

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

## DISSERTATION

# Bedeutung der Hämoxygenase-1 für die intestinale Perfusion und Integrität bei Gallengangsligatur und nach ausgedehnter Leberresektion

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae  
(Dr. med.)

vorgelegt der Hohen Medizinischen Fakultät der  
Universität des Saarlandes

von  
Simone Goger  
geb. am 25.12.1978 in Freudenstadt

---

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Gutachter:           1.  
                              2.  
                              3.

eingereicht am:

Datum der Promotion:

# INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	4
2	SUMMARY .....	7
3	EINLEITUNG.....	10
3.1	Historisches Interesse an der Hämoxxygenase.....	10
3.2	Die zytoprotektive Rolle der HO-1 .....	13
3.3	Zytoprotektive Effekte der HO-1 Produkte.....	14
3.3.1	Biliverdin und Bilirubin .....	14
3.3.2	Kohlenmonoxid (CO).....	16
3.3.3	Fe <sup>2+</sup> und Ferritin .....	17
3.4	Zytotoxische Effekte der HO-1 .....	17
3.5	Inhibition der HO-1 .....	19
3.6	Extrahepatische Cholestase und Verschlussikterus.....	20
3.6.1	Pathophysiologie der Hyperbilirubinämie/Ikterus .....	20
3.6.2	Pathophysiologie der Cholestase.....	22
3.7	Cholestase als Risikofaktor in der Chirurgie.....	23
3.8	Der Darm als Motor des Leberversagens .....	25
3.8.1	Störungen der Darmbarriere bei Cholestase.....	25
3.8.2	Rolle des Darmes bei ausgedehnten Leberresektionen .....	26
4	ZIEL DER STUDIE .....	29
5	MATERIAL UND METHODEN .....	31
5.1	Versuchstiere .....	31
5.2	Modell.....	31
5.2.1	Anästhesie und chirurgische Präparation für Messungen der regionalen Perfusion und Mikrozirkulation .....	31
5.2.2	Gallengangsligatur .....	32
5.2.3	70% und 90% Leberteileresektion .....	33
5.2.4	Aufbereitung und Applikation des HO-1 Inhibitors SnMP .....	36
5.3	Untersuchungsmethoden .....	36
5.3.1	Makrohämodynamik .....	36
5.3.2	Regionale Perfusion (Videofluoreszenzangiographie).....	37

5.3.3	Mikrozirkulation des Darms.....	42
5.3.4	Probenentnahme .....	49
5.3.5	Histologische Analysen .....	49
5.3.6	Immunhistochemische Analysen.....	52
5.4	Experimentelles Protokoll .....	52
5.4.1	Gallengangsligatur .....	53
5.4.2	90% Leberteileresektion .....	54
5.5	Statistik .....	55
6	ERGEBNISSE.....	56
6.1	Auswirkungen der HO-1 Blockade und Gallengangsligatur auf die intestinale Perfusion und Integrität.....	56
6.1.1	Überleben und Gewichtsverlauf.....	56
6.1.2	Einfluss von Gallengangsligatur und HO-1 Blockade auf die regionale Darmperfusion.....	57
6.1.3	Auswirkungen der Gallengangsligatur und HO-1 Blockade auf die Mikrozirkulation des Darmes.....	59
6.1.4	Auswirkungen der Gallengangsligatur und HO-1 Blockade auf die Schädigung der Darmwand .....	63
6.1.5	Auswirkungen der Gallengangsligatur und HO-1 Blockade auf die intestinale HO-1 Expression.....	66
6.2	Auswirkungen der HO-1 Blockade und 90% Leberresektion auf die intestinale Perfusion und Integrität.....	68
6.2.1	Auswirkungen der HO-1 Blockade und 90% Leberresektion auf Kreislauf, Lebermikrozirkulation, strukturelle Schäden der Leberarchitektur und Überleben.....	68
6.2.2	Einfluss von HO-1 Blockade und 90% Leberresektion auf die regionale Darmperfusion.....	70
6.2.3	Auswirkungen der HO-1 Blockade und 90% Leberresektion auf die Mikrozirkulation des Darmes.....	72
6.2.4	Auswirkungen der 90% Leberresektion und HO-1 Blockade auf die Schädigung der Darmwand .....	77
6.2.5	Immunhistochemie .....	81
7	DISKUSSION .....	83
7.1	Diskussion der Modelle .....	83
7.1.1	Narkoseverfahren .....	83
7.1.2	Gallengangsligatur .....	84
7.1.3	70% und 90% Leberresektion .....	86

---

7.1.4	Auswahl und Applikation des Metalloporphyrins .....	87
7.2	Diskussion der Untersuchungstechniken.....	88
7.2.1	Videofluoreszenzangiographie (IC-View®) .....	88
7.2.2	Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF).....	89
7.2.3	Intravitalmikroskopie .....	90
7.3	Diskussion der Ergebnisse.....	91
7.3.1	Inhibition der HO-1 verstärkt die durch Cholestase bedingte Beeinträchtigung der Darmdurchblutung und Schädigung der Villusstruktur..	91
7.3.2	HO-1 vermindert die Schädigung der intestinalen Villi bei 90% Leberresektion.....	96
7.3.3	HO-1 bei Cholestase und nach Leberresektion: zytotoxisch oder zytoprotektiv?.....	99
8	ABKÜRZUNGEN .....	101
9	LITERATUR.....	103
10	DANKSAGUNG.....	116
11	PUBLIKATIONEN.....	117
12	CURRICULUM VITAE .....	118

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Das Enzym Hämoxigenase (HO) war ursprünglich als Schlüsselenzym für den Abbau des potentiell toxischen Häm beschrieben worden. In den letzten Jahren wurde jedoch vermehrt Aufmerksamkeit den Stoffwechselprodukten der HO, nämlich Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ), Biliverdin und Kohlenmonoxid (CO) geschenkt. Da die HO-1 durch ganz unterschiedliche Stressfaktoren (z. B. oxidativer Stress, Ischämie/Reperfusion, ionisierende Strahlung u.v.a.m.) in verschiedenen Organen vermehrt gebildet wird, lag es nahe, insbesondere für Biliverdin und CO nach möglichen zytoprotektiven Effekten unter Stressbedingungen zu suchen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Bilirubin, welches nach Reduktion des Biliverdins entsteht, neben Urat und Ascorbat zu den drei wichtigsten Antioxidantien im Plasma zählt. Somit kann man die Induktion von HO-1 durch Sauerstoffradikale als sinnvolle Gegenregulation des Organismus durch vermehrte Produktion des Radikalfängers Bilirubin verstehen. CO ist ein weiterer Metabolit des HO-1 Stoffwechselweges mit potentiell zytoprotektiven Eigenschaften. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass CO vasodilatierende, antiinflammatorische, antiapoptotische und antiproliferative Wirkungen aufweist. Weitestgehend unklar sind noch die Auswirkungen des bei Induktion der HO-1 vermehrt anfallenden  $\text{Fe}^{2+}$ . Nachdem  $\text{Fe}^{2+}$  die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediärprodukte, wie z. B. des Hydroxylradikals katalysiert, können hierdurch die antioxidativen Eigenschaften des Bilirubins abgeschwächt bzw. aufgehoben werden. In der Literatur sprechen die meisten Daten aus den Modellen wie hämorrhagischer Schock, Ischämie/Reperfusion, Hypoxie und Endotoxinämie der HO-1 eine insgesamt protektive Rolle zu. Es gibt aber auch wenige Arbeiten, die einen nachteiligen Effekt einer vermehrten HO-1 Induktion beschreiben. Somit kann die Rolle der HO-1 im Rahmen unterschiedlicher Stressantworten noch nicht eindeutig definiert werden.

Die Leber zählt zu den Organen mit der höchsten HO-1 Expression. Es wurde gezeigt, dass nach hämorrhagischem Schock und nachfolgender Volumensubstitution das durch die HO-1 vermehrt anfallende CO eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung des nutritiven Blutflusses sowie der Oxygenierung der Leber spielt und durch eine vermehrte HO-1 Aktivität die Leberfunktion und hepatozelluläre Integrität verbessert werden können. Diese Befunde bilden den Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen.

Im Fokus stand, die Bedeutung der HO-1 bei Cholestase und Leberresektion zu charakterisieren. Es ist bekannt, dass Cholestase zu einer Verschlechterung der Leberintegrität und Leberfunktion führt und dass sich dadurch das Risiko einer Leberresektion erhöht. Noch nicht näher untersucht wurde jedoch, wie sich Cholestase bzw. Leberresektion auf die Darmperfusion und -integrität auswirkt und welche Rolle hierbei der HO-1 zukommt.

Um die funktionelle Bedeutung der HO-1 zu bestimmen, muss die Aktivität der HO-1 geblockt werden. Hierfür wurde das Metalloporphyrin SnMP verwendet. Nachdem man in der Literatur davon ausgeht, dass es bei Cholestase zu einer Störung der Darmbarriere gegenüber im Darm lebenden Mikroorganismen und deren Toxine kommt, wurde die Bedeutung der HO-1 Expression für die Darmperfusion und Darmintegrität untersucht. Weiter sollten die Effekte auf die Darmintegrität und -perfusion nach ausgedehnter (90%) Leberresektion, sowie die Auswirkungen einer HO-1 Blockade analysiert werden, nachdem die Rolle des Darmes im Rahmen der Pathogenese des postoperativen Leberversagens noch unzureichend definiert ist.

Für die Studien der Darmperfusion wurden die Makrohämodynamik durch Messung des Blutdrucks, die Mikrozirkulation mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) und Intravitalmikroskopie (IVM) und schließlich die regionale Perfusion mittels der Videofluoreszenzangiographie bestimmt. Die Videofluoreszenzangiographie ist hierbei ein relativ neues, minimalinvasives Verfahren, welches ermöglicht, vor allem in größeren Darmabschnitten die regionale Perfusion darzustellen, indem sie sich die Fluoreszenz von Indocyaningrün zu Nutze macht. Die Schädigungen des Darms wurden außerdem histologisch untersucht. Die HO-1 Expression wurde auf Proteinebene durch Immunhistochemie bestimmt.

Zur statistischen Auswertung wurde mit Hilfe von SigmaStat® eine one-way ANOVA, gefolgt von dem Holm-Sidak-Test als post-hoc Test berechnet. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurden Unterschiede in den Ergebnissen als signifikant angenommen.

Nachdem die Gallengangsligatur (BDL) zu einer manifesten Leberschädigung führt und mit einer HO-1 Induktion vergesellschaftet ist, wurde nun untersucht inwieweit der Darm beeinflusst wird und welche Rolle hierbei der HO-1 zukommt. Für die BDL wird die bakterielle Translokation postuliert. Es ist aber bisher noch nicht untersucht worden, ob diese in Zusammenhang mit intestinalen Perfusionsstörungen steht. Die Gabe von SnMP führte in der Kontrollgruppe, aber vor allem bei BDL zu fleckförmigen Perfusionsdefekten, die am eindrucksvollsten in der Videofluoreszenzangiographie darstellbar waren. Die Perfusionsstörungen zeigten sich aber auch in der IVM anhand einer Zunahme des Anteils

nicht-perfundierter Gefäße in der Tunica muscularis (Sham+NaCl:  $1,1\% \pm 0,5\%$ , Sham+SnMP:  $3,7\% \pm 0,7\%$ , BDL+NaCl:  $4,4\% \pm 0,5\%$ , BDL+SnMP:  $5,7\% \pm 0,8\%$ ). Dementsprechend nahm auch der Villusschaden signifikant sowohl durch HO-1 Blockade als auch durch BDL zu (Sham+NaCl:  $0,5 \pm 0,04$ , Sham+SnMP:  $1,78 \pm 0,1$ , BDL+NaCl:  $2,1 \pm 1,1$ , BDL+SnMP:  $3,4 \pm 0,3$ ). Als Ausdruck einer Darmwandödembildung war nach BDL+SnMP die Tunica muscularis um 30% gegenüber der Kontrollgruppe dicker. Nach funktioneller HO-1 Blockade war eine erhöhte intestinale HO-1 Expression sowie ein stressspezifisches Aktivierungsmuster mit Anfärbung von Enterozyten an der Spitze der Villi gesehen worden. Es zeigte sich ein protektiver Effekt der HO-1, wobei die schlechtere intestinale Perfusion nach SnMP-Gabe auch mit einer Zunahme der histologisch fassbaren Schäden korrelierte.

Schließlich sollte im letzten Untersuchungsabschnitt geklärt werden, ob sich nach 90% Leberresektion (LRES) auch Veränderungen der intestinalen Perfusion finden und wie hier eine HO-1 Blockade modulierend eingreift. Zum Untersuchungszeitpunkt sechs Stunden nach LRES bestanden ausgeprägte hämodynamische Veränderungen der Makrohämodynamik und Mikrozirkulation. Während in der systemischen Zirkulation eine Hypotension mit MAP-Werten von  $89,4 \pm 8,1$  mmHg bei LRES+NaCl, sowie  $71,6 \pm 2,5$  mmHg bei LRES+SnMP auffiel, war der relative hepatische Flux vervierfacht. Wie schon im Untersuchungsabschnitt zuvor, zeigte sich eine fleckförmige intestinale Perfusionsstörung in der Videofluoreszenzangiographie, diesmal aber nur in der LRES+NaCl Gruppe. Die Perfusionsstörungen bildeten sich wiederum auch in der IVM ab. So fand sich eine Zunahme des Anteils nicht perfundierter Tunica muscularis Gefäße nach SnMP-Gabe, aber auch nach LRES und der Kombination von beiden (Sham+NaCl:  $1,3\% \pm 0,4\%$ , Sham+SnMP:  $5,6\% \pm 1,0\%$ , LRES+NaCl:  $5,8\% \pm 1,0\%$ , LRES+SnMP:  $8,5\% \pm 1,3\%$ ). Außerdem ließ sich nach LRES+SnMP eine unter Stressbedingungen typische Umverteilung der intestinalen Perfusion zu Lasten der Durchblutung der Tunica muscularis hin zur Tunica mucosa anhand der in der IVM ermittelten Flussgeschwindigkeiten nachweisen. Auch in diesem Untersuchungsabschnitt hatte der Villusschaden proportional zugenommen (Sham+NaCl:  $0,3 \pm 0,1$ , Sham+SnMP:  $1,1 \pm 0,1$ , LRES+NaCl:  $2,3 \pm 0,1$ , LRES+SnMP:  $2,8 \pm 0,1$ ). Allerdings bestand keine gute Korrelation zu Veränderungen der intestinalen Perfusion. Nach LRES fand sich eine ausgeprägte HO-1 Expression in den intestinalen Villi, ohne Unterschiede ob SnMP verabreicht wurde oder nicht.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sowohl Cholestase als auch die ausgedehnte Leberresektion die Perfusion und die Integrität des Darmes erheblich beeinträchtigen, bei Cholestase aber die HO-1 Induktion am Darm eine protektive Wirkung hat.

