatley AM* [1994], pp G960-G962), der  $^{51}\text{Cr}$ -Clearance-Technik (vgl. *Arii S et al.* [1988], pp 314-319), der  $\text{H}_2$ -Gas clearance-Technik (vgl. *Silver IA* [1977], pp 409-420; *Ohkawa M et al.* [1984], pp 226-234; *Gouma DJ et al.* [1986], pp 439-445), der Indocyaningrün-Clearance-Technik (vgl. *Lebrec D et al.* [1981], pp 353-354), der Radiogoldpartikel-Clearance-Technik (vgl. *Lebrec D et al.* [1981], pp 353-354), der  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA-Szintigraphie (vgl. *Atalla SL et al.* [1985], pp 584-590), der  $^{125}\text{I}$ -Albumin-Szintigraphie (vgl. *Schmeling DJ et al.* [1989], pp 195-201; *Poggetti RS et al.* [1992], pp 175-179), der histologischen Analyse von injizierten Kohlenstoffpartikeln (vgl. *Ames A et al.* [1968], pp 437-453; *Kloner RA et al.* [1974], pp 1496-1508; *Goto M et al.* [1992], pp 432-437; *Jerome SN et al.* [1993], pp H479-H483), der Elektronenmikroskopie (vgl. *Flores J et al.* [1972], pp 118-126; *Bouwens L et al.* [1986], pp 718-722; *McKeown CMB et al.* [1988], pp 178-191; *del Zoppo GJ et al.* [1991], pp 1276-1283; *Oda M et al.* [1990], pp 103-128), der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Markierung (vgl. *Bouwens L et al.* [1986], pp 718-722), der Myeloperoxidase-Aktivitätsmessung (vgl. *Grisham MB et al.* [1986], pp G567-G574; *Grisham MB et al.* [1988], pp H1017-H1022; *Carden DL et al.* [1990], pp 1436-1444), der Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs (vgl. *Duling BR, Berne RM* [1970], pp 669-678; *Silver IA* [1977], pp 409-420), der Rückstreuungsspektrophotometrie (vgl. *te Koppelaar JM, Thurman RG* [1990], pp G814-G821; *Goto M et al.* [1992], pp 432-437; *Seiyama A et al.* [1994], pp G944-G951), der Thermodilutionsmethode (vgl. *Sato T* [1987], pp 31-37) sowie Elektronen-Spin-Resonanz-Messungen (vgl. *Kunz R et al.* [1991], S 139-142; *Connor HD et al.* [1992], pp 199-204; *Shiratori Y et al.* [1994], pp 1265-1272), Indikatorverdünnungsmethoden (vgl. *Lapointe DS, Olsen MS* [1989], pp 278-284) oder polarographischen Verfahren (vgl. *Kobayashi H et al.* [1991], pp 240-244). (vgl. *Richter S* [1998], S 65-66)

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Leber ist eine etablierte Untersuchungsmethode, die bis heute in vielen verschiedenen Tiermodellen eingesetzt worden ist. So wurde sie bei Mäusen (vgl. *Rappaport AM* [1977], pp 116-120), Ratten und Hamstern (vgl. *Menger MD et al.* [1991], pp 158-169), Kaninchen (vgl. *McCuskey RS* [1966], pp 455-477) aber auch bei Großtieren, wie zum Beispiel Hunden und Affen (vgl. *Bloch EH* [1955], pp 340-349) durchgeführt.

Eine Echtzeit-Analyse, also eine „on-line“-Analyse, der Mikrozirkulation ist auf Grund der Vielzahl von intravitalmikroskopisch erfassbaren Phänomenen nur schwer möglich. Somit wird eine Dokumentation der mikroskopischen Bilder mit Hilfe einer hochauflösenden CCD-Kamera (vgl. *Hiraoka Y et al.* [1987], pp 36-41) und angeschlossener Videoaufzeichnungseinheit (vgl. *Ellis CG et al.* [1986], pp 229-244) unerlässlich. Die genaue Auswertung und Quantifizierung der einzelnen Parameter kann

somit nach Ende der einzelnen Experimente durch repetitive Bildsequenzanalyse erfolgen. Hierbei ist es mittels Zeitlupe, Bild-zu-Bild-Analyse oder Standbildern auch möglich, komplexe, rasch ablaufende Vorgänge zu erfassen (vgl. *Ellis CG et al.* [1986], pp 229-244; *Menger MD et al.* [1991], pp 158-169; *Menger MD, Lehr HA* [1993], pp 519-522). (vgl. *Richter S* [1998], S 66)

Die Durchführung der „off-line“-Videosequenzauswertung kann sowohl manuell als auch computergestützt (semimanuell oder vollautomatisch) erfolgen (vgl. *Intaglietta M, Tompkins WR* [1973], pp 309-312; *Intaglietta M et al.* [1975], pp 165-179; *Ellis CG et al.* [1986], pp 229-244). Der Vorteil einer digitalisierten Analyse mittels Computer-Video-System besteht vor allem darin, dass eine wesentlich rationellere Quantifizierung der untersuchten Parameter möglich ist. Hierdurch kann eine sehr große Datenmenge in kurzer Zeit verarbeitet werden (vgl. *Ellis CG et al.* [1986], pp 229-244). Die grundlegenden Probleme der computergestützten Video-Analyse bestehen vor allem in der Notwendigkeit eines konstanten, hohen Signalverhaltens der zu untersuchenden Objekte, sowie in der möglichen Beeinflussung der Auswertung durch Bewegungsartefakte (vgl. *Zeintl H et al.* [1986], pp 1-10). Obwohl automatisierte Analyseverfahren der hepatischen Mikrozirkulation bereits durchgeführt wurden (vgl. *Koo A, Liang IYS* [1977], pp 315-325; *Komatsu H et al.* [1990], pp 1-13), ergeben sich jedoch gerade im Falle der Intravitalmikroskopie der Mäuseleber Schwierigkeiten. Diese entstehen durch die Atemexkursionen, die dem Organ durch die so entstehenden Bewegungen des Zwerchfells widerfahren. Grundsätzlich ist es zwar möglich, durch ein Metallschild, das zwischen Zwerchfell und Leber eingefügt wird, die Übertragungen von Atembewegungen und Herzaktionen auf die Leber zu reduzieren (vgl. *Komatsu H et al.* [1990], 1-13). Eine absolute Ruhigstellung des Organs kann jedoch nicht erreicht werden, da bei der Maus die Leber über das Ligamentum falciforme hepatis direkt mit dem Zwerchfell verbunden ist. Daher verzichteten wir in dem von uns gewählten Modell auf eine computergestützte Analyse der Mikrozirkulation. Stattdessen erfolgte die Auslagerung des LL auf einen mit einer feuchten Kompresse bedeckten Löffel, was eine für die manuelle Auswertung völlig ausreichende Ruhigstellung des Untersuchungsobjektes gewährleistete (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 454-455; *Clemens MG et al.* [1985], pp H804-H811; *Marzi I et al.* [1991], pp 432-436; *Menger MD et al.* [1991], pp 158-169; *MacPhee PJ et al.* [1992], pp G17-G23; *Post S et al.* [1993a], pp 1490-1497; *Vollmar B et al.* [1994c], pp H786-H793). (vgl. *Richter S* [1998], S 66-67)

Prinzipiell ist die Analyse der hepatischen Mikrozirkulation mittels Epi-Illumination (Auflicht) oder Trans-Illumination (Durchlicht) möglich (vgl. *McCuskey RS* [2003], p 1324). Frühe intravitalmikroskopische Untersuchungen nutzten dabei vornehmlich

die Trans-Illuminationstechnik (vgl. *Knisley MH* [1939], pp 269-270; *Hanzon F* [1952], pp 1-268; *Knisley MH et al.* [1957], pp 1023-1025; *Bloch EH* [1955], pp 340-349). Da diese Technik auf sehr dünne Gewebedicke angewiesen ist, kann im Falle der Leber damit nur der äußere Rand eines Leberlappens beurteilt werden. Somit ist die Analyse größerer Areale mit zahlreichen Azini nicht möglich und die innerhalb eines Experiments zu erhebende Datenmenge bleibt daher limitiert. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen mittels Trans-Illumination (vgl. *Eguchi H et al.* [1991], pp 751-757) gegenüber Studien, welche sich der Epi-Illuminationstechnik bedienten (vgl. *Post S et al.* [1993b], pp 152-166; *Vollmar B et al.* [1993], S 218-225), unter physiologischen Bedingungen eine deutlich niedrigere sinusoidale Perfusionsrate. Die für Trans-Illumination notwendige Untersuchung des äußeren Leberrandes beinhaltet das Risiko einer präparationsbedingten, mechanischen Alteration des Organs. Außerdem besteht eine erhöhte Gefahr der Austrocknung des dünnen äußersten Leberrandes während der Mikroskopie. Ferner wurde der TU an der Mittellinie zentral im LL implantiert (vgl. *Kollmar O et al.* [2004], pp 453-460). Untersuchungen in dieser Region wären mit der Trans-Illuminationstechnik nicht möglich. Aus diesen Gründen verwendeten wir in der vorliegenden Studie die Epi-Illuminationstechnik, welche die Visualisierung der Mikrozirkulation an der Oberfläche massiver Organe und somit auch dem implantierten TU ermöglicht. Hierbei kann davon ausgegangen werden, dass sich die an der Leberoberfläche beobachtenden pathophysiologischen Prozessen nicht von denen im Inneren des Organs ablaufenden unterscheiden (vgl. *Rappaport AM* [1958], pp 673-689). (vgl. *Richter S* [1998], S 67)

Um die Stoffwechselsituation des Lebergewebes beurteilen zu können, wurde das reduzierte Redox-Coenzym **NADH** verwendet. Diese Methode wurde von *Chance et al.* erstmals im Jahre 1962 vorgestellt (vgl. *Chance B et al.* [1962], p 499). Ohne vorherige Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen kann die Gewebeoxygenierung im UV-Licht beurteilt und quantifiziert werden (vgl. *Burkhardt M et al.* [1998], pp 83-89). Der Wasserstoff des NADH wird zur Energiegewinnung in die Atmungskette im Mitochondrium eingeschleust (vgl. z.B. *Schweitzer D et al.* [2004], S 66). Der Gewebespiegel dieses Coenzym ist ein Indikator für die anoxischen Redoxverhältnisse und somit für die Stoffwechselsituation des Lebergewebes. Zwischen 290 und 380nm entsteht im NADH-Absorptionsspektrum ein Band, das für NADH spezifisch ist. Die emittierte Lichtmenge entspricht dem Gewebegehalt an NADH, welcher wiederum negativ mit der Gewebeoxygenierung korreliert. Somit lassen sich durch Fluoreszenzmessung bei festen Bestrahlungseinstellungen intravitalmikroskopisch in Epi-Illuminationstechnik nach Ausbleichen der Vitamin A-speichernden Ito-Zellen, die

unter UV-Beleuchtung ebenfalls fluoreszieren, der Gewebespiegel von NADH in aU durch eine Grauwertbestimmung der Autofluoreszenz messen und damit verschiedene Stoffwechselsituationen des Lebergewebes vergleichen (vgl. *Vollmar B et al.* [1997a], pp 164-173). Auf die Erholungsphase für die NADH-Autofluoreszenz nach Ausbleichen der Ito-Zellen, die von Suematsu et al. (vgl. *Suematsu M et al.* [1993], pp 28-42) propagiert wurde, kann hierbei verzichtet werden (vgl. *Burkhardt M et al.* [1998], pp 83-89). Normalwerte von *in vitro* perfundierten Lebern liegen im Bereich von 40-50 aU (vgl. *Minor T et al.* [1997], p 1845), während erhöhte NADH-Fluoreszenzwerte über 100 aU einen gestörten Redoxstatus der Leber (NADH-Ansammlung im anoxischen Gewebe) dokumentieren. Anzumerken ist, dass diese Werte als relativ zu bezeichnen sind, da sie von der Empfindlichkeit der Kameraeinheit abhängig sind. Erniedrigte Werte zeigen sich hingegen unter Sauerstoffperfusion (vgl. z.B. *Minor T et al.* [1998], S 377-378). Somit ist die NADH-Fluoreszenzbestimmung eine nicht-invasive Untersuchung, um den Organstoffwechsel zu beurteilen. Sie wurde eingesetzt, um die Änderung der NADH-Konzentration im Lebergewebe als Resultat von Änderungen in der oxidativen Phosphorylierung zu dokumentieren (vgl. *Klauke H et al.* [1998], pp 108-109). Somit dient dies als Messung des mitochondrialen Redoxstatus (Gewebeoxygenierung).

Die nur geringe Autofluoreszenz der Leber (vgl. *Hanzon F* [1952], pp 1-268) erfordert für weitere intravitalmikroskopische Untersuchungen die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Kontrastverstärkung (vgl. *de Bruyn PPH et al.* [1950], pp 279-307; *Gumucio JJ et al.* [1981], pp 639-646; *Sherman IA, Fisher MM* [1986], pp 444-449; *Vollmar B et al.* [1994b], pp H1927-H1934).

Zur Darstellung der Perfusionsverhältnisse diente der Farbstoff **Natrium-Fluoreszein**, der zu Beginn der intravitalmikroskopischen Aufnahmen retrobulbär appliziert wurde. Natrium-Fluoreszein ist ein Farbstoff, der vorwiegend von Hepatozyten aufgenommen wird (vgl. z.B. *Takei Y et al.* [1991], p 960) und somit der Anfärbung der Parenchymzellen dient (vgl. z.B. *Richter S* [1998], S 15). Folglich entsteht ein Kontrast zwischen Zellen und Gefäßen (vgl. z.B. *Sherman IA et al.* [1990], p H461), so dass Aussagen über die Perfusion und die Relation beziehungsweise Dichte zwischen Gewebe und Zellen getroffen werden können (vgl. z.B. *Schäfer T et al.* [2003], p 661). In der geeigneten Dosis (2µmol/kg KG) wurde damit eine optimale Kontrastverstärkung der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen erzielt, das heißt die Sinusoide blieben über ihren gesamten Verlauf innerhalb des Azinus von periportal bis perizentral gut visualisierbar. Nach der Applikation von Natrium-Fluoreszein konnte die sinusoidale Perfusion qualitativ beurteilt werden. Die Evaluation der sinusoidalen Perfusion mit Hilfe der Intravitalmikroskopie erfolgte, indem der

Fluss von Erythrozyten über eine 200µm lange, senkrecht zu den Sinusoiden gelegten Linie erfasst wurde (vgl. *Clemens MG et al.* [1985], pp H804-H811). Hiermit ist die Abgrenzung perfundierter von nicht-perfundierten Sinusoiden möglich, was bereits bei verschiedenen Untersuchungen der Lebermikrozirkulation im Rahmen von Endotoxinämie (vgl. *Vollmar B et al.* [1993], S 218-225; *Vollmar B et al.* [2002], pp 1091-1098), Ischämie/Reperfusion (vgl. *Vollmar B et al.* [1994c], pp H786-H793) und Lebertransplantation (vgl. *Post S et al.* [1992], pp 803-809) angewandt wurde.

**Rhodamin 6G** reichert sich nach intravenöser Applikation in den Granula von Leukozyten und Thrombozyten an. Im Bereich von 530 bis 560nm (vgl. z.B. *Eipel C et al.* [2004], pp G769-G776) im Grünlichtfilter lassen sich somit mit Hilfe dieses Farbstoffes selektive Aussagen über die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen machen (vgl. z.B. *Vollmar B et al.* [1997b], p 711). Zwischen Leukozyten und Thrombozyten kann auf Grund der Zellgröße problemlos unterschieden werden. Ausgewertet wurden nur die sogenannten Sticker. Als solche (adhärente Leukozyten) wurden diejenigen Leukozyten definiert, „...die über den Beobachtungszeitraum von 30s an der gleichen Position am Endothel...“ (*Zysk SP et al.* [2003], S 307) hafteten. In adäquater Dosierung (2µmol/kg KG retrobulbär) wurde eine ausreichende Detektion der Leukozyten ermöglicht (vgl. *Baatz H et al.* [1995], pp 85-91). (vgl. *Richter S* [1998], S 67)

Apoptotischer Zelltod wurde mit dem Farbstoff **Bisbenzimid** untersucht (vgl. z.B. *Schäfer T et al.* [2003], p 661). Dieser DNA-spezifische Farbstoff für Zellkerne und Chromosomen (vgl. z.B. *Brinkley BR, Cox SM* [1978], p 345), färbt das Chromatin der Zellkerne der Hepatozyten (vgl. z.B. *Ring D et al.* [1982], p 550). Bisbenzimid hat eine hohe Bindungsaffinität zu Adenin-Thymin-reicher DNA (vgl. *Latt SA, Stetten G* [1976], p 24). Es kommt bei Komplexbildung von Bisbenzimid mit DNA zu einem Fluoreszenzintensitätsanstieg (vgl. *Araki T et al.* [1987], p 336) und einer starken optischen Aktivität (vgl. *Latt SA, Stetten G* [1976], p 24). Nach retrobulbärer Gabe einer geeigneten Dosis (2µmol/kg KG) konnte somit durch Zählen der Zellen, die Apoptose-assoziierte Kondensationen, Fragmentierungen und sichelförmige Formationen von Chromatin zeigten, eine Aussage über die Anzahl apoptotischer Zellen getroffen werden (vgl. z.B. *Schäfer T et al.* [2003], p 661). (vgl. z.B. *Belloc F et al.* [1994], p 59; *Ormerod MG et al.* [1993], p 595)

Werden **Latex-Partikel** in die Blutbahn injiziert, dann werden diese von den gesunden Kupfferzellen der Leber phagozytiert. Durch Bestimmung der „stickenden“, also phagozytierten, Partikel kann eine Aussage über die Kupfferzellaktivität getroffen werden (vgl. z.B. *Wanner GA et al.* [1999], p 1240). (vgl. *Vollmar B et al.* [1997b],

p 711) Durch die Gabe von 1,00µm-Latex-Partikel kann ausschließlich eine Aussage über die Kupferzellaktivität getroffen werden, da nur diese solch große Partikel phagozytieren. Endothelzellen phagozytieren nur Partikel, die kleiner als 0,8µm sind. (vgl. *Dan C, Wake K* [1985], pp 76-80; *Fahimi HD* [1982], p 495) Den Versuchstieren wurden  $2,275 \times 10^6$  Latex-Partikel retrobulbär appliziert.