## 2 SUMMARY

In the first years after its description the enzyme heme oxygenase (HO) was considered as the rate limiting step in the degradation of the toxic heme. However, in the last years the products of the HO pathway ( $\text{Fe}^{2+}$ , CO and biliverdin) attracted increasing attention. As HO is induced by a variety of different stimuli (e. g. oxidative stress, ischemia/reperfusion, radiation a. s. o.) biliverdin and CO were supposed to exhibit cytoprotective properties. Beside urate and ascorbic acid bilirubin, which is synthesized from biliverdin resulting from the HO-1 pathway, has been recognized as one of the most important antioxidant. Thereby, the oxidative stress-driven induction of HO is diminished by the production of the highly potent antioxidant bilirubin. CO is another metabolite of the HO pathway having potential cytoprotective capacities. Studies have shown that CO acts as a regulator of the vascular tone and as an anti-inflammatory, anti-apoptotic and anti-proliferative mediator. However, the impact of the  $\text{Fe}^{2+}$  accumulation remains a matter of debate, as  $\text{Fe}^{2+}$  catalyzes the formation of reactive oxygen species which can outweigh the antioxidative capacity of bilirubin. In most published models yet, e. g. hemorrhagic shock and resuscitation, ischemia/reperfusion and endotoxemia, HO-1 has been regarded as a cytoprotective enzyme. However, there are some conflicting data describing detrimental effects of increased HO-1 induction. Therefore the exact role of HO-1 in different models is still undefined.

The liver is one of the organs with the highest HO-1 expression. After hemorrhagic shock and resuscitation HO-1 has been shown to restore the nutritive blood flow and the oxygenation of the liver. Increased HO-1 activity improves liver function and hepatic injury.

These findings are the background of the current studies. It was aimed to characterize the impact of HO-1 in cholestasis and liver resection. It is well known that cholestasis increases liver injury and, therefore, the surgical risk. However, it was not examined how cholestasis or liver resection affects the intestinal perfusion and integrity and whether this involves HO-1 expression. To determine the functional role of HO-1, the activity of HO-1 must be blocked. Therefore, the metalloporphyrin SnMP was used as false substrate. As cholestasis damages the intestinal barrier against bacteria and their toxins, the impact of HO-1 induction on intestinal integrity and perfusion should be examined. Similar examinations were

also performed in the model of 90 per cent hepatectomy, because the pathophysiological role of the small intestine for the development of postoperative liver failure is mostly undefined.

To study the macrohemodynamic changes, an arterial canula for measurement of the mean arterial pressure was inserted. Microcirculation was determined with the use of intravital microscopy (IVM) and laser-doppler-flowetry (LDF). Regional perfusion was studied by video fluorescence angiography. This is a relatively new and non-invasive device for the detection of regional perfusion in even longer bowel segments by inducing ICG fluorescence with the light of a laser. In addition, histological sections of intestinal tissue were examined. HO-1 expression was determined at the protein level using immunohistochemistry.

For statistical calculations one-way ANOVA and the Holm-Sidak-test as a post-hoc test were performed by using SigmaStat®. A  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

BDL was associated with a significant liver injury as well as HO-1 expression. Therefore, in the next series of experiments the functional role of HO-1 expression and its influence on the bowel was examined. In BDL, bacterial translocation from the gut has been postulated. However, it has not been examined so far, whether there are intestinal perfusion deficits promoting the damage of the intestinal barrier. Already in the control group the administration of SnMP led to irregular shaped perfusion deficits which were impressively shown in the video fluorescence angiography. Intravital microscopy indicated an increase in the number of non-perfused capillaries in the intestinal muscle layer (Sham+NaCl:  $1.1\% \pm 0.5\%$ , Sham+SnMP:  $3.7\% \pm 0.7\%$ , BDL+NaCl:  $4.4\% \pm 0.5\%$ , BDL+SnMP:  $5.7\% \pm 0.8\%$ ). Accordingly, the villus injury significantly increased after HO-1 blockade (Sham+NaCl:  $0.5 \pm 0.04$ , Sham+SnMP:  $1.78 \pm 0.1$ , BDL+NaCl:  $2.1 \pm 1.1$ , BDL+SnMP:  $3.4 \pm 0.3$ ). In addition, the thickness of the muscle layer was about 30% increased in the BDL+SnMP group compared to the sham group due to edema formation of the bowel wall. There was an increased intestinal HO-1 expression after SnMP-mediated HO-1 inhibition and a stress-associated expression pattern of HO-1 positive enterocytes at the tip of the villi. In this study, a HO-1-associated cytoprotective effect was observed and the impaired intestinal perfusion also correlated with an increase in the observed villus damages. It was also demonstrated that HO-1 plays an active role in protection from BDL-induced villus injury and is involved in the maintenance of intestinal perfusion under physiological circumstances.

Finally, we addressed, whether there is also an impairment of intestinal perfusion after 90% hepatectomy (LRES) and whether there is a modulating role of HO-1. At the point in time six hours after LRES we observed marked changes in macrohemodynamics and the microcirculation. Rats were hypotensive after LRES (LRES+NaCl:  $89.4 \pm 8.1$  mmHg, LRES+SnMP:  $71.6 \pm 2.5$  mmHg). In contrast, the hepatic flux was 4-fold increased compared to baseline values. Similar to the previous study section, there were irregularly shaped perfusion deficits, as indicated by video fluorescence angiography, but these findings were only seen in the LRES+NaCl group. In the IVM there was an increase in the number of non-perfused capillaries in the muscle layer after SnMP administration, but also after LRES and the combination of both (Sham+NaCl:  $1.3\% \pm 0.4\%$ , Sham+SnMP:  $5.6\% \pm 1.0\%$ , LRES+NaCl:  $5.8\% \pm 1.0\%$ , LRES+SnMP:  $8.5\% \pm 1.3\%$ ). In addition, a typical pathological change in blood flow distribution of the small intestine during shock was observed, as the blood flow velocity decreased in the muscle layer and increased in the mucosal layer compared to baseline values. Again, in this study section there was a proportional increase in villus injury (Sham+NaCl:  $0.3 \pm 0.1$ , Sham+SnMP:  $1.1 \pm 0.1$ , LRES+NaCl:  $2.3 \pm 0.1$ , LRES+SnMP:  $2.8 \pm 0.1$ ). However, there was no correlation between changes in the histological score and the markers of the intestinal perfusion. LRES led to a marked HO-1 expression in the enterocytes at the tip of the villi independent of SnMP administration.

In this study it was shown that cholestasis as well as the extended liver resection considerably affect the perfusion and the integrity of the bowel. HO-1 expression in the bowel has a protective effect in cholestasis but not after extended liver resection.

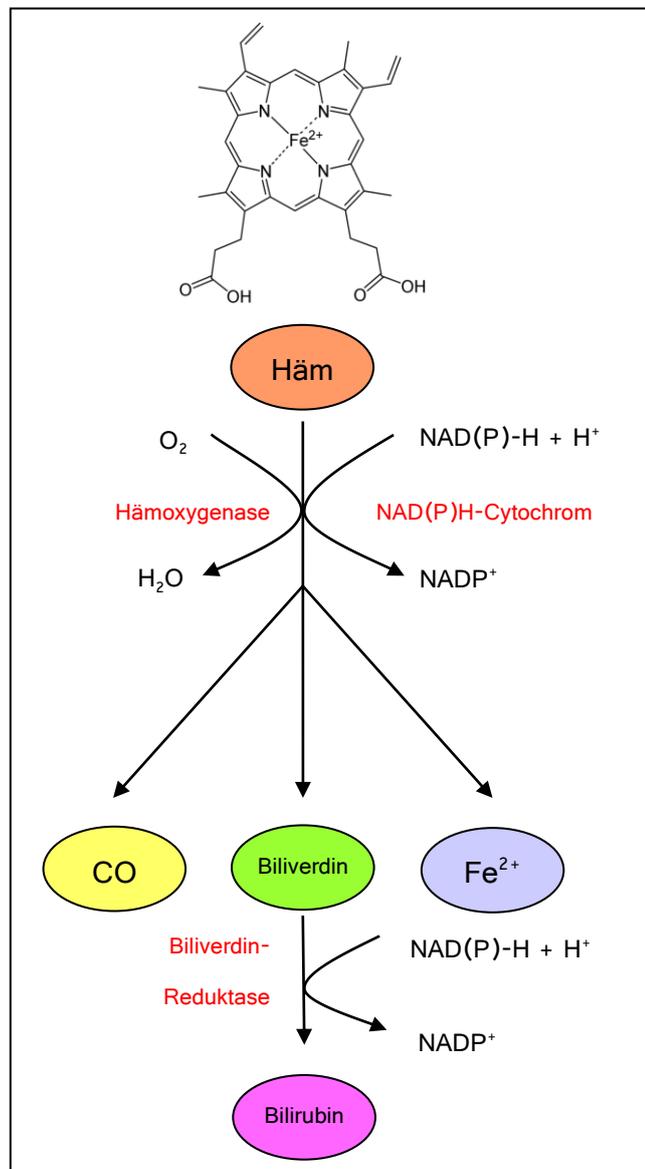
## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Historisches Interesse an der Hämoxigenase

Historisch gesehen spielten Enzyme, die lediglich Abbauprozesse katalysieren aus wissenschaftlicher Sicht eine eher untergeordnete Rolle und besaßen längst keinen so hohen Stellenwert wie anabole Enzyme. Auch die Hämoxigenase (HO) stieß, als sie 1968 erstmalig als ein Schrittmacherenzym des Hämabbaus beschrieben wurde [TENHUNEN et al., 1968], auf zunächst eher geringes Interesse. Mittels oxidativer Spaltung katalysiert die Hämoxigenase die Bildung äquimolarer Anteile an Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und freiem zweiwertigem Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) aus Häm (Fe-Protoporphyrin-IX), wobei Biliverdin anschließend mittels Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert wird. Für die Oxidationsreaktion sind die Anwesenheit von Sauerstoff, NAD(P)H sowie NAD(P)H-Cytochrom P-450 Reduktase notwendig, so dass man ursprünglich davon ausging, dass die Hämoxigenase ein zur cytP450-Familie gehörendes Enzym sei [TENHUNEN et al., 1972]. Später jedoch konnte diese Vorstellung revidiert werden und die HO als vollkommen unabhängiges Enzym beschrieben werden [YOSHIDA et al., 1978].

Erst mit der Entdeckung einer zweiten Isoform der Hämoxigenase im Jahre 1986 [MAINES et al., 1986] begann sich das Bild der HO als reines Häm degradierendes Enzym zu wandeln. Obwohl die beiden Enzyme – die ursprünglich beschriebene Hämoxigenase wurde fortan HO-1 genannt, und die neu entdeckte HO-2 – dieselbe Reaktion katalysieren und auch strukturell große Ähnlichkeit aufweisen, zeigten sich im Vergleich so erhebliche Unterschiede, dass man weitere Funktionen der HO vermutete [SUN et al., 1990]. Unter normalen Bedingungen wies die HO-2 eine 2-3fach höhere Aktivität als die HO-1 auf. Interessanterweise konnte nach Exposition mit Kadmium oder Kobalt, d. h. unter Stressbedingungen, die HO-1 Aktivität jedoch um das bis zu 100fache gesteigert werden [TRAKSHEL et al., 1986]. Eine Aktivitätssteigerung der HO-2 wurde jedoch nicht bewirkt, so dass dieses Enzym als die konstitutive nicht induzierbare Isoform der HO galt, wofür das Fehlen bestimmter Sequenzen im HO-2 Gen verantwortlich gemacht wurde [ALAM et al., 1994]. Inzwischen wurde auch eine weitere nicht induzierbare Isoform der Hämoxigenase -

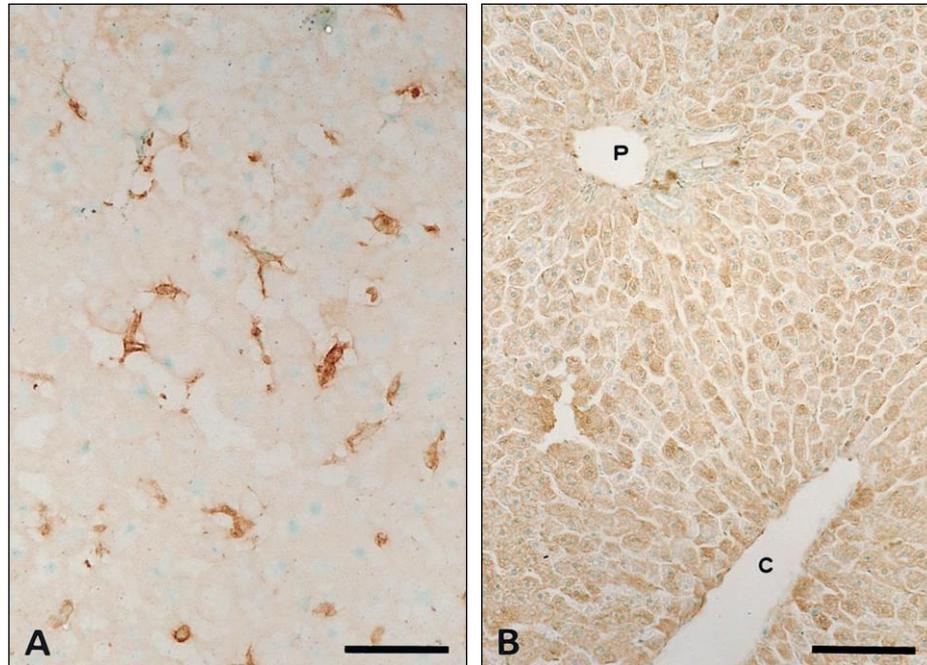
die HO-3 - beschrieben, die jedoch nur einen schwachen Katalysator der Hämdegradation darstellt [MCCOUBREY et al., 1997].



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des enzymatischen Hämabbaus. Die Hämoxigenase spaltet Häm oxidativ zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen. Biliverdin wird anschließend mit Hilfe der Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert.

Durch immunhistochemische Untersuchungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern ist das Muster der Verteilung von HO-1 und HO-2 analysiert worden, insbesondere die Lokalisation der einzelnen Enzyme in der Leber. Hierbei fand man ein sehr spezielles Verteilungsmuster. In normalem Lebergewebe konnte HO-1 nur in den KUPFFERschen Sternzellen nachgewiesen werden, die für Abbau und Beseitigung zerstörter

Erythrozyten verantwortlich sind. HO-2 dagegen fand sich in den Hepatozyten unter Aussparung der KUPFFERschen Sternzellen [GODA et al., 1998]. Die Hepatozyten stellen wegen ihrer Ausstattung mit Cytochrom P-450 den Hauptabbauort des Häm dar [BISSELL et al., 1972].

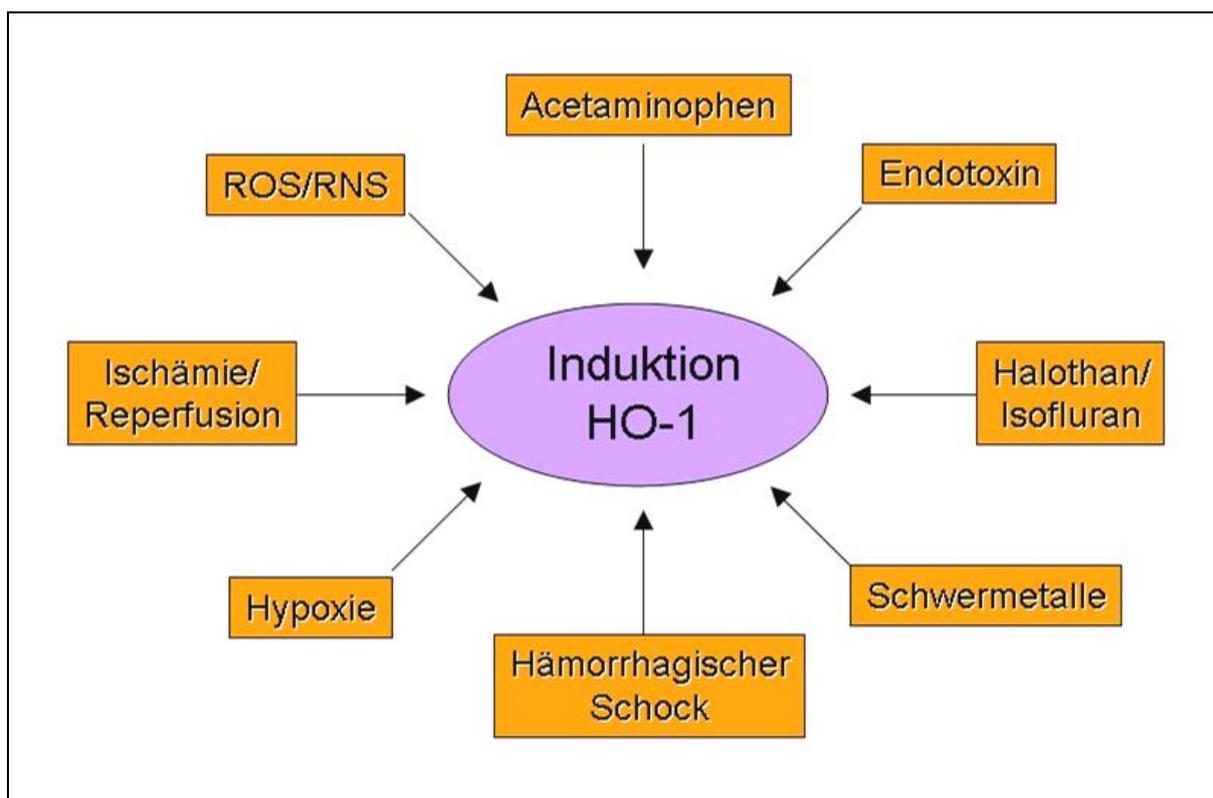


**Abbildung 2:** Expression von HO-1 (A) und HO-2 (B) in Lebergewebe unter Normalbedingungen. Deutlich zu erkennen ist das unterschiedliche Verteilungsmuster der beiden Isoenzyme. Die Markierungen repräsentieren 50 $\mu$ m in (A) und 100 $\mu$ m in (B). (Abb. aus Goda et al., 1998)

Anders hingegen sah das Verteilungsmuster in Lebergewebe bei oxidativem Stress aus, also beispielsweise nach Verabreichung von Kobaltchlorid, Endotoxin oder nach hämorrhagischem Schock. Im gesamten Lebergewebe, vor allem jedoch in den periportalen und perizentralen Hepatozyten sowie in den sinusoidalen Endothelzellen war eine massive Zunahme der HO-1 Expression im Zytoplasma der Hepatozyten zu erkennen. Hinsichtlich der HO-2 Expression gab es jedoch keine Veränderungen gegenüber dem normalen, nicht stimulierten Lebergewebe [BAUER et al., 1998].

## 3.2 Die zytoprotektive Rolle der HO-1

Da neben Häm als Substrat der HO auch eine Reihe oxidativer Stressoren wie beispielsweise Wasserstoffperoxid, Natriumarsenit, UVA-Strahlung, Schwermetalle oder Endotoxin als Induktoren der HO-1 identifiziert werden konnten, wurde die HO-1 letztendlich in die Reihe der Stressproteine eingestuft und als Hitzeschockprotein 32 neu definiert [KEYSE et al., 1988]. Man geht sogar davon aus, dass die HO-1 das durch die meisten Stimuli und Konditionen induzierbare Enzym ist [MAINES et al., 1992].



**Abbildung 3:** Eine Vielzahl von hepatotoxischen Noxen und Konditionen führen zur Induktion der HO-1. Einige dieser sind beispielhaft in dieser schematischen Abbildung dargestellt.

Da nicht nur die Induktion der HO-1 nachgewiesen wurde, sondern sich auch Hinweise auf mögliche zytoprotektive Eigenschaften ergaben, rückte die HO-1 in den Folgejahren immer mehr in den Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Die Anzahl der Publikationen zum Thema Hämoxxygenase stieg somit von lediglich 8 im Jahre 1975 auf 8729 in 2005 [MAINES et al., 2005].

Insbesondere die hepatoprotektive Rolle der HO-1 konnte in einer Vielzahl von Modellen mit Leberschaden gesichert werden. Endogene HO-1 verringerte die mikrozirkulatorische Dysfunktion, den hepatozellulären Schaden, und die inflammatorische Reaktion nach hämorrhagischem Schock [PANNEN et al., 1998], septischem Schock [KYOKANE et al., 2001], Ischämie/Reperfusion [AMERSI et al., 1999; WUNDER et al., 2002] und CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberzirrhose [TSUI et al., 2006]. Auch nach Lebertransplantation wiesen Lebern mit initial höherer HO-1 Aktivität weniger Reperfusionsschäden und bessere Transplantatfunktion auf als Spenderlebern mit niedriger HO-1 Aktivität [GEUKEN et al., 2005].

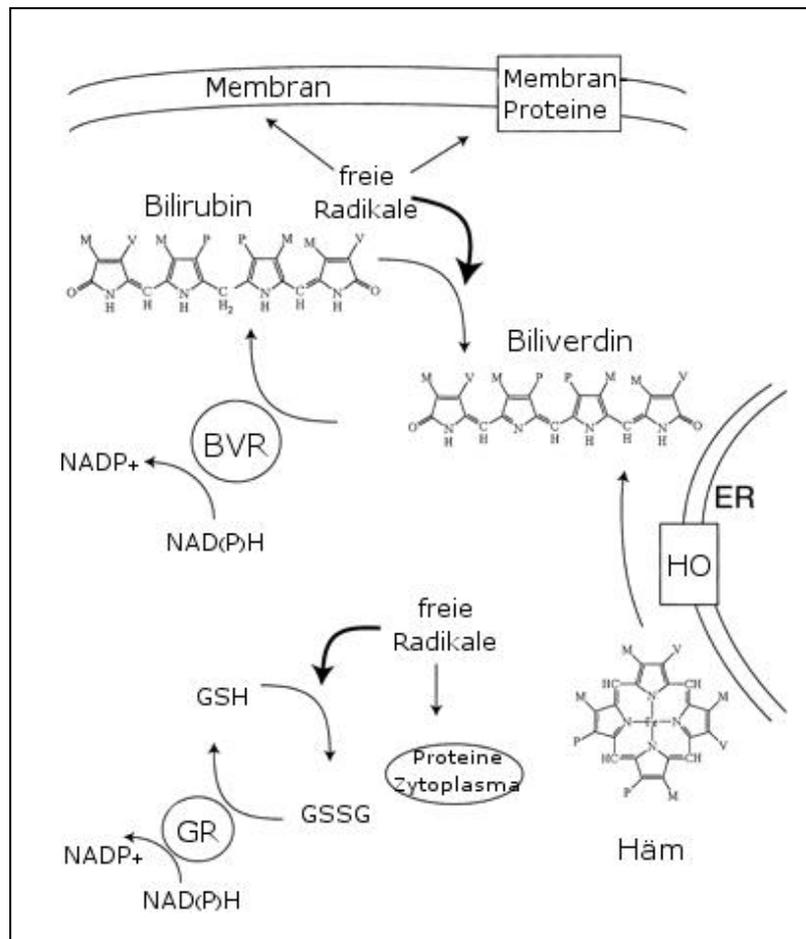
### **3.3 Zytoprotektive Effekte der HO-1 Produkte**

#### **3.3.1 Biliverdin und Bilirubin**

Ähnlich wie die Hämoxxygenase war auch deren Stoffwechselprodukt Bilirubin, das mit Hilfe der Biliverdin-Reduktase aus Biliverdin reduziert wird, früher als eher nutzloses bis sogar toxisches Stoffwechselendprodukt angesehen worden. Aufmerksamkeit gewann Bilirubin vor allem durch seine Neurotoxizität bei Neugeborenen, bei denen die Bluthirnschranke noch nicht vollends ausgebildet ist [HSIA et al., 1952]].

Heutzutage dagegen gelten Bilirubin und Biliverdin als potente endogene Antioxidantien. Sowohl in vitro als auch in vivo konnten antioxidative Eigenschaften dieser beiden Moleküle nachgewiesen werden und sie gelten so als physiologische, kettenbrechende Inaktivatoren freier Sauerstoffradikale [STOCKER et al., 1987]. Die Oxidation ungesättigter Fettsäuren in Liposomen kann durch Bilirubin sogar stärker verhindert werden als mit  $\alpha$ -Tocopherol, welches bis dato als potentestes Antioxidans der Lipidoxidation galt. Diese Entdeckungen konnten in verschiedensten nachfolgenden Versuchsreihen bestätigt werden. So zeigten beispielsweise Baranano et al. (2002), dass sogar durch Bilirubin in nanomolarer Dosis Zellen vor einem durch Wasserstoffperoxid induzierten Schaden geschützt werden können. Als zugrunde liegenden Mechanismus der antioxidativen Wirkung geht man von einem Redox-Zyklus im Sinne eines „Self-Recycling“ des Bilirubins aus. Bilirubin wird durch freie Radikale zurück zu Biliverdin oxidiert, um anschließend durch die Biliverdin-

Reduktase wieder zu Bilirubin reduziert zu werden und erneut als Antioxidans zur Verfügung zu stehen [BARANANO et al., 2002]



**Abbildung 4:** Modell für die Zytoprotektion mittels Biliverdin/Bilirubin: Das von der HO gebildete Biliverdin wird mit Hilfe der Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin reduziert, welches mit freien Radikalen reagiert und somit zu Biliverdin zurückoxidiert wird. Dadurch werden Membranproteine vor Oxidation geschützt. GSH ist das stärkste intrazelluläre Antioxidans, das zytoplasmatische Proteine vor Oxidation schützt. GR=GSH-Reduktase; GSSG=reduziertes GSH. (Abb. modifiziert nach Baranano et al., 2002)

Außerdem besitzt Bilirubin eine immunsuppressive Wirkung, indem es die Interleukin-1 und -2 Bildung inhibiert und somit die Aktivität natürlicher Killerzellen, die zelluläre antikörperabhängige Zytotoxizität sowie die Lymphokin-aktivierte Immunantwort unterdrückt [HAGA et al., 1996].