Potentiell ist die Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, wie Rhodamin-6G, denkbar (vgl. *Higuti T et al.* [1980], pp 463-467; *Bereiter-Hahn J et al.* [1983], pp 147-155; *Dietzmann K et al.* [1987], pp 47-51). In der gewählten Dosis ist jedoch eine Störung der Atmungskette, und somit eine Auswirkung auf die Ergebnisse, auf Grund pharmakologisch-toxischer Eigenschaften des Farbstoffes unwahrscheinlich (vgl. *Eguchi H et al.* [1991], pp 751-757). Des Weiteren kann eine längere Lichtexposition während der Intravitalmikroskopie intrazelluläre photodynamische Prozesse induzieren, weshalb die Belichtung eines Gesichtsfeldes auf maximal 50 Sekunden und die Gesamtdauer der Mikroskopie auf 10-15 Minuten beschränkt wurde (vgl. *Menger MD et al.* [1991], pp 158-169). Bei der Auswahl der Gesichtsfelder wurde darauf geachtet, nicht in unmittelbarer Nähe eines bereits belichteten Areals wiederholt zu mikroskopieren. (vgl. *Richter S* [1998], S 68)

#### 4.1.2.3 Laborchemische Untersuchungen

Für eine generelle Einschätzung der Auswirkungen der PBL wurde die Aktivität der LDH bestimmt. Die LDH ist ein zytoplasmatisch gelöstes Enzym, das in allen Geweben, einschließlich der Leber, vorkommt (vgl. *Preuss R et al.* [2004], S 631). Die Aktivität der Gesamt-LDH setzt sich aus der Aktivität von 5 Isoenzymen zusammen. Auf Grund dessen hat sie eine geringe Organspezifität. Somit lässt eine erhöhte LDH-Aktivität nur die Aussage zu, dass eine Gewebeschädigung aufgetreten ist. In welchem Organ diese Schädigung jedoch vorliegt, muss durch zusätzliche Bestimmungen geklärt werden. (vgl. *Halwachs-Baumann G* [2006], S 91)

Um genauere Aussagen über das Maß der Leberschädigung zu treffen, wurde die Erhöhung leberspezifischer Transaminasen im Serum, nämlich ASAT und ALAT, bestimmt. Eine vermehrte Freisetzung dieser Enzyme mit messbarer Aktivitätserhöhung erfolgt im Rahmen pathophysiologischer Prozesse, welche mit einer Beeinträchtigung der hepatozellulären Integrität einhergehen (vgl. *Schmidt E, Schmidt FW* [1987], pp 525-540). So zeigt sich ein mit der Dauer der Leberischämie korrelierender Anstieg der Serumaktivitäten von ASAT und ALAT (vgl. *Farkouh EF et al.* [1971], pp 832-838). (vgl. *Richter S* [1998], S 69)

Mit Hilfe der Enzymtopographie der Zelle ist es möglich, die Lokalisation des entstandenen Schadens zu bestimmen und somit eine Aussage über den Schweregrad einer Leberschädigung zu treffen (vgl. *Nishimura T et al.* [1986], pp 701-707; *Schmidt FW, Schmidt E* [1989], pp 256-264). Zytosolische Enzyme, wie zum Beispiel ALAT, gelangen über eine akute vesikuläre Freisetzung in das Blut. Dies ist bei leichteren Zellschäden möglich, jedoch geht diese Aktivitätserhöhung nicht automatisch mit Zelluntergang einher. (vgl. *Nishimura T et al.* [1986], pp 701-707; *Schmidt E, Schmidt FW* [1987], pp 525-540). Somit ist eine Aktivitätserhöhung zytosolischer Enzyme auch bei reversiblen Zellschäden nachweisbar. Folglich eignet sich diese Bestimmung auch zum Nachweis akuter temporärer Zellschäden beziehungsweise von Zellmembranintegritätsstörungen. (vgl. *Slotta JE* [2006], S 73) Ein Anstieg mitochondrialer Enzyme, wie der Glutamatdehydrogenase (GLDH), kann als schwere, die Mitochondrienstrukturen einbeziehende Zellschädigung aufgefasst werden (vgl. *Schmidt E, Schmidt FW* [1987], pp 525-540; *Schmidt E, Schmidt FW* [1988], pp 43-56). Ferner kann von Änderung des Enzymmusters von ASAT und ALAT auf die Schwere der Leberschädigung zurückgeschlossen werden. Im Gegensatz zu der ALAT, die ein ausschließlich zytoplasmatisches Enzym darstellt, ist die ASAT sowohl im Zytoplasma als auch in den Mitochondrien lokalisiert (vgl. *Kamiike W et al.* [1982], pp 1349-1356). Leichtere Zellschäden verursachen folglich nur die Freisetzung von ALAT und der zytoplasmatischen ASAT. Bei ausgeprägteren Schädigungen wird erst die Aktivität der mitochondrialen ASAT ansteigen. Somit verändert sich das Verhältnis ASAT/ALAT (De-Ritis-Quotient) hin zu größeren Werten (vgl. *Kleine FD* [1965], S 355-362; *Kamiike W et al.* [1982], pp 1349-1356; *Frederiks WM et al.* [1983], pp 459-472; *Nishimura T et al.* [1986], pp 701-707). (vgl. *Richter S* [1998], S 69-70)

#### 4.1.2.4 HE-Färbung, Immunhistochemie und Western Blot

Um die Ergebnisse der Intravitalmikroskopie weiter zu festigen, wurden nach **HE-Färbung** histologische Untersuchungen mit dem nach Versuchsende asservierten Gewebe durchgeführt. In dieser Färbung wurde in semiquantitativer Auswertung die zytoplasmatische Scholligkeit, Vakuolisierung und Nekrose in Hepatozyten ausgewertet (vgl. *Kollmar O et al.* [2007], pp G1534-G1542).

Zur **immunhistochemischen Untersuchung** der Leber wurden Färbungen mit Antikörpern gegen PCNA und Caspase-3 durchgeführt und ebenfalls semiquantitativ ausgewertet. PCNA ist ein Indikator der zellulären Proliferation. Laut Assy und Minuk (vgl. *Assy N, Minuk GY* [1997], pp 945-952) ist kein alleiniger „Gold Standard“

für den Nachweis zellulärer Proliferation gefunden. PCNA-Färbung ist aber eine gute Methodik, um diese zu quantifizieren (vgl. *Assy N, Minuk GY* [1997], pp 945-952; *Shin M et al.* [2002], pp 217-224). Caspase-3 zeigt den apoptotischen Zelltod. Über die Methodik für den Nachweis von Apoptosen besteht eine kontroverse Diskussion. So sind Kohli et al. (vgl. *Kohli V et al.* [1999], pp 1099-1105) der Auffassung, dass biochemische Verfahren, wie die von uns gewählten immunhistochemischen Färbungen Methode der Wahl ist. Dies beinhaltet die Färbung von Gewebsschnitten gegen Enzyme, die während des apoptotischen Zelltodes aktiv sind (Caspasen) oder der Nachweis von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Assay). Demgegenüber steht zum Beispiel Jaeschke et al. (vgl. *Jaeschke H et al.* [2001], pp 1555-1557), der eine rein morphologische Betrachtung der Zellkerne als Methodik propagiert.

Für alle semiquantitativen Auswertungen diene folgender Score: >50% (4 Punkte), 30-50% (3 Punkte), 10-30% (2 Punkte), 0-10% (1 Punkt) und 0% (0 Punkte) (vgl. *Kollmar O et al.* [2007], pp G1534-G1542).

Um Veränderungen des Lebergewebes durch die PBL auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden **Western Blot-Analysen** durchgeführt. Müller et al. (vgl. *Müller L et al.* [2004], S 318) konnten nach PBL eine gesteigerte Expression von VEGF zeigen. Da die Rolle weiterer Wachstumsfaktoren ungeklärt ist, wurden in dieser Studie zusätzlich die Expression von HGF und TGF- $\alpha$  untersucht. Um den Einfluss von NO bei der HABR-vermittelten Arterialisierung und dem mikrozirkulatorischen Remodelling nach PBL zu untersuchen, wurden die Expression von eNOS und iNOS ebenfalls mittels Western Blot untersucht. Für den Nachweis von Proteinen ist die Western Blot-Methodik Mittel der Wahl (vgl. z.B. *Holtzhauer M* [1997], S 73-74).

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf den ligierten Leberlappen

#### 4.2.1.1 Makro- und Mikrozirkulation

Vorherige Studien zeigen deutlich, dass die Okklusion der Pfortader eine HABR bewirkt, um einen gleich bleibenden totalen Leberblutfluss aufrechtzuerhalten (vgl. *Lautt WW* [1985], pp G549-G556; *Richter S et al.* [2001], pp 193-201). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die PBL des LL eine insgesamt 50%-ige Reduktion des linkshilären Blutflusses an Tag drei postoperativ bewirkt, die sich

jedoch nach Tag 14 postoperativ fast auf Normalniveau erholt. In der Annahme eines 20 bis 30%-igen Anteil der Leberarterie am gesamten Blutfluss der normalen Leber, (vgl. *Greenway CV, Stark RD* [1971], pp 23-65) zeigt eine 50%-ige Reduktion des linkshilären Blutflusses einen zweifachen HABR-assoziierten Anstieg des arteriellen Flusses an Tag drei nach PBL. Die Tatsache, dass die Masse des LL auf ~60% angestiegen ist, zeigt einen 3,3-fachen Anstieg des arteriellen Flusses. Interessanterweise hat sich der gesamte linkshiläre Blutfluss auf ~90% der Werte der Kontrollgruppe an Tag 14 nach PBL erholt. Dies entspricht einem vierfachen Anstieg des arteriellen Flusses im Vergleich zu der Kontrollgruppe und einem 6,7-fachen Anstieg unter Berücksichtigung des Gewebsmasseverlustes. Dies stimmt mit Ergebnissen vorheriger Berichte überein, die zeigten, dass eine HABR direkt nach PBL nachgewiesen werden konnte (vgl. *Um SH et al.* [1994], pp 202-209) mit einer Wiederherstellung der Leberdurchblutung durch einen Anstieg des hepatischen arteriellen Flusses auf bis zu 666%. (vgl. *Rocheleau B et al.* [1999], pp G1000-G1007)

Die HABR-vermittelte Arterialisierung der portalblutentzogenen Leber bewirkt eine teilweise, aber nicht vollständige sinusoidale Kapillarisation, die durch einen Übergang von sinusoidalen Endothelzellen in Kapillartyp-Endothelzellen ohne Ausbildung einer Basalmembran hervorgerufen wird. (vgl. *Yamasaki M et al.* [1999], pp 401-411) Dennoch gibt es bisher keine Informationen darüber, wie die PBL sich auf die hepatische mikrozirkulatorische Funktion auswirkt. Mit Hilfe der Intravitalfluoreszenzmikroskopie wurde somit mit diesen Untersuchungen zum ersten Mal gezeigt, dass eine Deprivation des portalen Flusses eine signifikante Reduktion von ~80% der regulär perfundierten Sinusoide innerhalb der initialen 30 Minuten nach PBL bewirkt. Dennoch kam es zu einer frühen Erholung der funktionellen sinusoidalen Dichte auf ~50% innerhalb von 60 Minuten, die sich in der nachfolgenden vierzehntägigen Untersuchungsperiode nicht veränderte. Interessanterweise war das initiale sinusoidale Perfusionsversagen mit einer signifikanten Gewebhypoxie (ansteigende NADH-Autofluoreszenz) und einer hepatozellulären Dysfunktion (reduzierte hepatozelluläre Clearancefunktion) verbunden. Die HABR-vermittelte Arterialisierung normalisierte jedoch die hepatozelluläre Funktion und die Gewebeoxygenierung trotz der bestehenden 50%-igen Reduktion der sinusoidalen Perfusionsdichte. Neben der Arterialisierung des mikrovaskulären Blutflusses hat der signifikante Anstieg des sinusoidalen Durchmessers wahrscheinlich zu der gezeigten Normoxygenierung des parenchymalen Gewebes beigetragen.

#### 4.2.1.2 Proteinexpression

Die HBR-vermittelte Arterialisierung mag die Aktivität von NO über eine ansteigende eNOS-Produktion beeinflussen. Vorherige Studien, die die Bedeutung der Synthese von NO-Isoformen bei der Manifestation der portalen Hypertension untersucht haben, konnten zeigen, dass die PBL einen hyperdynamischen Systemkreislauf und eine extrahepatische portale Hypertension induziert (vgl. *Niederberger M et al.* [1996], pp 947-951; *Theodorakis NG et al.* [2003], pp 1500-1508). Dies war assoziiert mit einem Anstieg der eNOS-Expression im Splanchnikusgefäßsystem (vgl. *Niederberger M et al.* [1996], pp 947-951). *Theodorakis et al.* (vgl. *Theodorakis NG et al.* [2003], pp 1500-1508) konnten in Knockout-Mäusen ebenfalls zeigen, dass eNOS eher als iNOS für die Entwicklung eines hyperdynamen Kreislaufes und einer portalen Hypertension verantwortlich ist. Wir konnten in der vorliegenden Studie nachweisen, dass die PBL ebenfalls mit einer gesteigerten eNOS-Expression in der Leber einhergeht. Dies mag durch die HBR-vermittelte Arterialisierung und der Gewebeoxygenierung nach der PBL unterstützt werden.

Eine neue Studie zeigt, dass PBL intrazelluläre Stressproteine und immediate-early-genes sowie das Hitze-Schock-Protein (heat shock Protein, HSP) 10, die Hämoxigenase (HO)-1 und das early-growth-gene (Egr)-1 induziert (vgl. *Mueller L et al.* [2005], pp 994-1001). Diese Gene sind dafür bekannt, dass sie sowohl zur Angiogenese (vgl. *Sunamura M et al.* [2003], pp 15-24; *Worden B et al.* [2005], pp 7071-7080) als auch zum TU-Wachstum (vgl. *Mitchell A et al.* [2004], pp 3065-3069; *Nylandsted J et al.* [2002], pp 7139-7142; *Tanaka S et al.* [2003], pp 902-909) beitragen. Müller et al. stellten die Hypothese auf, dass das Gewebe, dem der portale Blutfluss entzogen wurde, Abwehrmechanismen wie HO-1 und HSP70, die geeignet sind, Neovaskularisierung zu stimulieren, als Antwort auf die lokale Hypoxie exprimiert (vgl. *Mueller L et al.* [2005], pp 994-1001). In der vorliegenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass nur initial nach PBL eine Gewebehypoxie vorliegt, die von einer späteren Normalisierung der Oxygenierung gefolgt wird. Folglich konnten keine Angiogenese und neue Gefäßformationen nach PBL nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war eine Deprivierung des portalen Blutflusses mit einem sinusoidalen Umbau verbunden, der eine allgemeine Ausdünnung der Absolutzahl der Sinusoide einschloss. Neben der normalisierten parenchymatös Oxygenierung hat die Induktion von PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1) durch die PBL (vgl. *Mueller L et al.* [2002], pp 606-612) wahrscheinlich zu dem Fehlen der Angiogenese geführt, weil PAI-1 eine anti-angiogene Wirkung besitzt (vgl. *Inoue M et al.* [2005], pp 1445-1451), da es die Expression von pro-angiogenen Genen hemmt.

#### 4.2.1.3 Lebergewicht

Vorherige Studien haben eine ausgeprägte Reduktion von Gewicht, Größe und Anzahl von Hepatozyten innerhalb von fünf bis acht Tagen nach PBL gezeigt (vgl. *Mueller L et al.* [2005], pp 994-1001; *Mueller L et al.* [2003], pp 146-155; *Picard C et al.* [2004], pp 618-628; *Takamura K et al.* [2005], pp 3-11; *Um SH et al.* [1994], pp 202-209). Der weitere Verlauf des Gewichts des ligierten Leberlappens wurde jedoch nicht in diesen Studien betrachtet. Die vorliegende Studie bestätigt die schnelle Gewichtsreduktion in den ersten Tagen nach PBL, die an Tag sieben am deutlichsten war. Interessanterweise konnte jedoch zum ersten Mal gezeigt werden, dass es zu einer Erholung des Gewichtes des ligierten Lappens an Tag 14 kam, was einer späten proliferativen und regenerativen Antwort entspricht.