### 3.3.2 Kohlenmonoxid (CO)

Auch Kohlenmonoxid verlor sein ehemaliges Ansehen als rein toxisches Häm-bindendes Gas als bekannt wurde, dass CO ebenso wie Stickstoffmonoxid (NO) zur Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) mit gesteigerter cGMP-Bildung (zyklisches Guanosinmonophosphat) führt und somit als second messenger ein weites Spektrum an zellulären Funktionen moduliert [BRÜNE et al., 1987]. Über diesen Mechanismus bewirken beide Gase die Relaxation glatter Muskelzellen, insbesondere der Gefäßwände und gelten somit als potente Vasodilatoren [SAMMUT et al., 1998]. Schon 1995 war gezeigt worden, dass CO – nicht aber NO – für die Regulation der Lebermikrozirkulation eine wichtige Rolle spielt, indem es den niedrigen vaskulären Tonus der Lebersinusoiden durch Relaxation der Ito-Zellen aufrechterhält. Gezielte Blockade der HO-1 und damit der CO-Produktion bewirkte eine Konstriktion der Ito-Zellen und somit eine Verengung der Sinusoiden [SUEMATSU et al., 1995].

Neben diesen cGMP-vermittelten vasoaktiven Eigenschaften verfügt CO, ähnlich wie Bilirubin, auch über eine antiinflammatorische Komponente, die NO-unabhängig über mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) vermittelt wird. Zu diesen Effekten zählen die Inhibition der Plättchenaggregation sowie die Inhibition der Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  oder Interleukin-1 $\beta$  [OTTERBEIN et al., 2000]. Außerdem wirkt Kohlenmonoxid in verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Hepatozyten und Endothelzellen antiapoptotisch [PETRACHE et al., 2000].

Des Weiteren scheint CO die Gallebildung und den intrahepatischen Gallefluß zu beeinflussen, da die selektive Inhibition der HO-1 und somit Senkung der CO-Konzentration mittels Zink-Protoporphyrin (ZnPP) zu einer Stimulation der Gallensäureexkretion und des Galleflusses in der Leber führte. Auch diese Prozesse waren cGMP-abhängig [SANO et al., 1997]. CO führte außerdem zu einer Steigerung der Kontraktion und Kontraktionsfrequenz der Canaliculi bilis, was einen weiteren Mechanismus zur Regulation des Galleflusses darstellt [SHINODA et al., 1998].

### 3.3.3 Fe<sup>2+</sup> und Ferritin

Ob auch das beim Hämabbau frei werdende zweiwertige Eisen (Fe<sup>2+</sup>) zu den zytoprotektiven Effekten des HO-Systems beiträgt, wird kontrovers diskutiert. Fe<sup>2+</sup> bildet sogar in niedrigen Konzentrationen mittels Fenton-Reaktion Hydroxyl-Radikale und wird deshalb als zytotoxisch angesehen [WUNDER et al., 2003]. Allerdings führt die vermehrte HO-1 Induktion nicht nur zu erhöhter Konzentration an freiem Fe<sup>2+</sup>, sondern auch zu einer vermehrten Bildung des Eisenspeicherproteins Ferritin [EISENSTEIN et al., 1991]. Ferritin wiederum gilt – im Gegensatz zu Fe<sup>2+</sup> - unabhängig von der HO-1 Aktivität als antioxidativ und somit zytoprotektiv [BALLA et al., 1992].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass parallel zum Anstieg der Ferritin-Expression auch eine Aktivitätszunahme der ATPase Pumpe zu verzeichnen ist, welche aktiv intrazelluläres Eisen aus der Zelle entfernt und somit den intrazellulären Eisenpool an Fe<sup>2+</sup> vermindert [FERRIS et al., 1999]. Der relative Anteil der ATPase Pumpe und Ferritin an den zytoprotektiven Effekten der HO-1 konnte bisher noch nicht vollständig geklärt werden.

## 3.4 Zytotoxische Effekte der HO-1

Entgegen einer Euphorie, die HO-1 als eine Art Universal-Zytoprotektor zu betrachten und dem Vorschlag, durch gezielte HO-1 Induktion vor allem Leberpathologien therapeutisch zu beeinflussen [FAROMBI et al., 2006], sind auch zytotoxische Effekte einer HO-1 Induktion beschrieben. Bei renalen Epithelzellen, die oxidativem Stress ausgesetzt werden, zeigte sich zum Beispiel eine verbesserte Überlebensrate, wenn die HO-1 zuvor selektiv inhibiert worden war [DA SILVA et al., 1996]. Ähnliche Ergebnisse erbrachten auch Untersuchungen an einem Modell des durch Tetrachlorkohlenstoff (CCl<sub>4</sub>) induzierten toxischen Leberschadens. Die Leberzellschädigung führte erwartungsgemäß zur HO-1 Hochregulation. Zusätzliche HO-1-Stimulation durch Hämin-Vorbehandlung vergrößerte aber den Leberschaden, während durch Blockade der HO-1 der Leberschaden reduziert werden konnte [EIPEL et al., 2007].

Besonders deutlich ist die schädigende Wirkung der HO-1 im Modell der biliären Leberzirrhose zu sehen, wo durch HO-1 Überexpression die Leberschädigung verstärkt wird. Sowohl die histologische Schädigung, der Transaminasenanstieg, als auch die Fibrinogenese

waren bei Tieren ohne zusätzliche HO-1 Induktion geringer ausgeprägt als bei Tieren mit zusätzlicher HO-1 Induktion [FROH et al., 2007]. Außerdem trägt die HO-1 im Modell der Leberzirrhose wesentlich zur arteriellen Vasodilatation und somit zu massiven hämodynamischen Störungen bei, welche verantwortlich sind für eine Vielzahl von schweren Komplikationen der Zirrhose wie beispielsweise das hepatorenale Syndrom, Aszites, Verdünnungshyponatriämie und hepatopulmonales Syndrom. Durch Blockade der HO-1 können die hämodynamischen Parameter im Wesentlichen normalisiert werden [CHEN et al., 2004]

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese schädlichen Effekte der HO-1 fand sich durch Untersuchungen von Suttner et al., an transfizierten Fibroblasten mit unterschiedlichem Level an HO-1 Expression, welche oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Hierbei zeigte sich, dass die HO-1 nur innerhalb eines gewissen Bereichs eine protektive Rolle einnimmt. Bei starker Überexpression jedoch ließ sich eine Umkehr der Schutzfunktion der HO-1 erkennen. Die HO-1 wirkte in diesem Fall eher zytotoxisch als zytoprotektiv, was zumindest teilweise durch die Akkumulation großer Mengen an freiem reaktivem Eisen bedingt gewesen war [SUTTNER et al., 1999].

Ein ganz ähnliches Verhalten ließ sich auch bei CO nachweisen, dem Kohlenmonoxid. Während in niedriger Konzentration die protektiven Eigenschaften dominieren, gilt CO in hoher Dosierung als toxisches Gas. Zum einen führte die Bindung von CO an Hämproteinen zu einer Unterbrechung des mitochondrialen Sauerstofftransportes und somit zur Freisetzung von Superoxid-Anionen [ZHANG et al., 1992]. Zum anderen verdrängte exzessives CO kompetitiv auch NO aus den Hämproteinen, welches in sauerstoffreicher Umgebung zur Bildung von Peroxynitrit führte, was als potentes Oxidans bekannt ist [ISCHIROPOULOS et al., 1996].

Zusammenfassend muss man also davon ausgehen, dass die HO-1 sowohl protektive als auch schädliche Eigenschaften besitzt und je nach Situation und Expression, d. h. möglicherweise in Abhängigkeit von dem jeweils gewählten Modell die eine oder andere Komponente überwiegt.

### 3.5 Inhibition der HO-1

Zur experimentellen Untersuchung der Bedeutung der HO-1 und zur eventuellen späteren klinischen Anwendung ist es nötig, die Hämoxxygenase selektiv inhibieren zu können. Schon mit der Entdeckung und Charakterisierung der HO-1 wurden diverse Metalloporphyrine als potentielle Inhibitoren dieses Enzyms identifiziert [TENHUNEN et al., 1969]. Für den eventuellen therapeutischen Einsatz einer HO-1 Blockade in vivo wurden dabei folgende Anforderungen an ein Metalloporphyrin gestellt: (1) Das Zentralatom sollte ein biokompatibles Metallion sein, (2) es sollte nicht im Gewebe abgebaut werden und (3) es sollte eine entsprechend hohe Potenz und hohe Spezifität hinsichtlich der HO-1 Inhibition besitzen [VREMAN et al., 1991]. Während zunächst Zinn-Protoporphyrin-IX (SnPP-IX) und als potenterer Blocker Zinn-Mesoporphyrin (SnMP) im Vordergrund standen [DRUMMOND et al., 1981 und 1987], wurden immer mehr Proto- und Mesoporphyrinderivate mit Zinn, Mangan, Chrom, Nickel und Magnesium auf ihre Tauglichkeit als HO-1 Inhibitoren geprüft. Hierbei nahm vor allem Chrom-Mesoporphyrin (CrMP) eine herausragende Rolle ein, weil es zumindest in vitro als potentester HO-Inhibitor identifiziert werden konnte [VREMAN et al., 1993].

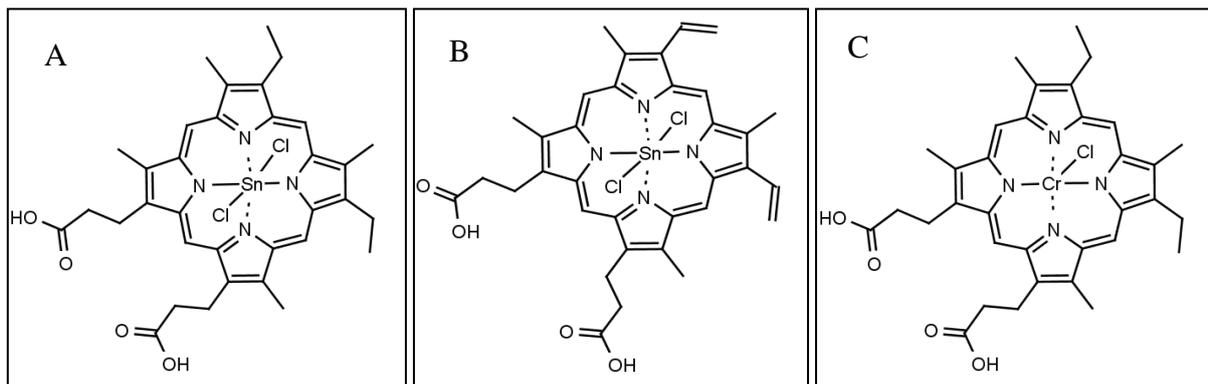


Abbildung 5, A-C: Strukturformeln gängiger Metalloporphyrine.(A): CrMP, (B): SnMP, (C): SnPP-IX

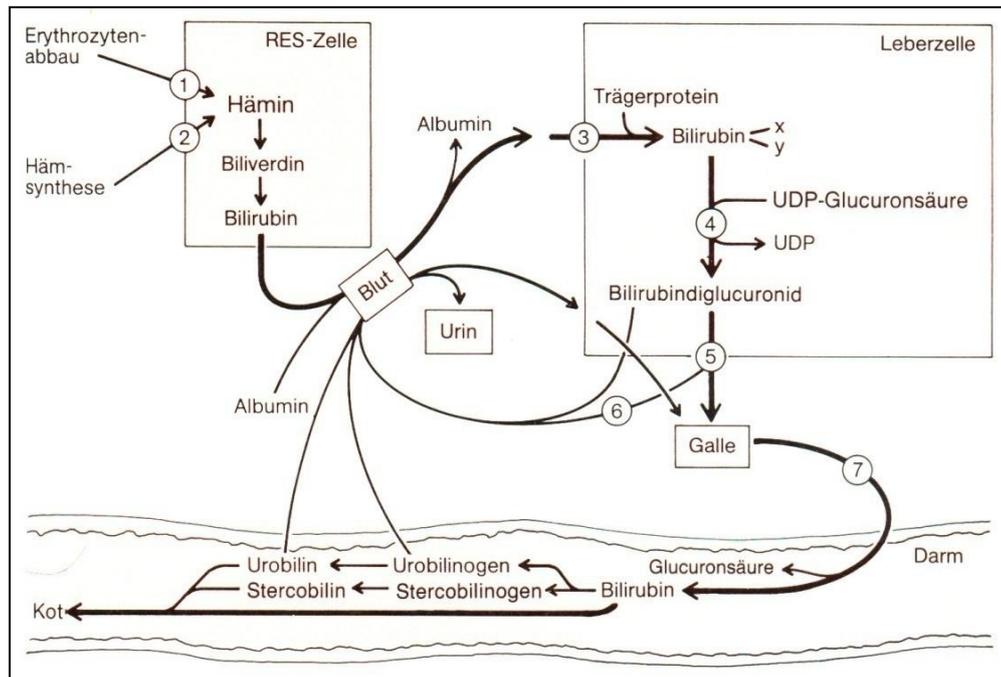
Schon bald nachdem mit dem systematischen Einsatz von Metalloporphyrinen als HO-1 Blocker in der experimentellen Forschung begonnen worden war, zeigte sich, dass die meisten Metalloporphyrine nicht nur spezifisch die HO-1 blockieren, sondern zusätzlich auch die NO-Synthetase (NOS) oder sGC [LUO et al., 1994]. Um trotzdem eine möglichst selektive HO-1 Inhibition zu bewirken, wurde für jeden Blocker eine Dosis bestimmt, in der nur die HO-Aktivität inhibiert wird, ohne die NOS-Aktivität zu beeinflussen. Da auch hier CrMP nicht nur als potentester, sondern auch als selektivster HO-1 Blocker bestimmt wurde, lag nahe zumindest in vitro CrMP als HO-1 Inhibitor zu bevorzugen [APPLETON et al., 1999]

Inwiefern sich die verschiedenen Metalloporphyrine in vivo unterscheiden, ob es Unterschiede hinsichtlich hämodynamischer Auswirkungen oder Toxizität der einzelnen Substanzen zu beobachten gibt, ist bislang nicht untersucht worden.

## **3.6 Extrahepatische Cholestase und Verschlussikterus**

### **3.6.1 Pathophysiologie der Hyperbilirubinämie/Ikterus**

Pro Tag werden durch die Hämoxygenase etwa 300 mg Bilirubin aus Häm gebildet und an Albumin gekoppelt zur Leber transportiert. Mit Hilfe der UDP-Glukuronyltransferase werden Bilirubin und Glukuronsäure in den Hepatozyten zur wasserlöslichen Form konjugiert und über die Gallenwege ausgeschieden. Im Darm wird Bilirubin zu Urobilinogen reduziert, was dem Stuhl seine charakteristische Farbe verleiht. 80% davon werden mit dem Stuhl ausgeschieden, etwa 20% gelangen nach Rückresorption über den enterohepatischen Kreislauf zurück zur Leber; ein Teil wird renal ausgeschieden [HEROLD et al., 2005]



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Bilirubinstoffwechsels mit möglichen Störungen, die zur Entstehung eines Ikterus führen können. 1=Hämolyse, 2=gesteigerter Hämabbau, 3=Mangel an Trägerprotein, 4=Störungen in der Bilirubinkonjugation, 5=Störungen der Sekretion, 6=gesteigerte Durchlässigkeit der Gallenkanalikuli, 7=Verschlussikterus (Abb. aus Pathophysiologie und Pathobiochemie, Florian Lang, 1990)

Je nach Ursache der Hyperbilirubinämie können die Ikterusformen in 3 Kategorien eingeteilt werden:

Ein prähepatischer Ikterus entsteht durch eine gesteigerte Produktion von Bilirubin, etwa bei Hämolyse, ineffizienter Erythropoese oder massiven Bluttransfusionen. Dabei ist das unkonjugierte, „indirekte“ Bilirubin im Plasma erhöht.

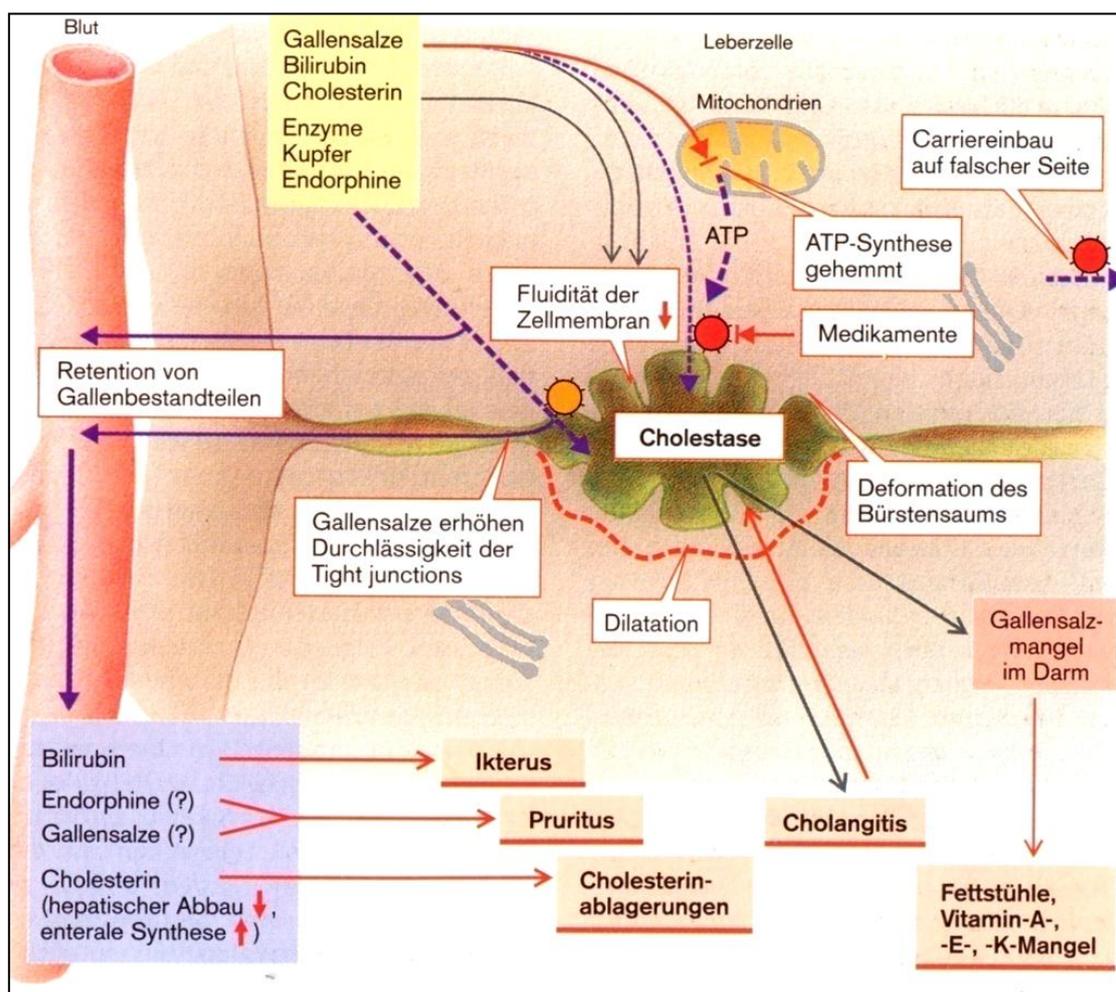
Ein intrahepatischer Ikterus beruht entweder auf einem spezifischen Defekt der Bilirubinaufnahme in den Hepatozyten, der Konjugierung (z. B. Neugeborenenikterus) oder der Sekretion von Bilirubin in die Gallenkanälchen. Hierbei kann sowohl konjugiertes als auch unkonjugiertes Bilirubin im Plasma erhöht sein. Alle drei Schritte können bei diversen Lebererkrankungen und -störungen wie z. B. Virushepatitiden, Alkoholabusus, Medikamentennebenwirkungen, Sepsis, Stauungsleber oder Vergiftungen betroffen sein.

Beim posthepatischen Ikterus liegt die Ursache in einer Obstruktion oder Kompression der intra- und extrahepatischen Gallenwege, wobei vor allem Gallensteine, Tumoren wie z. B. Pankreaskopf- oder Gallengangskarzinom, Cholangitis oder eine Pankreatitis als Grund der Abflussstörung zu finden sind. Da die Konjugation des Bilirubins – zumindest im

Anfangsstadium – ungestört ablaufen kann, kommt es hier zu einem Anstieg des konjugierten, „direkten“ Bilirubins im Serum [SILBERNAGL et al, 1998]

### 3.6.2 Pathophysiologie der Cholestase

Unter Cholestase versteht man die Retention von gallepflichtigen Substanzen im Plasma durch Stillstand der Galleausscheidung. Ursächlich dafür muss nicht grundsätzlich der „klassische“ Gallestau bei posthepatischem Verschlussikterus durch Obstruktion der extrahepatischen Gallenwege sein, auch intrahepatische Störungen mit Sistieren der Galleproduktion können zur Cholestase führen („Cholestatische Lebererkrankungen“) [POPPER et al., 1981].



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung von Mechanismen und Folgen der Cholestase. Ausführliche Beschreibung siehe Text (Abb. aus Taschenatlas für Pathophysiologie, Silbernagl S, 1998)

Pathophysiologisch liegt der Entstehung der Cholestase bzw. des durch Cholestase verursachten Leberschadens eine Erweiterung der Gallenkanälchen mit Verminderung der Fluidität der kanalikulären Leberzellmembran durch Gallensalzeinwirkung und Cholesterineinlagerung zugrunde [HYOGO et al., 2000]. Dies führt zu Deformationen des Bürstensaums dieser Zellmembran, sowie Störungen der kanalikulären Motilität. Um die intrazelluläre Konzentration an toxischen Gallensalzen zu vermindern, kommt es zum Einbau ATP-abhängiger sogenannter MRP (multidrug resistance proteins)-Carrier in die basolaterale Membran der Leberzelle, um die Gallensalze zurück ins Blut zu transportieren. Unter physiologischen Bedingungen ist dieser Transportweg quasi vernachlässigbar [ALREFEI et al., 2007]. Die so retinierten Gallensalze wiederum erhöhen zusammen mit dem gesteigerten biliären Druck die Durchlässigkeit der Tight Junctions [TOYOTA et al., 1984] und setzen die mitochondriale ATP-Synthese der Leberzelle herab.

### **3.7 Cholestase als Risikofaktor in der Chirurgie**

Die Chirurgie ist hauptsächlich mit der extrahepatischen Cholestase, bedingt durch mechanische Abflussbehinderung in den großen Gallenwegen aufgrund von Tumoren, Gallengangssteinen oder Stenosen des Ductus hepatocholedochus, konfrontiert. Vor allem bei der Resektion stenosierender Gallengangskarzinome, die oftmals auch eine erweiterte Leberresektion erfordern, stellt sich die Frage welche Rolle einer cholestatischen Vorschädigung der Leber für den postoperativen Verlauf zukommt bzw. inwieweit das Resektionsausmaß einschränkt. Obwohl man allgemein von einem cholestasebedingten erhöhten Risiko einer Leberresektion ausgeht, ist die Datenlage klinischer Studien zu dieser Fragestellung nur spärlich. Dies liegt beispielsweise daran, weil fortgeschrittene Gallengangskarzinome eher selten auftreten, in vielen Fällen inoperabel sind und insgesamt eine schlechte Prognose aufweisen. Bisher konnte keine prospektiv randomisierte Studie an einem vergleichbaren Patientenkollektiv (benigne oder maligne Grunderkrankung, gleiche Tumorstadien, keine sonstige Vorschädigung der Leber) zeigen, dass die Cholestase tatsächlich das Ausmaß einer Leberresektion limitiert, bzw. mit spezifischen sonstigen postoperativen Komplikationen vergesellschaftet ist. Allerdings wurde bereits Mitte der 80er Jahre von einer auffallenden Häufung von septischen Komplikationen und Nierenversagen bei Patienten mit ausgeprägtem Ikterus nach Operationen zur Beseitigung der biliären

Obstruktion berichtet [ARMSTRONG et al. 1984]. Als mögliche Ursache einer erhöhten Infektanfälligkeit bei Cholestase wurde eine eingeschränkte Aktivität der neutrophilen Granulozyten [SWAIN et al. 1995], der Lymphozyten [HAGA et al. 1996] sowie der Makrophagen in mesenterialen Lymphknoten [REYNOLDS et al. 1995] nachgewiesen.

Beim Vergleich von 17 Patienten mit Cholestase, die sich einer Leberresektion unterziehen mussten, mit einem historischen Kollektiv von 13 Patienten ohne Cholestase, wurde eine signifikant erhöhte Morbidität (vor allem bedingt durch postoperative Galleleckagen) gefunden [CHERQUI et al. 2000]. Die Mortalität bzw. die Inzidenz des Leberversagens war in dieser Vergleichsstudie aber in der Cholestasegruppe nicht erhöht. In einer relativ aktuellen prospektiven Untersuchung zeigte sich ebenfalls lediglich das verbliebene Restlebertvolumen nach Resektion als einziger identifizierbarer Risikofaktor für das Auftreten einer postoperativen Leberdysfunktion [FERRERO et al. 2007]. Interessanterweise war in dieser Studie die Schwelle bis zu der eine Leberresektion ausgedehnt werden kann in der Gruppe der cholestatisch bzw. chemotherapeutisch vorgeschädigten Lebern gegenüber nicht vorgeschädigten Lebern um etwa 5% erniedrigt. Im Experiment hatte sich darüber hinaus gezeigt, dass Lebern von Tieren mit Cholestase (7 Tage andauernde Gallengangsligatur) wesentlich empfindlicher auf eine 30-minütige Ischämie reagieren als Lebern nicht cholestastischer Tiere bzw. von Tieren, bei denen die Cholestase nach Gallengangsligatur wieder durch eine interne Drainage aufgehoben worden war [KLOEK et al. 2008]. Weitere tierexperimentelle Studien haben ergeben, dass eine Leberresektion verbunden mit vorbestehender Cholestase zu vermehrten portosystemischen Shunts [BAER et al. 1993], einer höheren DNA-Syntheserate und Leberzellapoptose [BIRD et al. 2002] sowie einer geringeren Proliferationsrate von Hepatozyten und einer geringeren postoperativen Körpergewichtszunahme der Tiere [TRACY et al. 1991] führt.

## 3.8 Der Darm als Motor des Leberversagens

In Zusammenhang mit der Sepsis haben Meakins und Marshall 1986 den Darm als „motor of multiple organ failure“ bezeichnet. Man geht hierbei von der Vorstellung aus, dass nach einem größeren – beispielsweise operativen – Trauma es aus vielerlei Gründen zu einer mukosalen Barrierestörung mit Erhöhung der intestinalen Permeabilität kommt [ITO et al. 2007]. Die Passage von überlebensfähigen, intestinalen Bakterien durch die Mukosa der Dünndarmwand zur extraintestinalen „sterilen“ Seite, welche als bakterielle Translokation bezeichnet wird, spielt wohl eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Endotoxinämie, Sepsis und Multiorganversagen. Jedoch ist der genaue Mechanismus, der zu der Veränderung der intestinalen Schranke gegen endoluminale Bakterien führt, noch unbekannt.