#### 4.2.1.4 Apoptotischer und nekrotischer Zelltod

Der Mechanismus der Leberatrophie nach PBL wird immer noch kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen, dass nekrotischer Zelltod von größerer Bedeutung ist als die Atrophie (vgl. *Bilodeau M et al.* [1999], pp 29-37; *Mueller L et al.* [2005], pp 994-1001). *Bilodeau et al.* (vgl. *Bilodeau M et al.* [1999], p 35) konnten zeigen, dass nach PBL im ligierten Leberlappen die Dichte an Hepatozyten im Sinne einer Atrophie abnimmt, vor allem aber, dass Bereiche mit angeschwollenen Hepatozyten und stark eosinophilem Zytoplasma im Sinne einer Nekrose nachweisbar sind. Erste Zeichen von Nekrose lassen sich nach zwölf Stunden nachweisen, als Ergebnis von konfluierender zentrolobulärer Nekrose in fast allen Azini nach 24 bis 48 Stunden (vgl. *Mueller L et al.* [2005], pp 994-1001; *Takamura K et al.* [2005], pp 3-11). Es besteht die Überlegung, dass der nekrotische Zelltod von parenchymatöser Apoptose gefolgt wird, was sich durch Hepatozyten mit dichten, geschrumpften Zellkörpern nach 24 bis 96 Stunden nach PBL zeigt (vgl. *Mueller L et al.* [2005], pp 994-1001). Im Gegensatz dazu nehmen *Picard et al.* (vgl. *Picard C et al.* [2004], pp 618-628) an, dass eine frühe pro-apoptotische Aktivität mit hoher Bax- (Bcl-2 associated X Protein) und niedriger Bcl-2-Expression (B-Cell Lymphoma 2) gefolgt von späten anti-apoptotischen Bedingungen mit niedriger Bax- und höherer Bcl-2-Expression vorliegt. Interessanterweise sind jedoch diese Bax- und Bcl-2-Expressionen mit einer niedrigen Caspase-3-, -8- und -9-Expression während der ersten 48 Stunden nach PBL und mit einem Anstieg dieser Apoptose-assoziierten Moleküle nach 72 Stunden verbunden (vgl. *Picard C et al.* [2004], pp 618-628). Alle diese Studien sind jedoch durch die Einschränkung des post-PBL-Untersuchungszeitraums auf sieben Tage begrenzt. In der vorliegenden Studie konnte deutlich gezeigt werden, dass sich eine hepatozelluläre Nekrose während der ersten drei Tage nach PBL manifes-

tiert, was sich sowohl durch einen erhöhten Serumspiegel der Leberenzyme als auch einer hepatozellulären Karyolyse zeigt. Während diese Zeichen des nekrotischen Zelltodes mit der Zeit verschwinden, konnte ein Zellkernkondensation-assoziiertes später apoptotischer Zelltod nach PBL nachgewiesen werden.

#### 4.2.1.5 Zellproliferation

Über das Potential des ligierten Leberlappens, Zellproliferation zu entwickeln, gibt es nur wenig Information. Uemura et al. konnten zeigen, dass negative Regulatoren der hepatozytären Proliferation, wie TGF- $\beta$ 1 und IL-1 $\beta$  (Interleukin-1 $\beta$ ), sehr stark im ligierten Leberlappen während der ersten sieben Tage nach PBL exprimiert werden (vgl. *Uemura T et al. [2000]*, pp 173-179). Dementsprechend konnten in der vorliegenden Studie keine PCNA-Expression innerhalb der ersten sieben Tage nach PBL nachgewiesen werden. Interessanterweise war jedoch der Beginn des späten apoptotischen Zelltods im ligierten Leberlappen mit einem merklichen Anstieg der parenchymalen Proliferation verbunden, was sich durch einen ausgeprägten Anstieg PCNA-positiv-gefärbter Hepatozyten an Tag 14 nach PBL zeigt. Somit zeigt die spätere Gewichtszunahme des ligierten Leberlappens, die an Tag 14 nachgewiesen werden konnte, dass die Zellproliferation signifikant dem apoptotischen und nekrotischen Zelltod überwiegt. Letztlich können diese Ergebnisse die klinischen Befunde, die zeigen, dass Tumoren innerhalb des ligierten Leberlappens nicht notwendigerweise schrumpfen, sondern eine Zunahme an Größe zeigen, erklären. (vgl. *Broering DC et al. [2002]*, pp 905-913; *Kokudo N et al. [2001]*, pp 267-272)

Dies kann trotz signifikanter Apoptose und Nekrose auftreten. Insgesamt konnten wir innerhalb der ersten sieben Tage einen initialen hypoxischen Schaden nach PBL mit hauptsächlich Nekrose zeigen. Die spätere Phase des Remodellings zeigte immer noch einige Apoptosen, jedoch überwog die Zellproliferation mit einem über zehnfachen Anstieg der PCNA-positiven Nuklei von Tag sieben zu Tag 14. Auf Grund dessen können wir davon ausgehen, dass ein TU im gleichen Leberlappen wohl initial nach PBL auf diese Weise geschädigt würde (obwohl die meisten Tumoren durchaus gegen Hypoxie widerstandsfähig sind), allerdings während der späteren Phase gesteigerte Proliferation zeigen würde.

## 4.2.2 Auswirkungen der Pfortaderastligatur auf das Tumorwachstum

### 4.2.1.1 Makro- und Mikrozirkulation

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der reduzierte Blutfluss innerhalb der ersten 14 Tage zu

- einer verzögerten Entwicklung der Gefäß-/Invasionsfront der Tumoren,
- einer reduzierten Dichte an TU-Gefäßen,
- einer signifikanten sinusoidalen Dilatation im Bereich des TU-Randes und
- einer reduzierten funktionellen Kapillardichte in der normalen Leber

führte. Die reaktive HABR, die im ersten Teil der Studie gezeigt werden konnte, führte dann innerhalb von 21 Tagen zu einem nicht mehr unterschiedlichen TU-Volumen. Dies zeigen auch klinische Studien (vgl. z.B. *Barbaro B et al.* [2003], pp 98-102), die einen Monat nach Pfortaderokklusion keinen Unterschied im TU-Volumen sehen konnten. Die PBL führte des Weiteren initial zu einer verstärkten leukozytären Infiltration sowohl im TU als auch in der normalen Leber.

### 4.2.1.2 Proteinexpression

Die signifikante sinusoidale Dilatation im Bereich des TU-Randes ging mit einer deutlich gesteigerten VEGF-Expression einher. VEGF ist als Faktor bekannt, der ein TU-Wachstum beschleunigt (vgl. *Xiong ZP et al.* [2004], pp 386-390) und ist auch bei anderen Eingriffen an der Leber, wie z.B. der TACE (vgl. *Li X et al.* [2004], pp 2878-2882), erhöht. Des Weiteren ging die gesteigerte Proliferation der TU-Zellen mit einer vermehrten Expression von VEGF, HGF und TGF- $\alpha$  im an den TU angrenzenden Gewebe einher. *Barbaro et al.* (vgl. *Barbaro B et al.* [2003], pp 98-102) konnten zeigen, dass es zu einer gesteigerten HGF-Expression sowohl im TU-tragenden Leberlappen als auch in der Restleber nach Pfortaderokklusion kommt. Ähnliche HGF-Expressionsänderungen konnten auch bei ausgedehnter Hepatektomie und Ischämie/Reperfusion gezeigt werden (vgl. *Baier P et al.* [2006], pp 3835-3840). Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie. *Kusaka et al.* (vgl. *Kusaka K et al.* [2006], pp 1404-1142) konnten bei der Pfortaderembolisation zeigen, dass sowohl im okkludierten als auch im nicht-okkludierten Leberlappen die TGF- $\alpha$ -Expression steigt. In der vorliegenden Studie konnten wir erstmals die TGF- $\alpha$ -Expressionssteigerung nach PBL nachweisen. Die Expressionssteigerung dieser Wachstumsfaktoren mag erklären, dass das TU-Volumen 21 Tage nach PBL im

Vergleich zu den Kontrollen nicht mehr signifikant reduziert war (vgl. *Barbaro B et al.* [2003], pp 98-102).

#### **4.2.1.3 Tumorvolumen und Lebergewicht**

Durch die PBL wurde das TU-Volumen nach 14 Tagen signifikant auf <20% der Kontrolltumoren reduziert. Im Einklang mit einer gesteigerten Proliferation der TU-Zellen und einer gesteigerten Expression von Wachstumsfaktoren war das TU-Volumen 21 Tage nach PBL im Vergleich zu den Kontrollen nicht mehr signifikant reduziert. Gleichzeitig kam es zu einer Hypertrophie der Restleber (vgl. *Beal IK et al.* [2006], pp 473-478). Diese ist nach Elias et al. (vgl. *Elias D et al.* [1999], pp 784-788) langsamer als das TU-Wachstum in einem Zeitraum von 34 Tagen. Barbaro et al. konnten in der Wachstumsgeschwindigkeit von TU und Restleber hingegen keinen Unterschied feststellen (vgl. *Barbaro B et al.* [2003], pp 98-102).

#### **4.2.1.4 Apoptotischer und nekrotischer Zelltod**

Interessanterweise bewirkte die PBL nach 14 Tagen eine im Vergleich zu den Kontrollen hoch signifikant gesteigerte Apoptoserate von sowohl TU-Zellen als auch Hepatozyten. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Helling et al. (vgl. *Helling TS et al.* [1999], pp 70-78), die eine gesteigerte Apoptoserate nach transienter Okklusion der Lebergefäße im Schweinmodell zeigen konnten. Die Rate an Peritonealkarzinose und Lungenmetastasen wurde durch die PBL nicht beeinflusst.

#### **4.2.1.5 Zellproliferation**

Interessanterweise bewirkte die PBL nach 14 Tagen eine im Vergleich zu den Kontrollen hoch signifikant gesteigerte Proliferationsrate von sowohl TU-Zellen als auch Hepatozyten. Dies mag zusammen mit einer gesteigerten Expression von Wachstumsfaktoren erklären, dass das TU-Volumen 21 Tage nach PBL im Vergleich zu den Kontrollen nicht mehr signifikant reduziert ist.

#### **4.2.1.6 Zusammenfassung**

Nach PBL induziert die Regeneration der initial atrophierten Leber im Verlauf eine gesteigerte Angiogenese, welche das initial stark verzögerte Wachstum kolorektaler Lebermetastasen kompensatorisch beschleunigt. Ursächlich hierfür ist wohl der Umbau der Mikrozirkulation im Zusammenhang mit einer gesteigerten Proliferation sowohl in der Leber als auch in den Metastasen.

### 4.3 Schlussfolgerung

Somit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass die PBL initial ein mikrozykulatorisches Versagen und eine Gewebehypoxie im portalblutentzogenen Leberlappen induziert. Dies ist mit einer HABR verbunden, die eine Arterialisierung mit Normalisierung der Gewebeoxygenierung, eNOS-Expression und mikrovaskulärem Umbau zur Folge hat. Die frühe mikrozykulatorische Dysfunktion muss als Grund für die Leberatrophie angesehen werden, während die anschließende Wiederherstellung der mikrovaskulären Perfusion wahrscheinlich den Trigger der Zellproliferation darstellt, was sich durch Gewebereparatur und hepatischer Regeneration zeigt. Nach PBL induziert die Regeneration der initial atrophierten Leber im Verlauf eine kompensatorisch gesteigerte Angiogenese, welche das initial stark verzögerte Wachstum kolorektaler Lebermetastasen kompensatorisch beschleunigt. Ursächlich hierfür ist wohl der Umbau der Mikrozykulation im Zusammenhang mit einer gesteigerten Proliferation sowohl in der Leber als auch in den Metastasen.

### 4.4 Perspektive

Diese Studie liefert erstmals detaillierte Informationen über die Auswirkungen der PBL zum einen auf den ligierten Leberlappen und zum anderen auf das TU-Wachstum im ligierten Leberlappen. Im ligierten Leberlappen bewirkt die PBL nur initial ein mikrozykulatorisches Versagen mit Atrophie. Dies ist gefolgt von

- einer Wiederherstellung des hilären portalen Blutflusses durch eine HABR,
- einem mikrovaskulären Umbau,
- einer parenchymatösen Normoxygenierung und
- einer hepatozellulären Proliferation.

Als Folge dessen zeigt sich bei Betrachtung der Auswirkungen der PBL auf das TU-Wachstum im ligierten Leberlappen, dass es in der ersten Phase zu einem anfänglich reduzierten Wachstum kommt. Im weiteren Zeitverlauf innerhalb von 21 Tagen wird das TU-Wachstum aber kompensatorisch beschleunigt.

Abschließend stellt sich die Frage, ob und inwieweit die PBL für den klinischen Gebrauch geeignet ist. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann man die PBL als effektive Methode zur Steigerung der Resektionsrate von primär nichtresektablen Lebermetastasen in einem zeitlich begrenzten Rahmen sehen. Ähnliches konnte auch für die Pfortaderembolisation gezeigt werden (vgl. *Jaeck D et al.* [2004], pp 1037-1051). Elias et al. (vgl. *Elias D et al.* [2002], pp 294-299) konnten für die Pfortaderembolisation zeigen, dass die 5-Jahresüberlebensrate von primär em-

bolisierten verglichen mit primär operierten Patienten nicht verschieden ist. Um für den Patienten ein Benefit zu erzielen, muss der Zeitpunkt der Resektion nach PBL genau geplant werden. Ferner muss in dem dazwischen liegenden Zeitintervall engmaschig der Status der TU-Größe mittels bildgebenden Verfahren kontrolliert werden. Im klinischen Alltag wird in der hiesigen Allgemein Chirurgie ein Zeitraum von maximal vier Wochen gewählt.

Ferner bestehen noch enorme Möglichkeiten, die PBL beziehungsweise die Pfortaderembolisation auch in Kombination mit anderen Verfahren, wie z.B. selektiver intra-arterieller Chemotherapie (vgl. *Selzner N et al.* [2006], pp 587-592) oder Knochenmarksstammzellen (vgl. *Fürst G et al.* [2007], pp 171-179), zum Einsatz kommen zu lassen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Abdalla EK, Hicks ME, Vauthey JN (2001) Portal Vein Embolization: Rationale, Technique and Future Prospects. *The British Journal of Surgery* 88: 165-175; zitiert als: *Abdalla EK et al.* [2001]
2. Adams HA, Werner C (1997) Vom Razemat zum Eutomer: (S)-Ketamin. Renaissance einer Substanz? *Der Anaesthesist* 46: 1026-1042; zitiert als: *Adams HA, Werner C* [1997]
3. Almond NE, Wheatley AM (1992) Measurement of Hepatic Perfusion in Rats by Laser Doppler Flowmetry. *The American Journal of Physiology* 262: G203-G209; zitiert als: *Almond NE, Wheatley AM* [1992]
4. Ames A 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G (1968) Cerebral Ischemia. II. The No-Reflow Phenomenon. *The American Journal of Pathology* 52: 437-453; zitiert als: *Ames A et al.* [1968]
5. Aprahamian M, Freund Y (2004) Anatomie viscérale abdominale du rat. Eigenverlag: Freund Y, Aprahamian M, Strasbourg; zitiert als: *Aprahamian M, Freund Y* [2004]
6. Araki T, Yamamoto A, Yamada M (1987) Accurate Determination of DNA Content in Single Cell Nuclei Stained with Hoechst 33258 Fluorochrome at High Salt Concentration. *Histochemistry* 87: 331-338; zitiert als: *Araki T et al.* [1987]
7. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (2003) Lebermetastasen. In: Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien der Deutschen Krebsgesellschaft zbd der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. <http://www.leitlinien.org>, Zugriff: 14.05.2008 (autorisiert für die elektronische Publikation durch die Deutsche Krebsgesellschaft/Deutsche Gesellschaft für Chirurgie); zitiert als: *AWMF* [2003]
8. 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. *Journal of Surgical Research* 45: 314-319; zitiert als: *Arii S et al.* [1988]
9. Arvidsson D, Svensson H, Haglund U (1988) Laser-Doppler Flowmetry for Estimating Liver Blood Flow. *The American Journal of Physiology* 254: G471-G476; zitiert als: *Arvidsson D et al.* [1988]
10. Assy N, Minuk GY (1997) Liver Regeneration: Methods for Monitoring and Their Applications. *Journal of Hepatology* 26: 945-952; zitiert als: *Assy N, Minuk GY* [1997]

11. Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, Cederna JP (1985) Influence of Oxygen-Derived Free Radical Scavengers on Ischemic Livers. *Transplantation* 40: 584-590; zitiert als: *Atalla SL et al.* [1985]
12. Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F (1995) Kinetics of White Blood Cell Staining by Intravascular Administration of Rhodamine 6G. *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental* 15: 85-91; zitiert als: *Baatz H et al.* [1995]
13. Babbs CF, Salaris SC, Turek JJ. (1991) Cytochemical Studies of Hydrogen Peroxide Generation in Postischemic Hepatocytes. *The American Journal of Physiology* 260: H123-H129; zitiert als: *Babbs CF et al.* [1991]
14. Baier P, Wolf-Vorbeck G, Hempel S, Hopt UT, von Dobschuetz E (2006) Effect of Liver Regeneration after Partial Hepatectomy and Ischemia-Reperfusion on Expression of Growth Factor Receptors. *World Journal of Gastroenterology* 12: 3835-3840; zitiert als: *Baier P et al.* [2006]
15. Barbaro B, Di Stasi C, Nuzzo G, Vellone M, Giuliante F, Marano P (2003) Pre-operative Right Portal Vein Embolization in Patients with Metastatic Liver Disease. *Metastatic Liver Volumes after RPVE. Acta Radiologica* 44: 98-102; zitiert als: *Barbaro B et al.* [2003]
16. Beal IK, Anthony S, Papadopoulou A, Hutchins R, Fusai G, Begent R, Davies N, Tibballs J, Davidson B (2006) Portal Vein Embolisation Prior to Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases and the Effects of Periprocedure Chemotherapy. *The British Journal of Radiology* 79: 473-478; zitiert als: *Beal IK et al.* [2006]
17. Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, Lacombe F (1994) A Flow Cytometric Method Using Hoechst 33342 and Propidium Iodide for Simultaneous Cell Cycle Analysis and Apoptosis Determination in Unfixed Cells. *Cytometry* 17: 59-65; zitiert als: *Belloc F et al.* [1994]
18. Bereiter-Hahn J, Seipel KH, Vöth M, Ploem JS (1983) Fluorimetry of Mitochondria in Cells Vitally Stained with DASPMI or Rhodamine 6 GO. *Cell Biochemistry and Function* 1: 147-155; zitiert als: *Bereiter-Hahn J et al.* [1983]
19. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW (1978) Optimization of Methods for Aspartate Aminotransferase and Alanine Aminotransferase. *Clinical Chemistry* 24: 58-73; zitiert als: *Bergmeyer HU et al.* [1978]
20. Bilodeau M, Aubry MC, Houle R, Burnes PN, Éthier C (1999) Evaluation of Hepatocyte Injury Following Partial Ligation of the Left Portal Vein. *Journal of Hepatology* 30: 29-37; zitiert als: *Bilodeau M et al.* [1999]

21. 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; zitiert als: *Bloch EH* [1955]
22. Blum HE (2005) Hepatocellular Carcinoma: Therapy and Prevention. *World Journal of Gastroenterology* 11: 7391-7400; zitiert als: *Blum HE* [2005]
23. Boese-Landgraf J, Bauknecht KJ, Häring R (1997) Chirurgische Onkologie. In: Häring R, Zilch H (Hrsg.) *Chirurgie*. 4. Aufl. Walter de Gruyter, Berlin New York, S 220-237; zitiert als: *Boese-Landgraf J et al.* [1997]
24. Bohrer SL, Rogers EL, Koehler RC, Traystman RJ (1981) Effect of Hypovolemic Hypotension and Laparotomy on Splanchnic and Hepatic Arterial Blood flow in Dogs. *Current Surgery* 38: 325-328; zitiert als: *Bohrer SL et al.* [1981]
25. 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; zitiert als: *Bouwens L et al.* [1986]
26. Bradpiece HA, Benjamin IS, Halevy A, Blumgart LH (1987) Major Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastases. *The British Journal of Surgery* 74: 324-326; zitiert als: *Bradpiece HA et al.* [1987]
27. Brinkley BR, Cox SM (1978) Double Fluorescent Staining for the Separate Demonstration of Chromosomes and Microtubules in Mitotic Cells *in Vitro*. *Stain Technology* 53: 345-349; zitiert als: *Brinkley BR, Cox SM* [1978]
28. Brissaud E, Sabourin C (1883) Sur la constitution lobulaire du foie et les voies de la circulation sanguine intra-hépatique. *Comptes rendus des séances et mémoires de la Société de Biologie et de ses Filiales* 5: 757-762; zitiert als: *Brissaud E, Sabourin C* [1883]
29. Broelsch CE, Knoefel WT, Gundlach M, Malago M, Frilling A, Rogiers X (1997) Chirurgische Therapie primärer und sekundärer Lebertumoren. *Praxis: Schweizerische Rundschau für Medizin* 86: 91-93
30. Broering DC, Hillert C, Krupski G, Fischer L, Mueller L, Achilles EG, Schulte am Esch J, Rogiers X (2002) Portal Vein Embolization vs. Portal Vein Ligation for Induction of Hypertrophy of the Future Liver Remnant. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 6: 905-913; zitiert als: *Broering DC et al.* [2002]
31. Bruch HP, Schiedeck T (1997) Kolon und Rektum. In: Häring R, Zilch H (Hrsg.) *Chirurgie*. 4. Aufl. Walter de Gruyter, Berlin New York, S 565-601; zitiert als: *Bruch HP, Schiedeck T* [1997]

32. Buerge T, Weiss T (2004) Handling and Restraint. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 517-526; zitiert als: *Buerge T, Weiss T* [2004]
33. Bumm R, Harder Y (2006) Kolon. In: Siewert JR (Hrsg.) *Chirurgie*. Springer, Berlin et al., S 612-634; zitiert als: *Bumm R, Harder Y* [2006]
34. Burkhardt M, Vollmar B, Menger MD (1998) *In vivo* Analysis of Hepatic NADH Fluorescence. Methodological Approach to Exclude Ito-Cell Vitamin A-Derived Autofluorescence. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 454: 83-89; zitiert als: *Burkhardt M et al.* [1998]
35. Burt AD, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P (1993) Morphologic Investigation of Sinusoidal Cells. *Seminars in Liver Disease* 13: 21-38; zitiert als: *Burt AD et al.* [1993]
36. Campra JL, Reynolds TB (1982) The Hepatic Circulation. In: Arias I, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (eds) *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, pp 627-645; zitiert als: *Campra JL, Reynolds TB* [1982]
37. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ (1990) Neutrophil-Mediated Microvascular Dysfunction in Postischemic Canine Skeletal Muscle: Role of Granulocyte Adherence. *Circulation Research* 66: 1436-1444; zitiert als: *Carden DL et al.* [1990]
38. Chance B, Cohen P, Jöbsis F, Schoener B (1962) Intracellular Oxidation-reduction State *in vivo*. The microfluorometry of Pyridine Nucleotide Gives a Continuous Measurement of the Oxidation State. *Science* 137: 499-508; zitiert als: *Chance B et al.* [1962]
39. Chijiwa K, Saiki S, Noshiro H, Kameoka N, Nakano K, Tanaka M (2000) Effect of Preoperative Portal Vein Embolization on Liver Volume and Hepatic Energy Status of the Nonembolized Liver Lobe in Humans. *European Surgical Research* 32: 94-99; zitiert als: *Chijiwa K et al.* [2000]
40. Clemens MG, McDonagh PF, Chaudry IH, Baue AE (1985) Hepatic Microcirculatory Failure after Ischemia and Reperfusion: Improvement with ATP-MgCl<sub>2</sub> Treatment. *The American Journal of Physiology* 248: H804-H811; zitiert als: *Clemens MG et al.* [1985]
41. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M (1994) Microvascular Vasomotion: Origin of Laser Doppler Flux Motion. *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental* 14: 151-158; zitiert als: *Colantuoni A et al.* [1994]

42. 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; zitiert als: *Connor HD et al.* [1992]
43. Cozzi PJ, Englund R, Morris DL (1995) Cryotherapy Treatment of Patients with Hepatic Metastases from Neuroendocrine Tumors. *Cancer* 76: 501-509; zitiert als: *Cozzi PJ et al.* [1995]
44. Dan C, Wake K (1985) Modes of Endocytosis of Latex Particles in Sinusoidal Endothelial and Kupffer Cells of Normal and Perfused Rat Liver. *Experimental Cell Research* 158: 75-85; zitiert als: *Dan C, Wake K* [1985]
45. de Bruyn PPH, Robertson RC, Farr RS (1950) *In vivo* Affinity of Diaminoacridines for Nuclei. *The Anatomical Record* 108: 279-307; zitiert als: *de Bruyn PPH et al.* [1950]
46. del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein 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; zitiert als: *del Zoppo GJ et al.* [1991]
47. Derenzini E, Di Battista M, Di Marco MC, Dell'arte S, Astorino M, Bertolini S, Brandi G, Biasco G (2006) Treatment of Colorectal Cancer Liver Metastases. *Minerva Medica* 97: 107-119; (Originaltitel: Il trattamento delle metastasi epatiche da cancro del colon-retto); zitiert als: *Derenzini E et al.* [2006]
48. Dietzmann K, Letko G, Sokolowski A (1987) Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells: Evidence from Studies with Rhodamine 6 G as Fluorescent Probe. *Experimental Pathology* 31: 47-51; zitiert als: *Dietzmann K et al.* [1987]
49. Duebener LF, Sakamoto T, Hatsuoka S, Stamm C, Zurakowski D, Vollmar B, Menger MD, Schäfers HJ, Jones RA (2001) Effects of Hematocrit on Cerebral Microcirculation and Tissue Oxygenation During Deep Hypothermic Bypass. *Circulation* 18: 260-264; zitiert als: *Duebener LF et al.* [2001]
50. Duling BR, Berne RM (1970) Longitudinal Gradients in Periarterial Oxygen Tension: A Possible Mechanism for the Participation of Oxygen in Local Regulation of Blood Flow. *Circulation Research* 27: 669-678; zitiert als: *Duling BR, Berne RM* [1970]
51. Eger W (1954) Zur Pathologie des zentralen und peripheren Funktionsfeldes des Leberläppchens. *Zentralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie* 91: 255-267; zitiert als: *Eger W* [1954]

52. Eguchi H, McCuskey PA, McCuskey RS (1991) Kupffer Cell Activity and Hepatic Microvascular Events after Acute Ethanol Ingestion in Mice. *Hepatology* 13: 751-757; zitiert als: *Eguchi H et al.* [1991]
53. Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B (2004) Impact of Leukocytes and Platelets in Mediating Hepatocyte Apoptosis in a Rat Model of Systemic Endotoxemia. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 286: G769-G776; zitiert als: *Eipel C et al.* [2004]
54. Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, Menger MD, Neuhaus P, Vollmar B (2005) Ischemic Preconditioning Impairs Liver Regeneration in Extended Reduced-Size Livers. *Annals of Surgery* 241: 477-484; zitiert als: *Eipel C et al.* [2005]
55. El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B (2004) Improvement of Rat Liver Graft Quality by Pifithrin- $\alpha$ -Mediated Inhibition of Hepatocyte Necroapoptosis. *Hepatology* 39: 1553-1562; zitiert als: *El-Gibaly AM et al.* [2004]
56. Elias D, de Baère T, Roche A, Ducreux M, Leclere J, Lasser P (1999) During Liver Regeneration Following Right Portal Embolization the Growth Rate of Liver Metastases is More Rapid than that of the Liver Parenchyma. *British Journal of Surgery* 86: 784-788; zitiert als: *Elias D et al.* [1999]
57. Elias D, Ouellet JF, de Baère T, Lasser P, Roche A (2002) Preoperative Selective Portal Vein Embolization before Hepatectomy for Liver Metastases: Long-Term Results and Impact on Survival. *Surgery* 131: 294-299; zitiert als: *Elias D et al.* [2002]
58. Ellis CG, Tymi K, Groom AC (1986) Computer-Assisted Analysis of Video Images: a New Tool for Microvascular Measurement. In: Baker CH, Nastuk WL (eds) *Microcirculatory Technology*. Academic Press, Orlando, pp 229-244; zitiert als: *Ellis CG et al.* [1986]
59. Ensinger H (2005) Narkose - Inhalationsanästhetika und Injektionsanästhetika. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. 9. Aufl. Urban & Fischer, München Jena, S 263-282; zitiert als: *Enginger H* [2005]
60. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, Menger MD, Ullrich A, Vajkoczy P (2004) Combined Inhibition of VEGF- and PDGF-Signaling Enforces Tumor Vessel Regression by Interfering with Pericyte-Mediated Endothelial Cell Survival Mechanisms. *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal* 18: 338-340; zitiert als: *Erber R et al.* [2004]

61. Erhardt W, Geissdörfer K, Schindele M, Stephan M, Blümel G (1986) Die Anästhesie bei Hasen- und Nagetieren. *Kleintierpraxis* 31: 333-342; zitiert als: *Erhardt W et al.* [1986]
62. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blümel G (1984) A Comparative Study with Various Anesthetics in Mice (Pentobarbitone, Ketamine-Xylazine, Carfentanyl-Ethomidate). *Research in Experimental Medicine* 184: 159-169; zitiert als: *Erhardt W et al.* [1984]
63. Eriksson E, Lisander B (1972) Low Flow States in the Microvessels of Skeletal Muscle in Cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 86: 202-210; zitiert als: *Eriksson E, Lisander B* [1972]
64. Fahimi HD (1982) Sinusoidal Endothelial Cells and Perisinusoidal Fat-Storing Cells: Structure and Function. In: Arias I, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (eds) *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, pp 495-506; zitiert als: *Fahimi HD* [1982]
65. Farkouh EF, Daniel AM, Beaudoin JG, MacLean LD (1971) Predictive Value of Liver Biochemistry in Acute Hepatic Ischemia. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 132: 832-838; zitiert als: *Farkouh EF et al.* [1971]
66. 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. *The Journal of Clinical Investigation* 51: 118-126; zitiert als: *Flores J et al.* [1972]
67. Fong Y, Blumgart LH (2002) Hepatic Resection. In: Souba WW, Fink MP, Jurkovich GJ, Kaiser KR, Pearce WH, Pemberton JH, Soper NJ (eds) *ACS Surgery: Principles and Practice*. WebMD Inc., Danbury, pp 1-19; zitiert als: *Fong Y, Blumgart LH* [2002]
68. Frederiks WM, Myagkaya GL, Bosch KS, Fronik GM, van Veen H, Vogels IMC, James J (1983) The Value of Enzyme Leakage for the Prediction of Necrosis in Liver Ischemia. *Histochemistry* 78: 459-472; zitiert als: *Frederiks WM et al.* [1983]
69. Fukuta K (2004) Collection of Body Fluids. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 543-554; zitiert als: *Fukuta K* [2004]
70. Fürst G, Schulte am Esch J, Poll LW, Hosch SB, Fritz LB, Klein M, Godehardt E, Krieg A, Wecker B, Stoldt V, Stockschläder M, Eisenberger CF, Mödder U, Knoefel WT (2007) Portal Vein Embolization and Autologous CD133+ Bone Marrow Stem Cells for Liver Regeneration: Initial Experience. *Radiology* 243: 171-179; zitiert als: *Fürst G et al.* [2007]

71. Galandi D, Antes G (2004) Radiofrequency Thermal Ablation versus Other Interventions for Hepatocellular Carcinoma (Review). The Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue 2, Art. No. CD003046.pub2. DOI: 10.1002/14651858. CD003046.pub2.; zitiert als: *Galandi D, Antes G* [2004]
72. Garcia-Villar R, Toutain PL, Alvinerie M (1981) The Pharmacokinetics of Xylazine Hydrochloride: an Interspecific Study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 4: 87-92; zitiert als: *Garcia-Villar R et al.* [1981]
73. Gelman SI (1976) Disturbances in Hepatic Blood Flow during Anesthesia and Surgery. *Archives of Surgery* 111: 881-883; zitiert als: *Gelman SI* [1976]
74. Goto M, Kawano S, Yoshihara H, Takei Y, Hijioka T, Fukui H, Matsunaga T, Oshita M, Kashiwagi T, Fusamoto H, Kamasa T, Sato N (1992) Hepatic Tissue Oxygenation as a Predictive Indicator of Ischemia-Reperfusion Liver Injury. *Hepatology* 15: 432-437; zitiert als: *Goto M et al.* [1992]
75. 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; zitiert als: *Gouma DJ et al.* [1986]
76. Greenway CV, Stark RD (1971) Hepatic Vascular Bed. *Physiological Reviews* 51: 23-65; zitiert als: *Greenway CV, Stark RD* [1971]
77. Griffen WO Jr, Levitt DG, Ellis CJ (1970) Intrahepatic Distribution of Hepatic Blood Flow: Single-Input Studies. *The American Journal of Physiology* 218: 1474-1479; zitiert als: *Griffen WO et al.* [1970]
78. Grisham MB, Everse J, Janssen HF (1988) Endotoxemia and Neutrophil Activation *in vivo*. *The American Journal of Physiology* 254: H1017-H1022; zitiert als: *Grisham MB et al.* [1988]
79. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN (1986) Xanthine Oxidase and Neutrophil Infiltration in Intestinal Ischemia. *The American Journal of Physiology* 251: G567-G574; zitiert als: *Grisham MB et al.* [1986]
80. Gumucio JJ, Miller DL (1982) Liver Cell Heterogeneity. In: Arias I, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (eds) *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, pp 647-661; zitiert als: *Gumucio JJ, Miller DL* [1982]
81. 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; zitiert als: *Gumucio JJ et al.* [1981]