Das Leberversagen kann einerseits im Rahmen des Multiorganversagens bei Sepsis auftreten, andererseits aber kann die Leber selbst, vor allem nach zu ausgedehnten Leberresektionen oder bei Zirrhosepatienten, Ausgangspunkt einer Sepsis sein [BISMUTH et al. 1983]. Klinisch präsentiert sich ein Leberversagen als prolongierte Hyperbilirubinämie, die nicht auf einen biliären Verschluss oder eine biliäre Leckage zurückgeführt werden kann, mit zusätzlicher Aszitesbildung, Koagulopathie und Enzephalopathie [JARNAGIN et al. 2002]. Insgesamt sind die genauen pathophysiologischen Zusammenhänge der Entstehung eines Multiorganversagens und eines septischen Leberversagens noch unzureichend verstanden [SPAPEN 2008]. Im Gegensatz zu der unübersehbaren Anzahl von Studien zum Multiorganversagen bei Sepsis konzentrieren sich nur wenige Arbeiten auf die Pathophysiologie des Leberversagens nach Leberresektion, insbesondere auf die Rolle, die hierbei möglicherweise dem Darm als „Motor des Leberversagens“ zukommt.

### 3.8.1 Störungen der Darmbarriere bei Cholestase

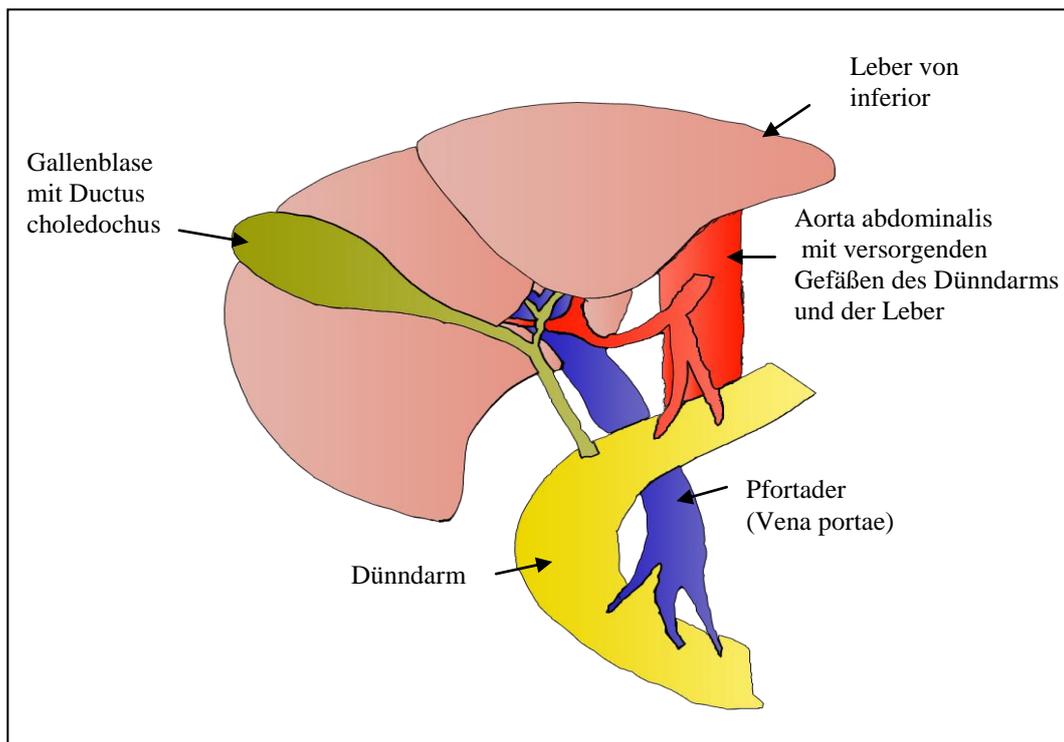
Die mechanische Gallengangsobstruktion mit konsekutivem Fehlen von Gallensäuren im Dünndarm führt sowohl zu Mukosaschäden der Darmwand als auch zu Änderungen der endogenen bakteriellen Flora mit einer Überwucherung durch pathogene Enterobakterien. Dies wiederum scheint die bakterielle Translokation aus dem Darm zu fördern und resultiert sowohl in portaler Bakteriämie und Endotoxinämie als auch in einem bakteriellen Befall

mesenterialer Lymphknoten [DIAMOND et al. 1997, DEITCH et al. 1990, SILIERI et al. 2002]. Es wäre vorstellbar, dass eine inadäquate Perfusion der Darmwand die mukosale Permeabilität erhöht [FINK et al. 1991, XU et al. 1993, SCHMIDT et al. 1996]. Im Gegensatz zu intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Leber unter Cholestase, die klar gezeigt haben, dass es hierbei zu erheblichen Störungen der Mikrozirkulation kommt [KÖPPEL et al. 1997, ITO et al. 2003], liegen vergleichbare Untersuchungen für die Mikrozirkulation des Darmes nicht vor. Histologische Analysen der Darmvilli bei Cholestase haben ein subepitheliales Ödem, welches das Epithel von der Lamina propria des Villus abhebt, dilatierte Lymphgefäße sowie ein entzündliches Zellinfiltrat in den Villi gezeigt [SLOCUM et al. 1992, DING et al. 1993, PARKS et al. 2000]. Diese histologischen Schäden sind ähnlich auch bei kritischer Perfusion des Darmes zu beobachten [CHIU et al. 1970]. Nach Ischämie/Reperfusion findet sich im Darm eine ausgeprägte Induktion von HO-1, wobei die Applikation eines HO-1 Donors zu einer Verbesserung der intestinalen Sauerstoffkonzentration im Gewebe, zu einer verbesserten mukosalen Perfusion und zu einer Reduktion der Leukozyten-Endothel-Interaktion führt [MALLICK et al. 2006]. Über die Bedeutung der HO-1 für die intestinale Perfusion bei Cholestase liegen bisher keine Daten vor.

### **3.8.2 Rolle des Darmes bei ausgedehnten Leberresektionen**

Zahlreiche Forschungsgruppen haben nunmehr seit über 75 Jahren tierexperimentell untersucht, wie weit die Leberresektion maximal ausgedehnt werden kann. Limitierender Faktor war hier Abnahme der Überlebensrate bei Zunahme des Ausmaßes der Leberresektion [HIGGINS et al. 1931, EMOND et al. 1989, COURT et al. 2004, GLANEMANN et al. 2005]. So stieg die Mortalitätsrate bei Ratten signifikant, sobald die klassische 2/3 Leberresektion überschritten wurde. Bis zu diesem Resektionsausmaß war die vollständige Leberregeneration in etwa 10 Tagen mit uneingeschränktem Überleben der Tiere die Regel [PANIS et al. 1997]. Nach 90% Hepatektomie verstarben jedoch 95% der Versuchstiere an akutem postoperativen Leberversagen [EMOND et al. 1989, GAUB et al. 1984] In der klinischen Erfahrung beobachtet man eine postoperative Leberinsuffizienz nach Resektionen, bei denen über 80% nicht vorgeschädigtes Parenchym entfernt wird [BISMUTH, 1983].

Panis et al. beobachteten im Tierexperiment eine sich schnell entwickelnde Nekrose der Restleber nach 85% Hepatektomie und führten diese auf eine Zunahme des portalen Drucks mit resultierender Hyperperfusion (Anstieg des portalen Flusses pro Lebergewebe) der Restleber zurück [PANIS et al. 1997]. Eine pathophysiologisch ähnliche Situation stellt die Leberlebenspende eines zu kleinen Transplantates dar (sog. small-for-size liver transplant). Hierbei wurde die kritische Schwelle des Transplantates bei 30% des Standard-Lebervolumens bestimmt [MAN et al. 2001]. Nach ausgedehnten Resektionen wie auch nach small-for-size Transplantation ließen sich eine Schwellung der Lebersinus, elektronenmikroskopisch auch eine Schwellung der hepatozellulären Mitochondrien sowie starke Lücken zwischen den sinusoidalen Epithelzellen und ein Kollaps des Disse'schen Raumes beobachten [PANIS et al. 1997, MAN et al. 2001]. In der small-for-size Leber kam es zu einer vermehrten HO-1 Expression [MAN et al. 2003]. Bisher zeigte im Tierversuch die HO-1 einen günstigen Einfluss auf das Transplantatüberleben nach small-for-size Transplantation [YANG et al. 2004].

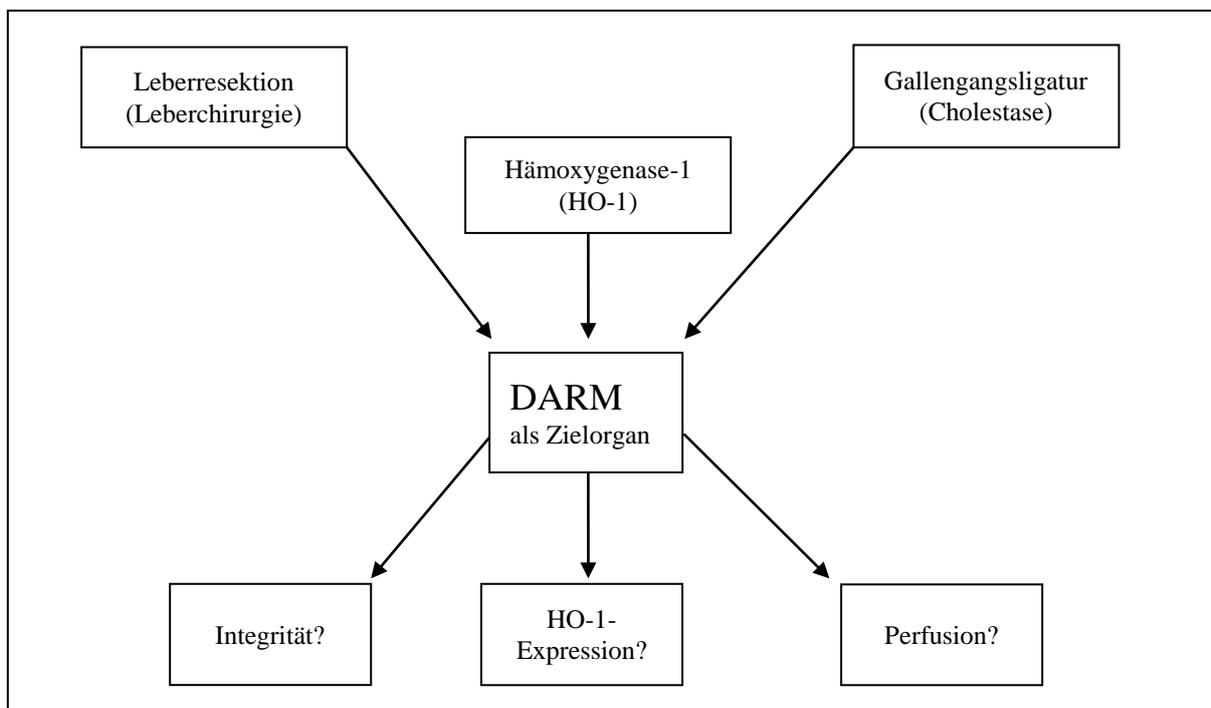


**Abbildung 8:** Leber und Dünndarm als anatomische Einheit mit den versorgenden Gefäßen

Ähnlich wie bei der Cholestase, wurden die bakterielle Translokation in mesenteriale Lymphknoten sowie die portale Endotoxinämie auch nach ausgedehnter Leberresektion beobachtet [WANG et al. 1992, WANG et al. 1994, BOERMEESTER et al. 1995]. Bereits nach 70% Leberresektion wurden topische Schäden im terminalen Ileum im Sinne einer Abnahme der Villusdicke beschrieben [RODRIGUEZ et al. 2004]. Nachdem die portale Hyperperfusion als Pathomechanismus des small-for-size Versagens bzw. des Leberversagens nach Resektion postuliert wurde und der portale Fluss durch den intestinalen Outflow (siehe Abbildung 8) bestimmt wird, scheint eine Untersuchung der intestinalen Perfusion nach ausgedehnter Leberresektion sinnvoll, zumal hierzu noch keine Daten in der Literatur vorliegen.

## 4 ZIEL DER STUDIE

Ziel dieser experimentellen Studie war es, herauszufinden inwieweit sich Cholestase oder ein großer abdomineller Eingriff wie die Leberresektion auf die intestinale Perfusion und Integrität auswirkt. Hierzu wurden 3 verschiedene Methoden zur Analyse der Darmperfusion angewendet. Im Zuge dieser Untersuchungsreihen sollte außerdem ermittelt werden, ob die intestinale HO-1-Expression hierbei eine protektive Rolle spielt.



*Abbildung 9: schematische Darstellung der Ziel- und Fragestellung der Studie*

**Im Einzelnen sollten folgende Fragen beantwortet werden:**

1. In welchem Zusammenhang stehen Cholestase und intestinale Perfusion?
2. Was geschieht im Darm, als sogenanntem Motor des Multiorganversagens, bei der letal endenden 90% Leberresektion?
3. Wirkt die Hämooxygenase-1 wirklich protektiv auf das Intestinum?
4. Wie wirkt sich die Blockade der Hämooxygenase-1 durch das Metalloporphyrin SnMP-IX auf die intestinale HO-1-Expression aus?
5. Steht die intestinale Perfusion in direktem Zusammenhang mit ihrer Integrität?
6. Welches Verfahren zur Bestimmung der intestinalen Mikro- und Makrozirkulation ist das aussagekräftigste?
7. Welches Untersuchungsverfahren der intestinalen Perfusion kann klinisch angewendet werden?

## 5 MATERIAL UND METHODEN

### 5.1 Versuchstiere

Bei allen Versuchen wurden Sprague-Dawley-Ratten mit einem Gewicht von  $300\pm 40$  g verwendet. Die Tiere entstammten einer Zucht (Charles River, Sulzfeld, Deutschland), und wurden bis zu Versuchsbeginn unter 12-stündigem Tag-Nacht-Zyklus in einem klimatisierten Raum (Raumtemperatur: 22-24 °C, Luftfeuchtigkeit: ~60%) der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Direktor: Prof. Dr. M.D. Menger) der Universität des Saarlandes gehalten. Bis unmittelbar vor Versuchsbeginn hatten die Tiere freien Zugang zu Tiernahrung (Fa. Altromin, Lage, Deutschland) und Trinkwasser *ad libitum*.

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 und wurden im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

### 5.2 Modell

#### 5.2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation für Messungen der regionalen Perfusion und Mikrozirkulation

Zur Vorbereitung der Untersuchung bekamen die Tiere in leichter Äthernarkose (Hoechst, Frankfurt/Main, Deutschland) eine intraperitoneale Applikation von Pentobarbital-Natrium (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) in einer Dosierung von 50 mg/kg KG. Nach Rasur von Hals und Bauch (Electra GH204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) sowie Lagerung auf einer 38 Grad Celsius temperierten Heizplatte (Fa.

Effenberger, Pfaffing/Attel, Deutschland) erfolgte eine mediane Inzision der vorderen Halsseite.

Zunächst wurden die Ratten tracheotomiert um eine leichtere Atmung zu gewährleisten. Hierzu wurde in die eröffnete Trachea ein Polyethylen-Tubus (Portex Polythene Tubing 800/100/460, Innendurchmesser; 1,67 mm, Außendurchmesser: 2,42 mm; Portex Ltd., Hythe, England) eingelegt und fixiert.

Nach Darstellung der Arteria carotis communis dextra und Anschlingen des Gefäßes mit Fäden der Stärke 6-0 konnte über eine Inzision der Arterienwand ein spitz angeschrägter Polyethylenkatheter (PE-50, 800/110/200, Innendurchmesser: 0,58 mm, Außendurchmesser: 0,96 mm; Portex Ltd., England) in das Gefäßlumen eingeführt und mit den vorgelegten Fäden fixiert werden. Der arterielle Katheter wurde über Dreiwegehähne an ein Druckspülsystem (Injectomat S; Fresenius, Schweinfurt, Deutschland) angeschlossen. Die kontinuierliche Spülung mit 0,9% Kochsalzlösung (1 ml/h; B.Braun, Melsungen, Deutschland) verhinderte die Okklusion des Katheters durch Thrombenbildung. Der Katheter diente der kontinuierlichen Kontrolle von Herzfrequenz und arteriellem Blutdruck und wurde an einen Druckabnehmer (Statham Typ P23 ID, Gould Inc. Oxnard, CA, USA) angeschlossen.

Entsprechend wurde die V. jugularis externa dextra in der rechten Fossa supraclavicularis aufgesucht und nach Technik der Venae sectio katheterisiert. Über den zentralvenösen Katheter erfolgten während des gesamten Studienzeitraums sowohl eine Ringer-Lactat-Gabe, abhängig vom jeweiligen Blutverlust, um einen Volumenausgleich zu erzielen als auch die Applikation des HO-1-Inhibitors SnMP und des zur Intravitalmikroskopie verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes Fluoreszein-Isotiozyanat-Dextran 150.000.

### **5.2.2 Gallengangsligatur**

Drei Tage vor dem Untersuchungszeitpunkt wurden die Tiere in Äthernarkose unter Spontanatmung versetzt. Nach Bauchrasur wurde die Narkose mittels einer vor den Atemwegen positionierten äthergetränkten Kompresse in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml, Falcontyp, Sarstedt, Nürnberg) für die Dauer des Eingriffs fortgesetzt. Wegen der Kürze des Eingriffs war hierzu keine Temperaturregelung mittels Heizplatte nötig. In ausreichend tiefer Narkose erfolgte die mediane Laparotomie. Mittels einer Klemme wurde das Xyphoid gefasst

und kranial fixiert. Durch Anheben des linken Seitenlappens und Mittellappens der Leber wurde der Gallengang sichtbar und zugänglich gemacht und schließlich mit einem nicht absorbierbaren Faden (Prolene, 4/0) in der Nähe des confluens hepaticus doppelt ligiert, um eine Verletzung des Pankreas zu verhindern. Bei Tieren der Sham-OP-Gruppen erfolgte lediglich eine Mobilisation des Ductus choledochus.

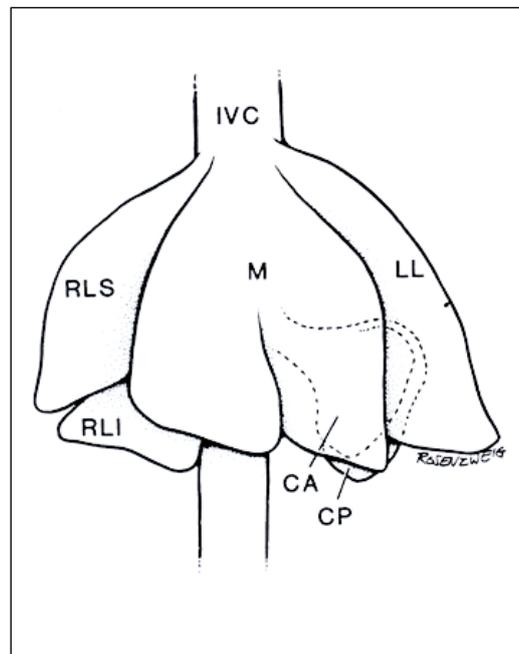
Unter Lichtschutz erfolgte eine i.v.-Applikation von 1 ml der entsprechend 5.2.4 zubereiteten SnMP-IX-Lösung bzw. 1 ml NaCl in der Kontrollgruppe in die Vena renalis sinistra. Anschließend wurde die Punktionsstelle für eine Minute komprimiert, um eine Blutstillung zu gewährleisten und ein retroperitoneales Hämatom zu verhindern.

Nach Applikation von 10 ml gewärmter Kochsalzlösung in die Bauchhöhle wurde zunächst die Muskelschicht durch eine fortlaufende Naht mit einem Faden der Stärke 4-0 (Prolene, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) und schließlich die Haut mit derselben Nahttechnik und einem nichtresorbierbaren Faden der Stärke 3-0 verschlossen. Zur postoperativen Schmerzkontrolle wurden 0,2-0,3 ml Bupivacain 0,25% subkutan injiziert.

Die Tiere kamen nach Versicherung eines körperlich stabilen Zustandes und freiem Zugang zu Wasser und Futter für 3 Tage in den Quarantänebereich der Tierhaltung.

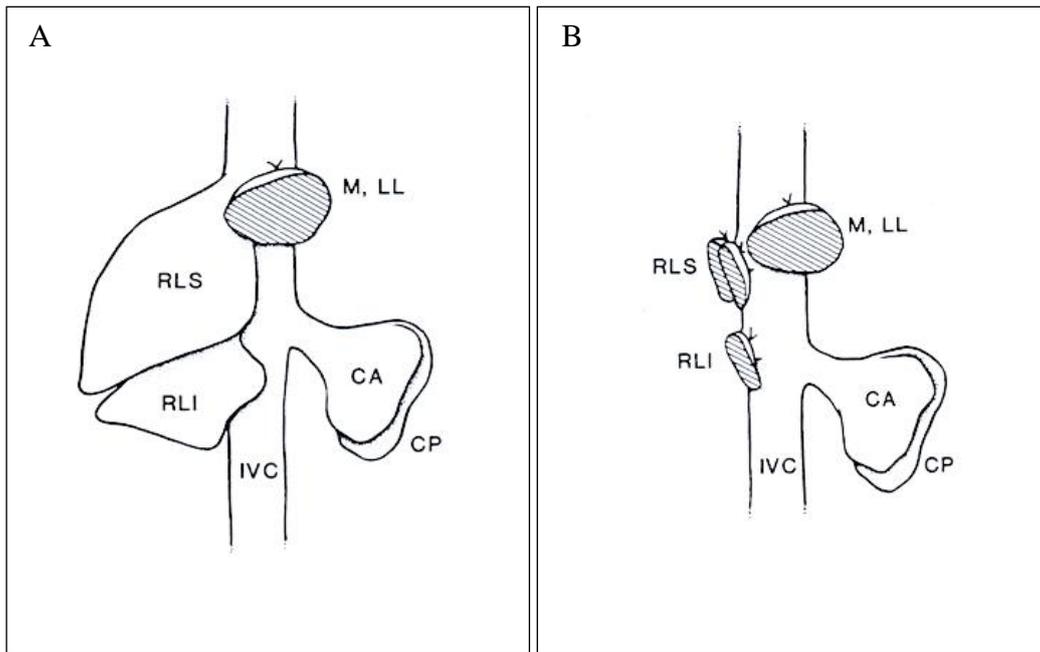
### **5.2.3 70% und 90% Leberteileresektion**

Die 90% Leberresektion wurden ebenfalls wie unter 5.2.2 dargestellt in Äthernarkose durchgeführt, da der Eingriff nur von kurzer Dauer war. Nach der medianen Laparotomie erfolgte zunächst eine 70% Leberresektion nach der Methode von Higgins und Anderson [HIGGINS und ANDERSON, 1931]. Wie in der Abbildung dargestellt, teilt sich die Rattenleber in einen mittleren und einen linksseitigen Leberlappen, sowie einem anterioren und posterioren Lobus caudatus und einem oberen und unteren rechten (lateralen) Leberlappen auf.



**Abbildung 10:** Anatomie der Rattenleber IVC=inferiore Vena cava; M=Mittellappen; LL=linkslateraler Lappen; RLS=superiorer Teil des rechten Lappens; RLI= inferiorer Teil des rechten Lappens; CA=anteriorer Teil des Lobus caudatus; CP=posteriorer Teil des Lobus caudatus.

Die standardisierte 66% bzw. 70% Leberresektion sieht eine pedikelnahe Ligatur und anschließende Resektion des Mittellappens und des linken lateralen Lappens vor. Die 90% Leberresektion wurde in Anlehnung an Emond et al. 1989 durchgeführt. Hierzu wurde über die 70% Resektion hinaus der rechte laterale Leberlappen entfernt, so dass nur mehr der Lobus caudatus mit seinen anterioren und posterioren Anteilen übrig blieb (siehe Abbildung 11). Zur Resektion des rechten Leberlappens wurde zunächst der inferiore Anteil ventral der Vena cava ligiert und abgesetzt. Anschließend wurde der superiore Anteil nach vorne links gezogen, um seine Aufhängung vom Diaphragma zu lösen. Beim Ligieren des verbliebenen rechten Restlappens wurde peinlichst darauf geachtet, die Vena cava nicht zu komprimieren bzw. bei der Entnahme nicht das Diaphragma zu verletzen.



**Abbildung 11:** Schema der 70% (A) und 90% (B) Leberresektion [Emond et al. 1989]

IVC=inferiore Vena cava; M=Mittellappen; LL=linkslateraler Lappen; RLS=superiorer Teil des rechten Lappens; RLI= inferiorer Teil des rechten Lappens; CA=anteriorer Teil des Lobus caudatus; CP=posteriorer Teil des Lobus caudatus.

Die Kontrollgruppe mit Shamoperation erhielt nach der medianen Laparotomie lediglich die Durchtrennung der Haltebänder der Leber. Im Anschluss an die 90% Leberresektion bzw. Shamoperation wurde wie unter 5.2.2 beschrieben einem Teil der Tiere SnMP bzw. NaCl in die V. renalis sinistra verabreicht. Nach Ausschluss, beziehungsweise Stillung einer Blutung, erfolgte eine Spülung des Abdomens mit körperwarmer 0,9% NaCl Lösung. Abschließend wurde mit Hilfe einer fortlaufenden Naht (4-0, Prolene, Ethicon) die Muskelschicht adaptiert und die Haut mit derselben Technik (3-0, Prolene, Ethicon) verschlossen. Um postoperative Schmerzen auszuschließen, wurde den Tieren 0,2-0,3 ml Bupivacain 0,25% subkutan injiziert.

Nach Erwachen aus der Äthernarkose wurden die Tiere für 6 Stunden wieder in Ihre Käfige mit freiem Wasser- und Futterzugang zurückgesetzt

## **5.2.4 Aufbereitung und Applikation des HO-1 Inhibitors SnMP**

Zur Aufbereitung des zu applizierenden Metalloporphyrins wurden 10  $\mu\text{mol}$  (7,54 mg)/kg KG SnMP-IX (Frontier Scientific, Lancashire, England) in 200  $\mu\text{l}$  Natrium Bicarbonat (8,4%, B.Braun, Melsungen, Deutschland) gelöst und über 1 Minute mit dem Vortex kräftig gemischt. Anschließend wurden 800  $\mu\text{l}$  NaCl (0,9%, B.Braun, Melsungen, Deutschland) zugefügt, um ein konstantes Injektionsvolumen von 1ml mit physiologischem pH-Wert zu gewährleisten. Die Lösungen wurden stets direkt vor Versuchsbeginn lichtgeschützt zubereitet, um anschließend in die Vena renalis injiziert werden zu können.

## **5.3 Untersuchungsmethoden**

### **5.3.1 Makrohämodynamik**

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde über den druckstabilen Katheter in der A. carotis communis mit Hilfe eines Statham-Druckwandlers (Statham® DTX/Plus®, Ohmeda, Erlangen Deutschland) registriert und mit einem Flachbrettschreiber kontinuierlich aufgezeichnet.

Die Herzfrequenz (HF) wurde anhand der arteriellen Blutdruckamplituden der fortlaufenden Registrierung bei einer Schreibergeschwindigkeit von 600 mm/min durch Auszählen ermittelt. Zu fixen Zeitpunkten, die an die Untersuchung der Mikrozirkulation gekoppelt waren, wurden Messwerte zu MAP und HF erhoben.