82. Håkansson L, Håkansson A, Morales O, Thorelius L, Warfving T (1997) Spherex (Degradable Starch Microspherer) Chemo-occlusion - Enhancement of Tumor Drug Concentration and Therapeutic Efficacy: An Overview. *Seminars in Oncology* 24: S6-100-S6-109; zitiert als: *Håkansson L et al.* [1997]
83. Halwachs-Baumann G (2006) *Labormedizin. Klinik - Praxis - Fallbeispiele.* Springer, Berlin et al.; zitiert als: *Halwachs-Baumann G* [2006]
84. Hanzon F (1952) Liver Cell Secretion under Normal and Pathologic Conditions Studied by Fluorescence Microscopy on Living Rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 28 Suppl. 1: 1-268; zitiert als: *Hanzon F* [1952]
85. Harlemann JH (2004) The Mouse in Preclinical Safety Studies. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse.* Elsevier, Amsterdam et al., pp 111-114; zitiert als: *Harlemann JH* [2004]
86. Heinrich S, Jochum W, Graf R, Clavien PA (2006) Partial Vein Ligation and Partial Hepatectomy Differentially Influence Growth of Intrahepatic Metastasis and Liver Regeneration in Mice. *Journal of Hepatology* 45: 35-42; zitiert als: *Heinrich S et al.* [2006]
87. Hellebrekers LJ (Hrsg.) (2000) *Schmerz und Schmerztherapie beim Tier.* Schlütersche, Hannover; zitiert als: *Hellebrekers LJ* [2000]
88. Helling TS, Edwards CA, Helling TS Jr, Chang CC, Hodges MC, Dhar A, Van-Way C (1999) Hepatic Apoptotic Activity following Transient Normothermic Inflow Occlusion and Reperfusion in the Swine Model. *Journal of Surgical Research* 86: 70-78; zitiert als: *Helling TS et al.* [1999]
89. Herber SC, Otto G, Woerns M, Moench C, Kanzler S, Junginger T, Schneider J, Schuchmann M, Kummer I, Manzl N, Düber C, Pitton MB (2007) Sequentielle transarterielle Chemoembolisation (TACE) des hepatozellulären Karzinoms (HCC) - Erfahrungsbericht eines einzelnen Zentrums über 5 Jahre. *RöFo: Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und Nuklearmedizin* 179: 289-299; zitiert als: *Herber SC et al.* [2007]
90. Heriot AG, Karanjia ND (2002) A Review of Techniques for Liver Resection. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 84: 371-380; zitiert als: *Heriot AG, Karanjia ND* [2002]
91. Herold G und Mitarbeiter (2005) *Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung.* Eigenverlag: Herold G, Köln; zitiert als: *Herold G et al.* [2005]
92. Higuti T, Niimi S, Saito R, Nakasima S, Ohe T, Tani I, Yoshimura T (1980) Rhodamine-6G, Inhibitor of Both H<sup>+</sup>-Ejections from Mitochondria Energized with ATP and with Respiratory Substrates. *Biochimica et Biophysica Acta* 593: 463-467; zitiert als: *Higuti T et al.* [1980]

93. Hillert C, Lenk C, Mueller L, Krupski G, Rogiers X, Broering DC (2003) Chirurgische Therapie von Lebermetastasen: Protektive Maßnahmen bei kleiner Restleber. *Chirurgische Gastroenterologie Interdisziplinär* 19: 340-348; zitiert als: *Hillert C et al.* [2003]
94. Hiraoka Y, Sedat JW, Agard DW (1987) The Use of a Charge-Coupled Device for Quantitative Optical Microscopy of Biological Structures. *Science* 238: 36-41; zitiert als: *Hiraoka Y et al.* [1987]
95. Hohenberger W (1999) Leber. In: Berchtold R, Hamelmann H, Peiper HJ, Trentz O (Hrsg.) *Chirurgie. Studienausgabe der 3. Aufl.* Urban & Fischer, München Jena, S 613-621; zitiert als: *Hohenberger W* [1999]
96. Hölscher AH, Schleimer K, Beckurts KT, Brochhagen HG, Stippel DL (2003) Präliminare Pfortaderligatur rechts vor erweiterter Hemihepatektomie bei synchronen kolorektalen Lebermetastasen. *Der Chirurg* 74: 860-865; zitiert als: *Hölscher AH et al.* [2003]
97. Holtzhauer M (1997) *Biochemische Labormethoden*. 3. Aufl. Springer, Berlin et al.; zitiert als: *Holtzhauer M* [1997]
98. Houdebine LM (2004) The Mouse as an Animal Model for Human Diseases. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 97-110; zitiert als: *Houdebine LM* [2004]
99. Huang JY, Yang WZ, Li JJ, Jiang N, Zheng QB (2006) Portal Vein Embolization Induces Compensatory Hypertrophy of Remnant Liver. *World Journal of Gastroenterology* 12: 408-414; zitiert als: *Huang JY et al.* [2006]
100. Humphrey JA, Sedensky MM, Morgan PG (2002) Understanding Anesthesia: Making Genetic Sense of the Absence of Senses. *Human Molecular Genetics* 11: 1241-1249; zitiert als: *Humphrey JA et al.* [2002]
101. Inoue M, Sawada T, Uchima Y, Kimura K, Nishihara T, Tanaka H, Yashiro M, Yamada N, Ohira M, Hirakawa K (2005) Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) Gene Transfection Inhibits the Liver Metastasis of Pancreatic Cancer by Preventing Angiogenesis. *Oncology Reports* 14: 1445-1451; zitiert als: *Inoue M et al.* [2005]
102. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences (ed) (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington; zitiert als: *NIH* [1996]
103. Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR (1975) Capillary Flow Velocity Measurements *in vivo* and *in situ* by Television Methods. *Microvascular Research* 10: 165-179; zitiert als: *Intaglietta M et al.* [1975]

104. Intaglietta M, Tompkins WR (1973) Microvascular Measurements by Video Image Shearing and Splitting. *Microvascular Research* 5: 309-312; zitiert als: *Intaglietta M, Tompkins WR* [1973]
105. Jaeck D, Bachellier P, Nakano H, Oussoultzoglou E, Weber JC, Wolf P, Greget M (2003) One or Two-Stage Hepatectomy Combined with Portal Vein Embolization for Initially Nonresectable Colorectal Liver Metastases. *The American Journal of Surgery* 185: 221-229; zitiert als: *Jaeck D et al.* [2003]
106. Jaeck D, Oussoultzoglou E, Rosso E, Greget M, Weber JC, Bachellier P (2004) A Two-Stage Hepatectomy Procedure Combined with Portal Vein Embolization to Achieve Curative Resection for Initially Unresectable Multiple and Bilobar Colorectal Liver Metastases. *Annals of Surgery* 240: 1037-1051; zitiert als: *Jaeck D et al.* [2004]
107. Jaeschke H, Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A (2001) Reply to: Clavien PA, Rudiger HA, Selzner M. Mechanism of Hepatocyte Death After Ischemia: Apoptosis Versus Necrosis. *Hepatology* 33: 1555-1557; zitiert als: *Jaeschke H et al.* [2001]
108. Jerome SN, Smith CW, Korthuis RJ (1993) CD18-Dependent Adherence Reactions Play an Important Role in the Development of the No-Reflow Phenomenon. *The American Journal of Physiology* 264: H479-H483; zitiert als: *Jerome SN et al.* [1993]
109. Jilge B, Kunz E (2004) Circadian Rhythm of the Mouse. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 311-325; zitiert als: *Jilge B, Kunz E* [2004]
110. Jones EA, Summerfield JA (1982) Kupffer Cells. In: Arias I, Popper H, Schachter D, Shafritz DA (eds) *The Liver: Biology and Pathobiology*. Raven Press, New York, pp 507-523; zitiert als: *Jones EA, Summerfield JA* [1982]
111. Kameoka N, Chijiwa K, Saiki S, Tanaka M (1998) Advantage of Preoperative Portal Vein Occlusion for Hepatectomy that Exceeds Portal Vein Occluded Lobes. *Surgery* 123: 545-553; zitiert als: *Kameoka N et al.* [1998]
112. 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. *Journal of Biochemistry* 91: 1349-1356; zitiert als: *Kamiike W et al.* [1982]
113. Kato T, Yasui K, Hirai T, Kanemitsu Y, Mori T, Sugihara K, Mochizuki H, Yamamoto J (2003) Therapeutic Results for Hepatic Metastasis of Colorectal Cancer with Special Reference to Effectiveness of Hepatectomy: Analysis of Prognostic Factors for 763 Cases Recorded at 18 Institutions. *Diseases of the Colon and Rectum* 46 (10 Suppl): S22-S31; zitiert als: *Kato T et al.* [2003]

114. Keller GA, West MA, Cerra FB, Simmons RL (1985) Multiple Systems Organ Failure. Modulation of Hepatocyte Protein Synthesis by Endotoxin Activated Kupffer Cells. *Annals of Surgery* 201: 87-95; zitiert als: *Keller GA et al.* [1985]
115. Kiernan F (1833) The Anatomy and Physiology of the Liver. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* 123: 711-770; zitiert als: *Kiernan F* [1833]
116. Klauke H, Minor T, Vollmar B, Isselhard W, Menger MD (1998) Microscopic Analysis of NADH Fluorescence during Aerobic and Anaerobic Liver Preservation Conditions: A Noninvasive Technique for Assessment of Hepatic Metabolism. *Cryobiology* 36: 108-114; zitiert als: *Klauke H et al.* [1998]
117. Kleine FD (1965) Die diagnostische Bedeutung des De-Ritis-Quotienten. *Deutsche Zeitschrift für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten* 25: 355-362; zitiert als: *Kleine FD* [1965]
118. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB (1974) The "No-Reflow" Phenomenon after Temporary Coronary Occlusion in the Dog. *The Journal of Clinical Investigation* 54: 1496-1508; zitiert als: *Kloner RA et al.* [1974]
119. Knisley MH (1939) Microscopic Observation of the Circulatory Conditions in Living Frog Liver Lobules. *Anatomical Record* 73: 269-270; zitiert als: *Knisley MH* [1939]
120. Knisley MH, Harding F, Debacker H (1957) Hepatic Sphincters. *Science* 125: 1023-1025; zitiert als: *Knisley MH et al.* [1957]
121. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Sugiyama S, Ozawa T, Takagi H (1991) Mechanism and Prevention of Ischemia-Reperfusion-Induced Liver Injury in Rats. *The Journal of Surgical Research* 51: 240-244; zitiert als: *Kobayashi H et al.* [1991]
122. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA (1999) Endothelial Cell and Hepatocyte Deaths Occur by Apoptosis after Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Liver. *Transplantation* 67: 1099-1105; zitiert als: *Kohli V et al.* [1999]
123. Kokudo N, Tada K, Seki M, Ohta H, Azekura K, Ueno M, Ohta K, Yamaguchi T, Matsubara T, Takahashi T, Nakajima T, Muto T, Ikari T, Yanagisawa A, Kato Y (2001) Proliferative Activity of Intrahepatic Colorectal Metastases After Preoperative Hemihepatic Portal Vein Embolization. *Hepatology* 34: 267-272; zitiert als: *Kokudo N et al.* [2001]

124. Kollmar O (2000) Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung am Lebertransplantat des Schweins nach warmer und kalter Ischämie sowie nach normothermer extrakorporaler Leberperfusion. Diss. Humboldt-Universität, Berlin; zitiert als: *Kollmar O* [2000]
125. Kollmar O, Corsten M, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2007) Portal Branch Ligation Induces a Hepatic Arterial Buffer Response, Microvascular Remodeling, Normoxygenation and Cell Proliferation in Portal Blood-Deprived Liver Tissue. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 292: G1534-G1542; zitiert als: *Kollmar O et al.* [2007]
126. Kollmar O, Scheuer C, Menger MD, Schilling MK (2006) Macrophage Inflammatory Protein-2 Promotes Angiogenesis, Cell Migration, and Tumor Growth in Hepatic Metastasis. *Annals of Surgical Oncology* 13: 263-275; zitiert als: *Kollmar O et al.* [2006]
127. Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2004) Experimental Liver Metastasis: Standards for Local Cell Implantation to Study Isolated Tumor Growth in Mice. *Clinical & Experimental Metastasis* 21: 453-460; zitiert als: *Kollmar O et al.* [2004]
128. Komatsu H, Koo A, Guth PH (1990) Leukocyte Flow Dynamics in the Rat Liver Microcirculation. *Microvascular Research* 40: 1-13; zitiert als: *Komatsu H et al.* [1990]
129. 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; zitiert als: *Konno H et al.* [1992]
130. Koo A (1986) Liver Microvascular Flow in Rats: Quantitation by Laser Doppler Flowmetric Technique and Effects of Sodium Dehydrocholate. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1: 347-358; zitiert als: *Koo A* [1986]
131. Koo A, Liang IYS (1977) Blood Flow in Hepatic Sinusoids in Experimental Hemorrhagic Shock in the Rat. *Microvascular Research* 13: 315-325; zitiert als: *Koo A, Liang IYS* [1977]
132. Kretz FJ, Schäffer J (2006) Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie. 4. Aufl. Springer, Berlin et al.; zitiert als: *Kretz FJ, Schäffer J* [2006]
133. Kriegelstein CF, Senninger N (2006) Leber. In: Siewert JR (Hrsg.) Chirurgie. Springer, Berlin et al., S 671-682; zitiert als: *Kriegelstein CF, Senninger N* [2006]
134. Krinke GJ (2004) Normative Histology of Organs. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 133-166; zitiert als: *Krinke GJ* [2004]

135. Kunz R, Brune HA, Ziegler U, Marzinger M, Beger HG (1991) Ischämie/Reperfusionsschaden der Leber durch freie Radikale - direkter Nachweis mittels Elektronenspinresonanz (ESR). *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 376: 139-142; zitiert als: *Kunz R et al.* [1991]
136. Kusaka K, Imamura H, Tomiya T, Takayama T, Makuuchi M (2006) Expression of Transforming Growth Factor- $\alpha$  and - $\beta$  in Hepatic Lobes after Hemihepatic Portal Vein Embolization. *Digestive Diseases and Sciences* 51: 1404-1142; zitiert als: *Kusaka K et al.* [2006]
137. Lambotte L, Li B, Leclercq I, Sempoux C, Saliez A, Horsmans Y (2000) The Compensatory Hyperplasia (Liver Regeneration) Following Ligation of a Portal Branch is Initiated before the Atrophy of the Deprived Lobes. *Journal of Hepatology* 32: 940-945; zitiert als: *Lambotte L et al.* [2000]
138. Lapointe DS, Olsen MS (1989) Alteration of Hepatic Tissue Spaces by Platelet-Activating Factor and Phenylephrine. *Hepatology* 9: 278-284; zitiert als: *Lapointe DS, Olsen MS* [1989]
139. Largiadèr F, Metzger U (1999) Allgemeine chirurgische Onkologie und TNM-System. In: Berchtold R, Hamelmann H, Peiper HJ, Trentz O (Hrsg.) *Chirurgie. Studienausgabe der 3. Aufl.* Urban & Fischer, München Jena, S 257-264; zitiert als: *Largiadèr F, Metzger U* [1999]
140. Laschke MW (2002) Physiologische Angiogenese im ovariellen Zyklus der Follikulogenese und Lutealphase. Eine experimentelle *in vivo* Studie am Syrischen Goldhamster. Diss. Universität des Saarlandes, Saarbrücken; zitiert als: *Laschke MW* [2002]
141. Latt SA, Stetten G (1976) Spectral Studies on 33258 Hoechst and Related Bisbenzimidazole Dyes Useful for Fluorescent Detection of Desoxyribonucleic Acid Synthesis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 24: 24-33; zitiert als: *Latt SA, Stetten G* [1976]
142. Lautt WW (1985) Mechanism and Role of Intrinsic Regulation of Hepatic Arterial Blood Flow: Hepatic Arterial Buffer Response. *The American Journal of Physiology* 249: G549-G556; zitiert als: *Lautt WW* [1985]
143. Lebrec D, Blanchet L, Lacroix S (1981) Measurement of Hepatic Blood Flow in the Rat Using Fractional Clearance of Indocyanine Green and Colloidal Radiogold. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 391: 353-354; zitiert als: *Lebrec D et al.* [1981]
144. Lemasters JJ, DiGuiseppi J, Nieminen AL, Herman B (1987) Blebbing, Free  $Ca^{2+}$  and Mitochondrial Membrane Preceding Cell Death in Hepatocytes. *Nature* 325: 78-81; zitiert als: *Lemasters JJ et al.* [1987]

145. Lепенies J, Bühling KJ, Witt K (2004) Verdauung. In: Bühling KJ, Lепенies J, Witt K (Hrsg.) Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie. 3. Aufl. Urban & Fischer, München Jena, S 219-266; zitiert als: *Lепенies J et al.* [2004]
146. Li X, Benjamin IS, Naftalin R, Alexander B (2003) Location and Function of Intrahepatic Shunts in Anaesthetised Rats. *Gut* 52: 1339-1346; zitiert als: *Li X et al.* [2003]
147. Li X, Feng GS, Zheng CS, Zhuo CK, Liu X (2004) Expression of Plasma Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Hepatocellular Carcinoma and Effect of Transcatheter Arterial Chemoembolization Therapy on Plasma Vascular Endothelial Growth Factor Level. *World Journal of Gastroenterology* 10: 2878-2882; zitiert als: *Li X et al.* [2004]
148. Lindert KA, Caldwell-Kenkel JC, Nukina S, Lemasters JJ, Thurman RG (1992) Activation of Kupffer Cells on Reperfusion Following Hypoxia: Particle Phagocytosis in a Low-Flow, Reflow Model. *The American Journal of Physiology* 262: G345-G350; zitiert als: *Lindert KA et al.* [1992]
149. Liu LX, Zhang WH, Jiang HC (2003) Current Treatment for Liver Metastases from Colorectal Cancer. *World Journal of Gastroenterology* 9: 193-200; zitiert als: *Liu LX et al.* [2003]
150. Lode HN, Xiang R, Becker JC, Gillies SD, Reisfeld RA (1998) Immunocytokines: a Promising Approach to Cancer Immunotherapy. *Pharmacology & Therapeutics* 80: 277-292; zitiert als: *Lode HN et al.* [1998]
151. Loud AV (1968) A Quantitative Stereological Description of the Ultrastructure of Normal Rat Liver Parenchymal Cells. *Journal of Cell Biology* 37: 27-46; zitiert als: *Loud AV* [1968]
152. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275; zitiert als: *Lowry OH et al.* [1951]
153. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M (2003) Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen. 15. Aufl. Thieme, Stuttgart New York; zitiert als: *Lüllmann H et al.* [2003]
154. Lushbough CH, Moline SW (1961) Improved Terminal Bleeding Method. *Proceedings of the Animal Care Panel* 11: 305-308; zitiert als: *Lushbough CH, Moline SW* [1961]
155. MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF (2002) Cancer Spread and Micrometastasis Development: Quantitative Approaches for *in vivo* Models. *BioEssays* 24: 885-893; zitiert als: *MacDonald IC et al.* [2002]

156. MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC (1992) Evidence for Kupffer Cell Migration along Liver Sinusoids, from High-Resolution *in vivo* Microscopy. *The American Journal of Physiology* 263: G17-G23; zitiert als: *MacPhee PJ et al.* [1992]
157. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, Takayama T, Kosuge T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H, Ozaki H (1990) Preoperative Portal Embolization to Increase Safety of Major Hepatectomy for Hilar Bile Duct Carcinoma: a Preliminary Report. *Surgery* 107: 521-527; zitiert als: *Makuuchi M et al.* [1990]
158. Malafosse R, Penna C, Sa Cunha A, Nordlinger B (2001) Surgical Management of Hepatic Metastases from Colorectal Malignancies. *Annals of Oncology* 12: 887-894; zitiert als: *Malafosse R et al.* [2001]
159. Marotto ME, Thurman RG, Lemasters JJ (1988) Early Midzonal Cell Death during Low-Flow Hypoxia in the Isolated, Perfused Rat Liver: Protection by Allopurinol. *Hepatology* 8: 585-590; zitiert als: *Marotto ME et al.* [1988]
160. Marzi I, Knee J, Menger MD, Harbauer G, Bühren V (1991) Hepatic Microcirculatory Disturbances due to Portal Vein Clamping in the Orthotopic Rat Liver Transplantation Model. *Transplantation* 52: 432-436; zitiert als: *Marzi I et al.* [1991]
161. 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; zitiert als: *Mayadas TN et al.* [1993]
162. McCulloch P (1994) Nonsurgical Treatment of Liver Metastases. *Current Opinion in General Surgery*: 151-155; zitiert als: *McCulloch P* [1994]
163. McCuskey RS (1966) A Dynamic and Static Study of Hepatic Arterioles and Hepatic Sphincters. *The American Journal of Anatomy* 119: 455-477; zitiert als: *McCuskey RS* [1966]
164. McCuskey RS (2003) Microscopy of Living Cells, Tissues, and Organs. In: Driggers RG (ed) *Encyclopedia of Optical Engineering*. Volume 2, CRC Press, London, pp 1319-1328; zitiert als: *McCuskey RS* [2003]
165. McCuskey RS, Reilly FD, McCuskey PA, Dimlich RV (1979) *In vivo* Microscopy of the Hepatic Microvascular System. In: Lewis DH (ed) *Bibliotheca Anatomica*, No. 18, 10th European Conference on Microcirculation, Cagliari, 1978. S. Karger, Basel et al., pp 73-76; zitiert als: *McCuskey RS et al.* [1979]

166. McCuskey RS, Urbaschek R, McCuskey PA, Urbaschek B (1983) *In vivo* Microscopic Observations of the Responses of Kupffer Cells and the Hepatic Microcirculation to Mycobacterium bovis BCG Alone and in Combination with Endotoxin. *Infection and Immunity* 42: 362-367; zitiert als: *McCuskey RS et al.* [1983]
167. McKeown CMB, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PRC, 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; zitiert als: *McKeown CMB et al.* [1988]
168. Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and Perspectives of Intravital Microscopy - Bridge over from *in vitro* to *in vivo*. *Immunology Today* 14: 519-522; zitiert als: *Menger MD, Lehr HA* [1993]
169. Menger MD, Marzi I, Messmer K (1991) *In vivo* Fluorescence Microscopy for Quantitative Analysis of the Hepatic Microcirculation in Hamsters and Rats. *European Surgical Research* 23: 158-169; zitiert als: *Menger MD et al.* [1991]
170. Menger MD, Messmer K (1993) Can Laser Doppler Flowmetry detect Spontaneous Arteriolar Vasomotion? *Progress in Applied Microcirculation* 20: 27-33; zitiert als: *Menger MD, Messmer K* [1993]
171. Minor T, Klauke H, Vollmar B, Isselhard W, Menger MD (1997) Biophysical Aspects of Liver Aeration by Vascular Persufflation with Gaseous Oxygen. *Transplantation* 63: 1843-1846; zitiert als: *Minor T et al.* [1997]
172. Minor T, Vollmar B, Klauke H, Isselhard W, Menger MD (1998) Differentieller Einfluß von Konservierungslösungen (UW vs HTK) auf mitochondrialen Redoxstatus und Energiestoffwechsel während Leberischämie unter Sauerstoffpersufflation. In: Herfarth C, Rothmund M, Hartel W (Hrsg.) *Chirurgisches Forum '98 für experimentelle und klinische Forschung*. Springer, Berlin et al., S 377-381; zitiert als: *Minor T et al.* [1998]
173. Mitchell A, Dass CR, Sun LQ, Khachigian LM (2004) Inhibition of Human Breast Carcinoma Proliferation, Migration, Chemoinvasion and Solid Tumour Growth by DNazymes Targeting the Zinc Finger Transcription Factor EGR-1. *Nucleic Acids Research* 32: 3065-3069; zitiert als: *Mitchell A et al.* [2004]
174. Miyagawa S, Kawasaki S (2001) Präoperative portale Embolisation zur Induktion von Leberhypertrophie. *Der Chirurg* 72: 770-774; zitiert als: *Miyagawa S, Kawasaki S* [2001]
175. Mueller L, Broering DC, Meyer J, Vashist Y, Goettsche J, Wilms C, Rogiers X (2002) The Induction of the Immediate-Early-Genes Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during Liver Regeneration in Surgical Models is Related to Increased Portal Flow. *Journal of Hepatology* 37: 606-612; zitiert als: *Mueller L et al.* [2002]

176. Mueller L, Goettsche J, Abdulgawad A, Vashist YK, Meyer J, Wilms C, Hillert C, Rogiers X, Broering DC (2005) Tumor Growth-Promoting Cellular Host Response during Liver Atrophy after Portal Occlusion. *Liver International* 25: 994-1001; zitiert als: *Mueller L et al.* [2005]
177. Mueller L, Grotelueschen R, Meyer J, Vashist YK, Abdulgawad A, Wilms C, Hillert C, Rogiers X, Broering DC (2003) Sustained Function in Atrophying Liver Tissue after Portal Branch Ligation in the Rat. *Journal of Surgical Research* 114: 146-155; zitiert als: *Mueller L et al.* [2003]
178. Müller L, Götttsche J, Abdulgawad A, Wilms C, Rogiers X, Broering DC (2004) Gesteigerte Expression pro-angiogenetischer Faktoren während Leberatrophy nach Pfortaderastligatur der Ratte - potentielle Bedeutung für malignes Wachstum. In: Ulrich B, Jauch KW, Bauer H (Hrsg.) *Chirurgisches Forum 2004 für experimentelle und klinische Forschung*. Springer, Berlin et al., S 317-318; zitiert als: *Müller L et al.* [2004]
179. Mullin EJ, Metcalfe MS, Maddern GJ (2005) How Much Liver Resection Is Too Much? *The American Journal of Surgery* 190: 87-97; zitiert als: *Mullin EJ et al.* [2005]
180. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T (2004) Differentiation and Function of Kupffer Cells. *Medical Electron Microscopy* 37: 16-28; zitiert als: *Naito M et al.* [2004]
181. Nakajima Y, Takagi H, Sohara N, Sato K, Kakizaki S, Nomoto K, Suzuki H, Suehiro T, Shimura T, Asao T, Kuwano H, Mori M, Nishikura K (2006) Living-Related Liver Transplantation for Multiple Liver Metastases from Rectal Carcinoid Tumor: A Case Report. *World Journal of Gastroenterology* 12: 1805-1809; zitiert als: *Nakajima Y et al.* [2006]
182. Naumann A, Dennis J, Staudenmaier R, Rotter N, Aigner J, Ziegelaar B, Happ T, Rasp G, Caplan AI (2002) Adulte mesenchymale Stammzellen - neue Möglichkeiten der Gewebezüchtung für die plastisch-rekonstruktive Chirurgie. *Laryngorhinootologie* 81: 521-527; zitiert als: *Naumann A et al.* [2002]
183. Niederberger M, Ginés P, Martin PY, Tsai P, Morris K, McMurtry I, Schrier RW (1996) Comparison of Vascular Nitric Oxide Production and Systemic Hemodynamics in Cirrhosis versus Prehepatic Portal Hypertension in Rats. *Hepatology* 24: 947-951; zitiert als: *Niederberger M et al.* [1996]
184. Nijsen JF, van het Schip AD, Hennink WE, Rook DW, Rijk PP, de Klerk JM (2002) Advances in Nuclear Oncology: Microspheres for Internal Oncology: Microspheres for Internal Radionuclide Therapy of Liver Tumours. *Current Medicinal Chemistry* 9: 73-82; zitiert als: *Nijsen JF et al.* [2002]

185. 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; zitiert als: *Nishimura T et al.* [1986]
186. Nöthiger F, Birrer S (1999) Kolon, Rektum und Anus. In: Berchtold R, Hamelmann H, Peiper HJ, Trentz O (Hrsg.) *Chirurgie. Studienausgabe der 3. Aufl.* Urban & Fischer, München Jena, S 553-573; zitiert als: *Nöthiger F, Birrer S* [1999]
187. Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M, Weller M, Jäättelä M (2002) Eradication of Glioblastoma, and Breast and Colon Carcinoma Xenografts by Hsp70 Depletion. *Cancer Research* 62: 7139-7142; zitiert als: *Nylandsted J et al.* [2002]
188. o.V. (2008) Lebermetastasen bei Darmkrebs. <http://www.carcinos.de/de/behandlung/metastasenbehandlung/lebermetastasen/>, Zugriff: 14.05.2008; zitiert als: *o.V.* [2008]
189. O'Toole D, Maire F, Ruzniewski P (2003) Ablative Therapies for Liver Metastases of Digestive Endocrine Tumours. *Endocrine-Related Cancer* 10: 463-468; zitiert als: *O'Toole D et al.* [2003]
190. Oda M, Azuma T, Watanabe N, Nishizaki Y, Nishida J, Ishi K, Suzuki H, Komatsu H, Tsukada N, Tsuchiya M (1990) Regulatory Mechanisms of the Hepatic Microcirculation - Involvement of the Contraction and Dilatation of Sinusoids and Sinusoidal Endothelial Fenestrae. *Progress in Applied Microcirculation* 17: 103-128; zitiert als: *Oda M et al.* [1990]
191. Oettle H, Dörken B (2003) Tumoren von Leber und Gallenwegen. In: Dietel M, Dudenkamp, J, Suttrop N (Hrsg.) *Harrisons Innere Medizin* 1. 15. Aufl. ABW Wissenschaftsverlag, Berlin Leiben, S 649-652 (deutsche Ausgabe von: Harrison's Principles of Internal Medicine); zitiert als: *Oettle H, Dörken B* [2003]
192. Ohkawa M, Chaudry IH, Clemens MG, Baue AE (1984) ATP-MgCl<sub>2</sub> Produces Sustained Improvement in Hepatic Mitochondrial Function and Blood Flow after Hepatic Ischemia. *Journal of Surgical Research* 37: 226-234; zitiert als: *Ohkawa M et al.* [1984]
193. Ormerod MG, Sun XM, Snowden RT, Davies R, Fearnhead H, Cohen GM (1993) Increased Membrane Permeability of Apoptic Thymocytes: A Flow Cytometric Study. *Cytometry* 14: 595-602; zitiert als: *Ormerod MG et al.* [1993]
194. Otto K (2004) Anesthesia, Analgesia and Euthanasia. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 555-569; zitiert als: *Otto K* [2004]

195. Parks RW, Garden OJ (2001) Liver Resection for Cancer. *World Journal of Gastroenterology* 7: 766-771; zitiert als: *Parks RW, Garden OJ* [2001]
196. Phillips HJ (1973) Dye Exclusion Test for all Viability. In: Kruse PF (ed) *Tissue Culture*. Academic Press, New York, pp 406-408; zitiert als: *Phillips HJ* [1973]
197. Picard C, Starkel P, Sempoux C, Saliez A, Lebrun V, Horsmans Y (2004) Molecular Mechanisms of Apoptosis in the Liver of Rats after Portal Branch Ligation with and without Retrorsine. *Laboratory Investigation* 84: 618-628; zitiert als: *Picard C et al.* [2004]
198. Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Bensard DD, Anderson BO, Banerjee A (1992) Liver Injury is a Reversible Neutrophil-Mediated Event Following Gut Ischemia. *Archives of Surgery* 127: 175-179; zitiert als: *Poggetti RS et al.* [1992]
199. Post S, Gonzalez AP, Palma P, Rentsch M, Stiehl A, Menger MD (1992) Assessment of Hepatic Phagocytic Activity by *in vivo* Microscopy after Liver Transplantation in the Rat. *Hepatology* 16: 803-809; zitiert als: *Post S et al.* [1992]
200. 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; zitiert als: *Post S et al.* [1993a]
201. Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD (1993b) Hepatic Reperfusion Injury Following Cold Ischemia in the Rat: Potentials of Quantitative Analysis by *in vivo* Fluorescence Microscopy. *Progress in Applied Microcirculation* 19: 152-166; zitiert als: *Post S et al.* [1993b]
202. Preuss R, Renz-Polster H, Wellhoehner P, Brüning A (2004) Leber, Galle, Pankreas. In: Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (Hrsg.) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. Aufl. Urban & Fischer, München Jena, S 624-726; zitiert als: *Preuss R et al.* [2004]
203. Ramadori G (1991) The Stellate Cell (Ito-Cell, Fat-Storing Cell, Lipocyte, Perisinusoidal Cell) of the Liver. *New Insights into Pathophysiology of an Intriguing Cell*. *Virchows Archiv B, Cell Pathology Including Molecular Pathology* 61: 147-158; zitiert als: *Ramadori G* [1991]
204. Rappaport AM (1958) The Structural and Functional Unit in the Human Liver (Liver Acinus). *The Anatomical Record* 130: 673-689; zitiert als: *Rappaport AM* [1958]

205. Rappaport AM (1960) Betrachtungen zur Pathophysiologie der Leberstruktur. *Klinische Wochenschrift* 38: 561-577; zitiert als: *Rappaport AM* [1960]
206. Rappaport AM (1976) The Microcirculatory Acinar Concept of Normal and Pathological Hepatic Structure. *Beiträge zur Pathologie* 157: 215-243; zitiert als: *Rappaport AM* [1976]
207. Rappaport AM (1977) Microcirculatory Units in the Mammalian Liver. Their Arterial and Portal Components. *Bibliotheca Anatomica* 16: 116-120; zitiert als: *Rappaport AM* [1977]
208. Reich DL, Silvay G (1989) Ketamine: An Update on the First Twenty-Five Years of Clinical Experience. *Canadian Journal of Anaesthesia* 36: 186-197; zitiert als: *Reich DL, Silvay G* [1989]
209. Reichardt P, Schlag PM (2003) Maligne Tumoren des Gastrointestinaltraktes. In: Dietel M, Dudenkamp, J, Suttrop N (Hrsg.) *Harrisons Innere Medizin* 1. 15. Aufl. ABW Wissenschaftsverlag, Berlin Leiben, S 639-647 (deutsche Ausgabe von: *Harrison's Principles of Internal Medicine*); zitiert als: *Reichardt P, Schlag PM* [2003]
210. Renz-Polster H (2004) Magen-Darm-Trakt. In: Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J (Hrsg.) *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3. Aufl. Urban & Fischer, München Jena, S 504-622; zitiert als: *Renz-Polster H* [2004]
211. Richter S (1998) Zur Leukozyten-Stase in Lebersinusoiden. Eine intravital-mikroskopische Untersuchung der hepatischen Mikrozyklulation während post-ischämischer Reperfusion. Diss. Universität des Saarlandes, Saarbrücken; zitiert als: *Richter S* [1998]
212. Richter S, Vollmar B, Mücke I, Post S, Menger MD (2001) Hepatic Arteriolo-Portal Venular Shunting Guarantees Maintenance of Nutritional Microvascular Supply in Hepatic Arterial Buffer Response of Rat Liver. *Journal of Physiology* 531: 193-201; zitiert als: *Richter S et al.* [2001]
213. Riede UN (Hrsg.) unter Mitarbeit von Köhler G et al. (1998) *Taschenatlas der allgemeinen Pathologie: pathologische Prinzipien - assoziierte Krankheiten - Folgezustände*. Thieme, Stuttgart New York; zitiert als: *Riede UN et al.* [1998]
214. Ring D, Hubble R, Kirschner M (1982) Mitosis in a Cell with Multiple Centrioles. *The Journal of Cell Biology* 94: 549-556; zitiert als: *Ring D et al.* [1982]
215. Ringe B, Lorf T, Döpkins K, Canelo R (2001) Treatment of Hepatic Metastases from Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors: Role of Liver Transplantation. *World Journal of Surgery* 25: 697-699; zitiert als: *Ringe B et al.* [2001]

216. Ritskes-Hoitinga M (2004) Nutrition of Laboratory Mice. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 463-479; zitiert als: *Ritskes-Hoitinga M* [2004]
217. Robert Koch-Institut (Hrsg.) (2006) *Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. Eigenverlag: Robert Koch-Institut, Berlin; zitiert als: *Robert Koch-Institut* [2006]
218. Rocheleau B, Éthier C, Houle R, Huet PM, Bilodeau M (1999) Hepatic Artery Buffer Response Following Left Portal Vein Ligation: its Role in Liver Tissue Homeostasis. *The American Journal of Physiology* 277: G1000-G1007; zitiert als: *Rocheleau B et al.* [1999]
219. Sartori P, Mussi C, Angelini C, Crippa S, Caprotti R, Uggeri F (2005) Palliative Management Strategies of Advanced Gastrointestinal Carcinoid Neoplasms. *Langenbecks Archives of Surgery* 390: 391-396; zitiert als: *Sartori P et al.* [2005]
220. Sato T (1987) New Method for Measurement of Hepatic Blood Flow in the Rat Using Thermodilution Method. *Circulatory Shock* 21: 31-37; zitiert als: *Sato T* [1987]
221. Schäfer T, Scheuer C, Roemer K, Menger MD, Vollmar B (2003) Inhibition of p53 Protects Liver Tissue Against Endotoxin-Induced Apoptotic and Necrotic Cell Death. *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal* 17: 660-667; zitiert als: *Schäfer T et al.* [2003]
222. Schärfe J (2004) Elektronische Zellvitalitätsbestimmung mit dem klassischen Trypanblau Assay. *BIOspektrum* 10: 334-336; zitiert als: *Schärfe J* [2004], S 335
223. Schiebler TH, Schmidt W (Hrsg.) unter Mitarbeit von Arnold G et al. (2002) *Anatomie: Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Nachdruck der 8. Aufl. Springer, Berlin et al.; zitiert als: *Schiebler TH, Schmidt W* [2002]
224. 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; zitiert als: *Schmeling DJ et al.* [1989]
225. Schmidt E, Schmidt FW (1987) Enzyme Release. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 25: 525-540; zitiert als: *Schmidt E, Schmidt FW* [1987]
226. Schmidt E, Schmidt FW (1988) Glutamate Dehydrogenase: Biochemical and Clinical Aspects of an Interesting Enzyme. *Clinica Chimica Acta* 43: 43-56; zitiert als: *Schmidt E, Schmidt FW* [1988]

227. Schmidt FW, Schmidt E (1989) Diagnostic Use of Enzyme Release. Diagnostic Application of Mitochondrial Enzymes and Isoenzymes. *Clinica Chimica Acta* 185: 253-264; zitiert als: *Schmidt FW, Schmidt E* [1989]
228. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W (1989) Rapid Detection of Octamer Binding Proteins with 'Mini-Extracts', Prepared from a Small Number of Cells. *Nucleic Acids Research* 17: 6419; zitiert als: *Schreiber E et al.* [1989]
229. Schweitzer D, Hammer M, Anders R, Doebbecke T, Schenke S (2004) Veränderungen der Autofluoreszenzlebensdauer am Fundus nach Sauerstoffprovokation. *Ophthalmologie* 101: 66-72; zitiert als: *Schweitzer D et al.* [2004]
230. Seiyama A, Chen SS, Imai T, Kosaka H, Shiga T (1994) Assessment of Rate of O<sub>2</sub> Release from Single Hepatic Sinusoids in Rats. *The American Journal of Physiology* 267: G944-G951; zitiert als: *Seiyama A et al.* [1994]
231. Selzner N, Pestalozzi BC, Kadry Z, Selzner M, Wildermuth S, Clavien PA (2006) Downstaging Colorectal Liver Metastases by Concomitant Unilateral Portal Vein Ligation and Selective Intra-Arterial Chemotherapy. *British Journal of Surgery* 93: 587-592; zitiert als: *Selzner N et al.* [2006]
232. Sheen AJ, Poston GJ, Sherlock DJ (2002) Cryotherapeutic Ablation of Liver Tumours. *British Journal of Surgery* 89: 1396-1401; zitiert als: *Sheen AJ et al.* [2002]
233. Sherman IA, Fisher MM (1986) Hepatic Transport of Fluorescent Molecules: *in vivo* Studies Using Intravital TV Microscopy. *Hepatology* 6: 444-449; zitiert als: *Sherman IA, Fisher MM* [1986]
234. Sherman IA, Pappas SC, Fisher MM (1990) Hepatic Microvascular Changes Associated with Development of Liver Fibrosis and Cirrhosis. *The American Journal of Physiology* 258: H460-H465; zitiert als: *Sherman IA et al.* [1990]
235. Shimada H, Tanaka K, Matsuo K, Togo S (2006) Treatment for Multiple Bilobar Liver Metastases of Colorectal Cancer. *Langenbeck's Archives of Surgery* 391: 130-142; zitiert als: *Shimada H et al.* [2006]
236. Shimizu S (2004) Routes of Administration. In: Hedrich HJ, Bullock G (eds) *The Laboratory Mouse*. Elsevier, Amsterdam et al., pp 527-542; zitiert als: *Shimizu S* [2004]
237. Shin M, Hishikawa Y, Izumi S, Koji T (2002) Southwestern Histochemistry as a Molecular Histochemical Tool for Analysis of Expression of Transcription Factors: Application to Paraffin-Embedded Tissue Sections. *Medical Electron Microscopy* 35: 217-224; zitiert als: *Shin M et al.* [2002]

238. Shiratori Y, Kiriyaama H, Fukushi Y, Nagura T, Takada H, Hai K, Kamii K (1994) Modulation of Ischemia-Reperfusion-Induced Hepatic Injury by Kupffer Cells. *Digestive Diseases and Sciences* 39: 1265-1272; zitiert als: *Shiratori Y et al.* [1994]
239. Silver IA (1977) Ion Fluxes in Hypoxic Tissues. *Microvascular Research* 13: 409-420; zitiert als: *Silver IA* [1977]
240. Sirichindakul B, Nonthasoot B, Thienpaitoon P, Nivatvongs S, Janchai A (2005) Preoperative Portal Vein Embolization in Hepatobiliary Tract Malignancy: an Experience at King Chulalongkorn Memorial Hospital. *Journal of the Medical Association of Thailand* 88: 1115-1119; zitiert als: *Sirichindakul B et al.* [2005]
241. Slotta JE (2006) Reduktion der Endotoxin-induzierten hepatischen Mikrozirkulationsstörung und Organdysfunktion durch Präkonditionierung mit CpG-Oligodeoxynukleotiden (CpG-ODN). Diss. Universität des Saarlandes, Saarbrücken; zitiert als: *Slotta JE* [2006]
242. Spieker T (2006) Karzinogenese und Staging beim kolorektalen Karzinom: Vom Adenom zum Karzinom. In: Colombo-Benkman M, Senninger N (Hrsg.) *Chirurgie von Kolon und Rektum*. Lehmanns Media, Berlin, S 1-10; zitiert als: *Spieker T* [2006]
243. Stangl R, Altendorf-Hofmann A, Charnley RM, Scheele J (1994) Factors Influencing the Natural History of Colorectal Liver Metastases. *Lancet* 343: 1405-1410; zitiert als: *Stangl R et al.* [1994]
244. Steidl T, Göbel T (2005) Anästhesiologie. In: Steidl T, Röcken F (Hrsg.) *Praxisleitfaden Kleintierassistenz*. Band 2: Operationsassistenz. Schlütersche, Hannover, S 1-78; zitiert als: *Steidl T, Göbel T* [2005]
245. Stern MD (1975) *In vivo* Evaluation of Coherent Light Scattering. *Nature* 254: 56-58; zitiert als: *Stern MD* [1975]
246. Suematsu M, Oda M, Suzuki H, Kaneko H, Watanabe N, Furusho T, Masushige S, Tsuchiya M (1993) Intravital and Electron Microscopic Observation of Ito Cells in Rat Hepatic Microcirculation. *Microvascular Research* 46: 28-42; zitiert als: *Suematsu M et al.* [1993]
247. Suh KW, Piantadosi S, Yazdi HA, Pardoll DM, Brem H, Choti MA (1999) Treatment of Liver Metastases from Colon Carcinoma with Autologous Tumor Vaccine Expressing Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Journal of Surgical Oncology* 72: 218-224; zitiert als: *Suh KW et al.* [1999]

248. Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, Lozonschi L, Motoi F, Yamauchi JI, Matsuno S, Shibahara S, Abraham NG (2003) Heme Oxygenase-1 Accelerates Tumor Angiogenesis of Human Pancreatic Cancer. *Angiogenesis* 6: 15-24; zitiert als: *Sunamura M et al.* [2003]
249. Tacke S (2003) Anästhesie und perioperative Überwachung des Patienten. In: Kramer M (Hrsg.) Kompendium der Allgemeinen Veterinärchirurgie. Schlütersche, Hannover, S 144-160; zitiert als: *Tacke S* [2003]
250. Takamura K, Tsuchida K, Miyake H, Tashiro S, Sugino H (2005) Activin and Activin Receptor Expression Changes in Liver Regeneration in Rat. *Journal of Surgical Research* 126: 3-11; zitiert als: *Takamura K et al.* [2005]
251. Takayama T, Makuuchi M (2004) Preoperative Portal Vein Embolization: Is It Useful? *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 11: 17-20; zitiert als: *Takayama T, Makuuchi M* [2004]
252. Takei Y, Marzi I, Gao WS, Gores GJ, Lemasters JJ, Thurman RG (1991) Leukocyte Adhesion and Cell Death Following Orthotopic Liver Transplantation in the Rat. *Transplantation* 51: 959-965; zitiert als: *Takei Y et al.* [1991]
253. Tanaka S, Akaike T, Fang J, Beppu T, Ogawa M, Tamura F, Miyamoto Y, Maeda H (2003) Antiapoptotic Effect of Heme Oxygenase-1 Induced by Nitric Oxide in Experimental Solid Tumour. *British Journal of Cancer* 88: 902-909; zitiert als: *Tanaka S et al.* [2003]
254. te Koppele JM, Thurman RG (1990) Phagocytosis by Kupffer Cells Predominates in Pericentral Regions of the Liver Lobule. *The American Journal of Physiology* 259: G814-G821; zitiert als: *te Koppele JM, Thurman RG* [1990]
255. Tenland T, Salerud EG, Nilsson GE, Oberg PA (1983) Spatial and Temporal Variations in Human Skin Blood Flow. *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental* 2: 81-90; zitiert als: *Tenland T et al.* [1983]
256. Theodorakis NG, Wang YN, Skill NJ, Metz MA, Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV (2003) The Role of Nitric Oxide Synthase Isoforms in Extrahepatic Portal Hypertension: Studies in Gene-Knockout Mice. *Gastroenterology* 124: 1500-1508; zitiert als: *Theodorakis NG et al.* [2003]
257. Thompson JS, Brown SA, Khurdayan V, Zeynalzadedan A, Sullivan PG, Scheff SW (2002) Early Effects of Tribromoethanol, Ketamine/Xylazine, Pentobarbital, and Isoflurane Anesthesia on Hepatic and Lymphoid Tissue in ICR Mice. *Comparative Medicine* 52: 63-67; zitiert als: *Thompson JS et al.* [2002]
258. Tisch M, Bergenthal S, Maier H (2002) Genotoxische Wirkung von Pentachlorphenol und Lindan<sup>®</sup> auf humane Tonsillenschleimhautepithelien. *HNO* 50: 920-927; zitiert als: *Tisch M et al.* [2002]

259. Toussaint S (2006) Pharmakologisches Wissen - Intravenöse Narkotika. In: Kretz FJ, Teufel F (Hrsg.) Anästhesie und Intensivmedizin. Springer, Berlin et al., S 9-18; zitiert als: *Toussaint S* [2006]
260. Trampisch HJ, Windeler J (Hrsg.) (2000) Medizinische Statistik. 2. überarbeitete und aktualisierte Auflage, Springer, Berlin et al.; zitiert als: *Trampisch HJ, Windeler J* [2000]
261. Trarbach T, Lang H, Köhne CH, Schmitz S (2007) Lebermetastasen beim kolorektalem Karzinom. Vielfältige Therapieoptionen nutzen. Best Practice Onkologie 2: 26-37; zitiert als: *Trarbach T et al.* [2007]
262. Tung LC, Häring R (1997) Leber. In: Häring R, Zilch H (Hrsg.) Chirurgie. 4. Aufl. Walter de Gruyter, Berlin New York, S 662-674; zitiert als: *Tung LC, Häring R* [1997]
263. Uemura T, Miyazaki M, Hirai R, Matsumoto H, Ota T, Ohashi R, Shimizu N, Tsuji T, Inoue Y, Namba M (2000) Different Expression of Positive and Negative Regulators of Hepatocyte Growth in Growing and Shrinking Hepatic Lobes after Portal Vein Branch Ligation in Rats. International Journal of Molecular Medicine 5: 173-179; zitiert als: *Uemura T et al.* [2000]
264. Um SH, Nishida O, Tokubayashi M, Kimura F, Takimoto Y, Yoshioka H, Inque R, Kita T (1994) Hemodynamic Changes after Ligation of a Major Branch of the Portal Vein in Rats: Comparison with Rats with Portal Vein Constriction. Hepatology 19: 202-209; zitiert als: *Um SH et al.* [1994]
265. United Kindom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) (1998) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). British Journal of Cancer 77: 1-10; zitiert als: *UKCCCR* [1998]
266. Vogl TJ, Germer C, Mack MG (2001) Therapiestudie zu Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. Deutsches Ärzteblatt 98: A839; zitiert als: *Vogl TJ et al.* [2001]
267. Vogl TJ, Mack MG, Straub R, Roggan A, Felix R (1997) Percutaneous MRI-Guided Laser-Induced Thermotherapy for Hepatic Metastases for Colorectal Cancer. The Lancet 350: 29; zitiert als: *Vogl TJ et al.* [1997]
268. Vollmar B, Bauer C, Menger MD (2002) n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Enriched Diet Does not Protect from Liver Injury but Attenuates Mortality Rate in a Rat Model of Systemic Endotoxemia. Critical Care Medicine 30: 1091-1098; zitiert als: *Vollmar B et al.* [2002]

269. 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. *Microvascular Research* 54: 164-173; zitiert als: *Vollmar B et al.* [1997a]
270. Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K (1992) Blood Flow and Tissue Oxygen Pressures of Liver and Pancreas in Rats: Effects of Volatile Anesthetics and of Hemorrhage. *Anesthesia and Analgesia* 75: 421-430; zitiert als: *Vollmar B et al.* [1992]
271. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD (1994a) Hepatic Microcirculatory Perfusion Failure is a Determinant of Liver Dysfunction in Warm Ischemia-Reperfusion. *The American Journal of Pathology* 145: 1421-1431; zitiert als: *Vollmar B et al.* [1994a]
272. Vollmar B, Lang G, Menger MD, Messmer K (1994b) Hypertonic Hydroxyethyl Starch Restores Hepatic Microvascular Perfusion in Hemorrhagic Shock. *The American Journal of Physiology* 266: H1927-H1934; zitiert als: *Vollmar B et al.* [1994b]
273. Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K (1993) Die Mikrozirkulation der Leber im hämorrhagischen Schock der Ratte und ihre Bedeutung für Energiestoffwechsel und Funktion. *Zentralblatt für Chirurgie* 118: 218-225; zitiert als: *Vollmar B et al.* [1993]
274. Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K (1994c) Impact of Leukocyte-Endothelial Cell Interaction in Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *The American Journal of Physiology* 267: H786-H793; zitiert als: *Vollmar B et al.* [1994c]
275. 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. *Journal of Leukocyte Biology* 62: 710-718; zitiert als: *Vollmar B et al.* [1997b]
276. Vollmar B, Siegmund S, Menger MD (1998) An Intravital Fluorescence Microscopic Study of Hepatic Microvascular and Cellular Derangements in Developing Cirrhosis in Rats. *Hepatology* 27: 1544-1553; zitiert als: *Vollmar B et al.* [1998]
277. Wake K (1980) Perisinusoidal Stellate Cells (Fat-Storing Cells, Interstitial Cells, Lipocytes), Their Related Structure in and around the Liver Sinusoids, and Vitamin A-Storing Cells in Extrahepatic Organs. *International Review of Cytology* 66: 303-353; zitiert als: *Wake K* [1980]

278. Wang M, Bronte V, Chen PW, Gritz L, Panicali D, Rosenberg SA, Restifo NP (1995) Active Immunotherapy of Cancer with a Nonreplicating Recombinant Fowlpox Virus Encoding a Model Tumor-Associated Antigen. *The Journal of Immunology* 154: 4685-4692; zitiert als: *Wang M et al.* [1995]
279. Wanner GA, Mica L, Wanner-Schmid E, Kolb SA, Hentze H, Trentz O, Ertel W (1999) Inhibition of Caspase Activity Prevents CD95-mediated Hepatic Microvascular Perfusion Failure and Restores Kupffer Cell Clearance Capacity. *The FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal* 13: 1239-1248; zitiert als: *Wanner GA et al.* [1999]
280. Weber SM, Shi F, Heise C, Warner T, Mahvi DM (1999) Interleukin-12 Gene Transfer Results in CD8-Dependent Regression of Murine CT26 Liver Tumors. *Annals of Surgical Oncology* 6:186-194; zitiert als: *Weber SM et al.* [1999]
281. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J, Hartveit F, Moberg I, Eder M, Fenoglio-Preiser CM, Napier J, Horne CHW, Lopez MJ, Shaw-Dunn RI, Sugar J, Davies JD, Day DW, Harlos JP (1986) Haematogenous Metastatic Patterns in Colonic Carcinoma: an Analysis of 1541 Necropsies. *Journal of Pathology* 150: 195-203; zitiert als: *Weiss L et al.* [1986]
282. Welsch U (2003) *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer, München Jena; zitiert als: *Welsch U* [2003]
283. Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD (1999) Surface Cooling Inhibits Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Microvascular Perfusion Failure, Leukocyte Adhesion, and Apoptosis in the Striated Muscle. *Surgery* 126: 881-889; zitiert als: *Westermann S et al.* [1999]
284. Wheatley AM (1994) Does Laser-Doppler Flowmetry Provide a Quantitative Measure of Hepatic Perfusion? *The American Journal of Physiology* 266: G960-G962; zitiert als: *Wheatley AM* [1994]
285. Worden B, Yang XP, Lee TL, Bagain L, Yeh NT, Cohen JG, Van Waes C, Chen Z (2005) Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor Differentially Regulates Expression of Proangiogenic Factors Through Egr-1 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* 65: 7071-7080; zitiert als: *Worden B et al.* [2005]
286. Wortha HP, Adams J (1992) Die Rolle von Modellen in der Wissenschaft. In: Adams J (Hrsg.) *Einführung in die medizinische Biometrie*. Gustav Fischer, Jena, S 18-19; zitiert als: *Wortha HP, Adams J* [1992]

287. Xiong ZP, Yang SR, Liang ZY, Xiao EH, Yu XP, Zhou SK, Zhang ZS (2004) Association between Vascular Endothelial Growth Factor and Metastasis after Transcatheter Arterial Chemoembolization in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International* 3: 386-390; zitiert als: *Xiong ZP et al.* [2004]
288. Yamasaki M, Ikeda K, Nakatani K, Yamamoto T, Kawai Y, Hirohashi K, Kinoshita H, Kaneda K (1999) Phenotypical and Morphological Alterations to Rat Sinusoidal Endothelial Cells in Arterialized Livers after Portal Branch Ligation. *Archives of Histology and Cytology* 62: 401-411; zitiert als: *Yamasaki M et al.* [1999]
289. Yano H, Kinoshita S, Kira S (2004) Effects of Acute Exercise on the Phagocytosis of Kupffer Cells in Rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 182: 151-160; zitiert als: *Yano H et al.* [2004]
290. Yigitler C, Farges O, Kianmanesh R, Regimbeau JM, Abdalla EK, Belghiti J (2003) The Small Remnant Liver After Major Liver Resection: How Common and How Relevant? *Liver Transplantation* 9: S18-S25; zitiert als: *Yigitler C et al.* [2003]
291. Zeintl H, Tompkins WR, Messmer K, Intaglietta M (1986) Static and Dynamic Microcirculatory Video Image Analysis Applied to Clinical Investigations. *Progress in Applied Microcirculation* 11: 1-10; zitiert als: *Zeintl H et al.* [1986]
292. Zysk SP, Gebhard HH, Pellgahr C, Refior HJ, Plitz W, Meßmer K, Veihelmann A (2003) Inflammatorische Reaktion von Endoprothesen *in vivo*. Ein experimentelles Modell an der Maus. *Orthopäde* 32: 305-311; zitiert als: *Zysk SP et al.* [2003]

## 6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen herzlich danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt 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 ständige und stetige Förderung der Arbeit.

Mein persönlicher Dank gilt Herrn **Privatdozent Dr. med. Otto Kollmar**, Oberarzt an der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie der Universität des Saarlandes, der mich während der gesamten Zeit in besonderer Weise betreute. Herr Dr. Kollmar stand mir mit ständiger Hilfsbereitschaft sowohl bei der Versuchsplanung und -durchführung als auch bei der Analyse und Diskussion der Ergebnisse zur Seite. Zusammen mit Herrn Professor Menger hat er mich wissenschaftliches Arbeiten gelehrt und ermöglichte mir die Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen, auf die er mich ausgezeichnet vorbereitete.

Mein weiterer Dank gilt Frau **Dr. rer. med. Claudia Scheuer** für die Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen und Frau **Christina Marx** für die Unterstützung bei der Tumorzellaufbereitung. Ebenso danke ich Frau **Janine Becker** und Frau **Elisabeth Gluding** für die Hilfe bei der Aufarbeitung der Leberhistologien sowie ihre stetige Hilfsbereitschaft vor allem bei der Tierbeschaffung und -unterbringung. Des Weiteren möchte ich mich bei Frau **Kathrin Rupertus** und Herrn **Bastian Junker** bedanken, die mich mit viel Geduld und fachlicher Kompetenz in die Grundlagen der chirurgischen Präparation, Intravitalmikroskopie und Auswertung eingearbeitet haben.

Ein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Angestellten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, deren Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft mir immer wieder zuteil wurden.

Mein Dank gilt ebenfalls meiner Familie und meinen Freunden, die mich in meinem bisherigen Leben enorm unterstützt haben.

## 7 Lebenslauf

### Personalien

Name: Marcus Corsten  
Geburtsdatum: 06.09.1982  
Geburtsort: Braunschweig  
Eltern: Prof. Dr. Hans Corsten  
Hilde Corsten, geb. Dreeßen

### Schulische Ausbildung

1989 - 1993 Grundsschule Nassenfels/Bayern  
1993 - 1995 Katharinen-Gymnasium Ingolstadt  
1995 - 2002 Hohenstaufen-Gymnasium Kaiserslautern  
März 2002 Abitur  
01.04.2002 - Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz (Kreisverband  
31.01.2003 Kaiserslautern-Stadt)

### Universitäre Ausbildung

ab WS 2002/03 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes  
Herbst 2005 Physikum  
seit August 2004 Promotion am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes  
seit August 2007 Studentische Hilfskraft am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes

## 8 Publikationen

### Originalarbeiten

Kollmar O, Corsten M, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2007) Portal Branch Ligation Induces a Hepatic Arterial Buffer Response, Microvascular Remodeling, Normoxygenation and Cell Proliferation in Portal Blood-Deprived Liver Tissue. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 292: G1534-G1542

### Publizierte Abstracts

Corsten M, Kollmar O, Schilling MK, Vollmar B, Menger MD (2006) Portal Branch Ligation Induces Microvascular Remodeling, Hyperoxygenation and Cell Proliferation in Portal Blood-Deprived Liver Tissue. *European Surgical Research: Clinical and Experimental Surgery* 38 (suppl 1): 13

Kollmar O, Corsten M, Schilling MK, Menger MD (2006) Pfortaderastligatur induziert mikrovaskuläres Remodelling, Hyperoxygenierung und Zellproliferation im legerierten Leberlappen. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 44: DOI: 10.1055/s-2006-951145

Corsten M, Kollmar O, Scheuer C, Schilling MK, Menger MD (2006) Portal Branch Ligation Induces Microvascular Remodeling, Hyperoxygenation and Cell Proliferation in Portal Blood-Deprived Liver Tissue. *Langenbeck's Archives of Surgery* 391: 534

Corsten M, Kollmar O, Scheuer C, Schilling MK, Menger MD (2007) Portal Branch Ligation Reduces Initial Outgrowth of Colorectal Metastasis Followed by a Compensatory Angiogenic Response and Cell Proliferation. *Langenbeck's Archives of Surgery* 392: 805-806

Corsten M, Kollmar O, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2008) Die Pfortaderastligatur reduziert initial das Wachstum von Lebermetastasen durch Minderung der Mikroperfusion bewirkt jedoch darauffolgend eine gesteigerte Proliferation durch VEGF, HGF und TGF- $\alpha$  Expression. *Chirurgisches Forum* 37: 51-52

Corsten M, Kollmar O, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2008) Portal Branch Ligation Reduces Initial Outgrowth of Colorectal Metastasis followed by a Late Compensatory Angiogenic and Proliferative Response. *European Surgical Research: Clinical and Experimental Surgery*: *in press*

## Kongressbeiträge

Corsten M, Kollmar O, Schilling MK, Vollmar B, Menger MD (2006) Portal Branch Ligation Induces Microvascular Remodeling, Hyperoxygenation and Cell Proliferation in Portal Blood-Deprived Liver Tissue. 41<sup>st</sup> Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Rostock, Germany

Kollmar O, Corsten M, Schilling MK, Menger MD (2006) Pfortaderastligatur induziert mikrovaskuläres Remodelling, Hyperoxygenierung und Zellproliferation im le-gierten Leberlappen. Gastroenterologie 2006, 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) mit Sektion für Gastroenterologische Endoskopie und Deutsche Gesellschaft für Viszeralchirurgie (DGVC), Hannover, Germany

Corsten M, Kollmar O, Scheuer C, Schilling MK, Menger MD (2006) Portal Branch Ligation Induces Microvascular Remodeling, Hyperoxygenation and Cell Prolif-eration in Portal Blood-Deprived Liver Tissue. 10. Chirurgische Forschungstage, Münster, Germany

Corsten M, Kollmar O, Scheuer C, Schilling MK, Menger MD (2007) Portal Branch Ligation Reduces Initial Outgrowth of Colorectal Metastasis Followed by a Com-pensatory Angiogenic Response and Cell Proliferation. 11. Chirurgische For-schungstage, Saarbrücken, Germany

Corsten M, Kollmar O, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2008) Die Pfortaderastligatur reduziert initial das Wachstum von Lebermetastasen durch Minderung der Mikroperfusion bewirkt jedoch darauffolgend eine gesteigerte Pro-liferation durch VEGF, HGF und TGF- $\alpha$  Expression. 125. Kongress der Deut-schen Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, Germany

Corsten M, Kollmar O, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD (2008) Por-tal Branch Ligation Reduces Initial Outgrowth of Colorectal Metastasis followed by a Late Compensatory Angiogenic and Proliferative Response. 43<sup>rd</sup> Congress of the European Society for Surgical Research (ESSR), Warsaw, Poland

## 9 Anhang

UICC-Stadium	TNM-Klassifikation <sup>1)</sup>			DUKES-Klassifikation	Definition	5-Jahresüberlebensrate [%]
<b>0</b>	T <sub>is</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	-	Carcinoma in situ	keine Angabe
<b>I</b>	la	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	A	Beschränkung auf Mukosa und Submukosa	> 90
	lb	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>		M <sub>0</sub>	Infiltration der Muscularis propria
<b>II</b>		T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	B	Infiltration aller Wandschichten	70-80
		T <sub>4</sub>	N <sub>0</sub>		M <sub>0</sub>	
<b>III</b>		T <sub>x</sub>	N <sub>1-2</sub>	C	Angrenzende Lymphknoten befallen	35-65
		T <sub>x</sub>	N <sub>3</sub>		M <sub>0</sub>	
<b>IV</b>		T <sub>x</sub>	N <sub>x</sub>	D	Fernmetastasen	5

Tab. A.1: Klassifikation und 5-Jahresüberlebensrate des KRK (T = Tiefe der Tumordinfiltration; N = Ausmaß der Lymphknotenmetastasierung; M = Nachweis bzw. Fehlen von Fernmetastasen) (vgl. *Herold G et al.* [2005], S 419; *Lepenes J et al.* [2004], S 231; *Reichardt P, Schlag PM* [2003], S 646)

1) Zu Erläuterungen zu der TNM-Klassifikation vgl. Tabellen A.2 bis A.3.

### Erläuterungen zur TNM-Klassifikation

T-Einteilung	Erläuterung
T <sub>0</sub>	Kein Anhalt für Primärtumor
T <sub>is</sub>	Carcinoma in situ
T <sub>1</sub>	Tumor infiltriert die Submukosa
T <sub>2</sub>	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T <sub>3</sub>	Serosa durchbrochen
T <sub>4</sub>	Diffuse Infiltration des Organs und/oder der Umgebung
T <sub>x</sub>	Primärtumor kann nicht beurteilt werden

Tab. A.1: Erläuterungen zur T-Einteilung (Primärtumor) (vgl. *Largiadèr F, Metzger U* [1999], S 260; *Spieker T* [2006], S 9)

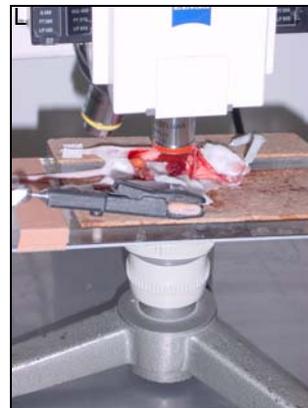
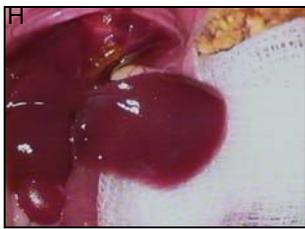
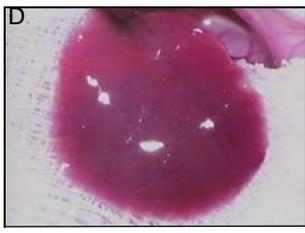
N-Einteilung	Erläuterung
N <sub>0</sub>	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N <sub>1</sub>	Metastasen in 1-3 perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten
N <sub>2</sub>	Metastasen in 4 oder mehr perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten
N <sub>3</sub>	Metastasen in Lymphknoten entlang einem benannten Gefäßstamm
N <sub>x</sub>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

Tab. A.2: Erläuterungen zur N-Einteilung (regionäre Lymphknoten) (vgl. *Nöthiger F, Birrer S* [1999], S 563)

<b>M-Einteilung</b>	<b>Erläuterung</b>
M <sub>0</sub>	Fehlen von Fernmetastasen
M <sub>1</sub>	Nachweis von Fernmetastasen
M <sub>x</sub>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

Tab. A.3: Erläuterungen zur M-Einteilung (Fernmatastasen) (vgl. *Largiadèr F, Metzger U* [1999], S 260; *Spieker T* [2006], S 9)

## Fotoseite



A	BALB/c Maus	G	LL-Auslagerung für IVM
B	Situs nach Laparotomie (10x)	H	LL-Auslagerung für IVM (10x)
C	Situs nach PBL (10x)	I	LL-Auslagerung für IVM mit Glasauflage (10x)
D	LL vor TU-Implantation (16x)	K	Maus unter IVM (Übersichtsaufnahme)
E	LL nach TU-Implantation (16x)	L	Maus unter IVM (Detailaufnahme)
F	Seitenlagerung		

## Futterzusammensetzung

Diätnummer: 1340

Tierart: Ratte/Maus

Diätenart: Standard

Verwendungszweck: Haltungsdiät rohfaserreich

Umsetzbare Energie (berechnet): 2.000,0 Kcal/kg (8,3 MJ/kg)

Rohnährstoffe	Prozentualer Anteil (Mittelwert)
Asche	6,5
N-freie Extraktstoffe	46,7
Rohfaser	20,0
Rohfett	3,0
Rohprotein	12,5
Wasser	11,3

Tab. A.4: Prozentuale Anteile der Rohnährstoffe an der Diät

Mineralstoffe	Prozentuale Anteile (Mittelwert)
Calcium	0,90
Kalium	1,00
Magnesium	0,30
Natrium	0,20
Phosphor	0,70

Tab. A.5: Prozentuale Anteile der Mineralstoffe an der Diät

<b>Spurenelemente</b>	<b>mg in 1 kg Diät</b>
Eisen	200,0
Jod	0,9
Kupfer	13,0
Mangan	100,0
Zink	70,0

Tab. A.6: mg-Anteile der Spurenelemente an 1kg Diät

<b>Aminosäuren</b>	<b>Prozentuale Anteile (Mittelwert)</b>
Arginin	0,65
Cystin	0,18
Histidin	0,25
Isoleucin	0,50
Leucin	0,90
Lysin	0,60
Methionin	0,25
Phenylalanin	0,50
Threonin	0,55
Tryptophan	0,15
Tyrosin	0,40
Valin	0,60

Tab. A.7: Prozentuale Anteile der Aminosäuren an der Diät

<b>Vitamine</b>	<b>Zusatz in 1 kg Diät</b>
Vitamin A	15.000,0 IU
Vitamin E	75,0 mg
Vitamin B1	18,0 mg
Vitamin B6	9,0 mg
Nikotinsäure	36,0 mg
Folsäure	2,0 mg
Cholin	600,0 mg
Vitamin D3	600,0 IU
Vitamin K3	3,0 mg
Vitamin B2	12,0 mg
Vitamin B12	24,0 µg
Panhotensäure	21,0 mg
Biotin	60,0 µg
Vitamin C	36,0 mg

Tab. A.8: Vitaminzusatz in 1kg Diät

Quelle: [http://www.altromin.de/altro\\_ger/Spezifikationen\\_html/1340.htm](http://www.altromin.de/altro_ger/Spezifikationen_html/1340.htm)  
(Zugriff: 14.05.2008)