### 5.3.2 Regionale Perfusion (Videofluoreszenzangiographie)

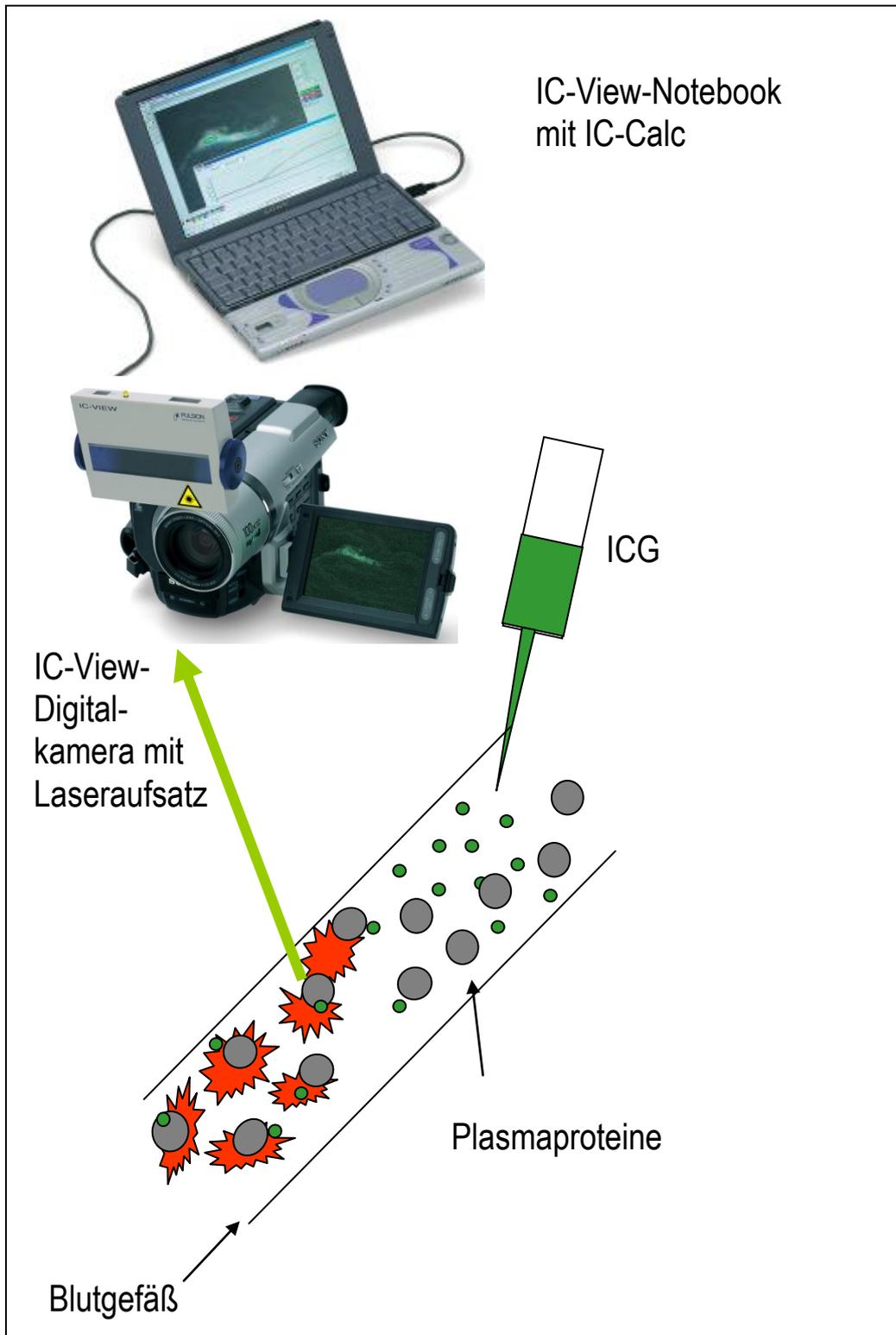
Die Videofluoreszenzangiographie (IC-View, Fa. Pulsion Medical Systems, München, Deutschland) ist eine nicht invasive Methode zur Bestimmung der Gewebepfusion. Hierzu ist die Applikation des fluoreszierenden Farbstoffes Indocyaningrün (ICG) (ICG Pulsion, Pulsion Medical Systems, München, Deutschland) nötig. Das Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von ICG mit der Summenformel  $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$  liegt im nahinfraroten Bereich. Erst durch Aktivierung von nahinfraroten Wellen wird die ICG-Fluoreszenz angeregt.

ICG besitzt die Fähigkeit, sich zu 98% an Plasmaproteine zu binden und zeigt dadurch, im Vergleich zu Fluorescein, eine geringere Leckage und eine längere Plasmaverweildauer. ICG wird nicht metabolisiert, sondern nur über die Leber in die Gallenwege ausgeschieden und nicht von der Darmschleimhaut resorbiert.

Jedoch ist bekannt, dass ICG durch Einwirkung von UV-Licht in toxische Abfallstoffe zerfällt. Dabei entstehen mehrere, noch unbekannte Stoffe. Eine aktuelle Studie zeigt aber, dass ICG (ohne UV Einwirkung) grundsätzlich als solches nicht toxisch ist [HILLENKAMP et al., 2007]. Zur Vorbereitung der Aufnahme wurde das ICG in einem lichtgeschützten Bereich mit 0,9% NaCl Lösung in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt.

#### 5.3.2.1 Aufbau

Das IC-View-System (Pulsion Medical Systems, München, Deutschland) beinhaltet eine Infrarotquelle (NIR-Leuchte, Laser Klasse 3B, 0,16 W, Wellenlänge 780 nm) und eine Digitalvideokamera, die Infrarotlicht erkennen kann (Abbildung 12). Die durch das injizierte ICG entstehende Fluoreszenz kann mit der Kamera in ein IC-View Notebook (Sony Vaio Laptop, PCG-3192, Sony, Tokyo, Japan) mit einer eigens dafür zur Verfügung stehenden Software (IC-Calc, Pulsion Medical Systems, München, Deutschland) transferiert und anschließend ausgewertet werden.



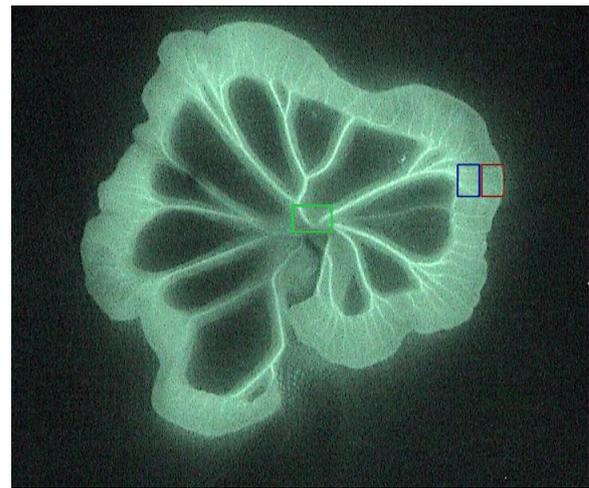
**Abbildung 12:** IC-View System mit Digitalvideokamera, aufgesetzter NIR-Leuchte und IC-View Notebook. Aufnahme des fluoreszierenden Signals nach i.v. Injektion des Indocyaningrüns (ICG), das an Plasmaproteine bindet, und Aktivierung der NIR-Leuchte.

### 5.3.2.2 IC-View-Aufnahme

Nach der unter 5.2.1 beschriebenen allgemeinen Vorbereitung erfolgte in Anlehnung an Behrendt et al. (2004) das Auslagern des Ileums in planer Ebene, um eine einheitliche Videoaufnahme des Dünndarmabschnittes zu bekommen. Dies musste mit möglichst minimaler Manipulation geschehen, um die Perfusion nicht zu beeinträchtigen. Nach Auslagerung des zu beurteilenden Dünndarmabschnittes (Abbildung 13) wurde der Kameraaufbau mit Laseraufsatz in einem Abstand von 50 cm senkrecht zur Darmoberfläche ausgerichtet. Nach Abdunkeln des Raumes und Aktivieren des Lasers wurde den Tieren zu Beginn der Videoaufzeichnung 0,1 ml/100g KG der 1:10 verdünnten ICG-Lösung über den jugulären Zugang injiziert. Das durch den Laser aktivierte Fluoreszenzsignal des ICG wurde durch einen Filter von einer Videokamera aufgezeichnet (Abbildung 14).



**Abbildung 13:**  
*Nativaufnahme des ausgelagerten Dünndarms*



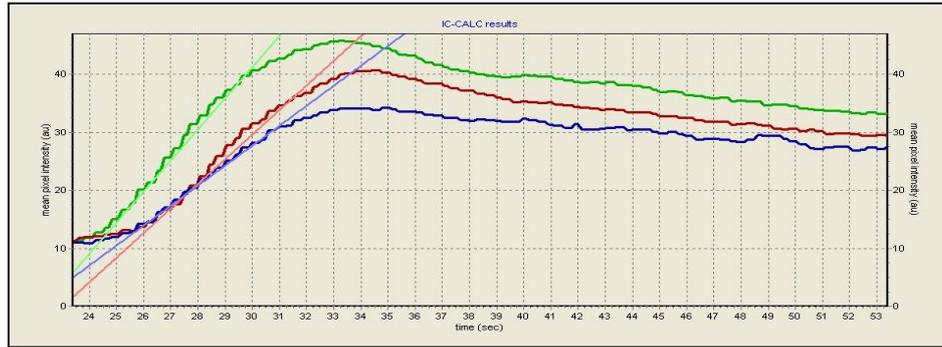
**Abbildung 14:**  
*IC-View-Aufnahme mit leuchtenden Gefäßarkaden und markierten regions of interest (grün=Mesenterialwurzel als Referenz, blau= mesenterial, rot=antimesenterial)*

### 5.3.2.3 IC-Calc-Auswertung

Die Analyse der Perfusionsaufnahmen erfolgte mittels IC-Calc Software (Pulsion Medical Systems, Deutschland). Zur Bearbeitung der Videoaufnahmen konnten diese beliebig oft abgespielt und zu gewünschten Zeitpunkten Start und Ende des zu messenden Zeitraums der Darmdurchblutung festgelegt werden. Es wurden zwei Referenzen und 2 verschiedene „regions of interest“ bestimmt, die mit Hilfe der Laptop-Maus in Form von rechteckigen Rahmen auf dem digitalen Bild eingezeichnet wurden.

Als Referenzareale wurden die Mesenterialwurzel und das mit konstanter Fluoreszenzkonzentration beigelegte Standardplättchen festgelegt. Die Mesenterialwurzel erschien nach verschiedenen Versuchen als sinnvollste Referenz, da diese das für alle zu messenden Darmabschnitte versorgende Gefäß enthielt und das Fluoreszenzsignal in den verschiedenen Messungen konstant blieb. Um Veränderungen der Darmwanddurchblutung quantitativ zu erfassen, wurden einheitlich große, rechteckige Areale jeweils mesenteriumnah als auch antimesenterial über den gesamten ausgelagerten Darmabschnitt gelegt. So erhielt man pro Tier im Schnitt 12-20 Messwerte mesenteriumnah und antimesenterial.

Bei der Analyse erfolgte die graphische Darstellung der „mean pixel intensity“ [au] pro Zeiteinheit [sec] für die Referenzregion an der Mesenterialwurzel, sowie an der Darmwand (Abbildung 15). Mit einem ICG-beschichtetem Standardplättchen wurde durch IC-Calc die bei höherer einfallender Lichtintensität automatisch herabgesetzte Empfindlichkeit der Videokameralinse aus den über den entsprechenden Regionen ermittelten Veränderungen der mean pixel intensity herausgerechnet. Im Nachhinein hatte sich aber gezeigt, dass dieser Effekt bei den durchgeführten Messungen zu keinem wesentlichen systematischen Fehler der erhobenen Messwerte geführt hätte. Für jeden der drei (Mesenterialwurzel, mesenteriumnaher Darmabschnitt, benachbarter antimesenterialer Darmabschnitt) ermittelten Kurven der mean pixel intensity/Zeiteinheit wurde die Anstiegsgeschwindigkeit berechnet. Unter der Annahme, dass eine schlechte regionale Perfusion mit einer weniger starken Anstiegsgeschwindigkeit der mean pixel intensity einhergehen würde, wurde zur besseren Vergleichbarkeit der sog. Perfusionsindex als Quotient der Anstiegsgeschwindigkeit über der Mesenterialwurzel (gesetzt als 1.0=100%) und der Darmwandabschnitte berechnet. Bei der Berechnung des Mittelwertes aus den Perfusionsindices pro Tier wurde die Unterscheidung zwischen mesenteriumnah und antimesenterial nicht mehr berücksichtigt.



**Abbildung 15:** IC-Calc Diagramm (y-Achse=mean pixel intensity [au], x-Achse=time [sec]), wobei die grüne Kurve (Steigung von 0,538=100%) den zeitlichen Verlauf der mean pixel intensity der Mesenterialwurzel als Referenz zeigt. Die rote (Steigung von 0,315=58,6%) und die blaue (Steigung von 0,202=37,6%) Kurve zeigen jeweils den Perfusionindex der ausgewählten ROIs der Darmwand.

Um die Homogenität der Darmperfusion zu überprüfen, diente die aus den erhobenen Daten berechnete Zahl der Mittelwertabweichung, welche als Maß für die Streuung innerhalb einer Gruppe definiert ist. Die Mittelwertabweichung lässt sich mit folgender Formel bestimmen:

$$MA = 1/n \sum (x - xi)$$

(MA=Mittelwertabweichung, n=Anzahl der Messwerte, x=Einzelmesswert, xi=Mittelwert)

### 5.3.3 Mikrozirkulation des Darms

Als direkte Untersuchungsmethoden der intestinalen Mikrozirkulation kamen die Laser-Doppler-Flow-Messung und die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz.

#### 5.3.3.1 Laser-Doppler-Flowmetrie

Der Laser-Doppler-Flowmeter Periflux der Firma Perimed mit eigener Software (PSW<sup>®</sup> Version 2.5, Perimed AB, Järfälla, Schweden) dient der nichtinvasiven kontinuierlichen Aufzeichnung auf einer Periflux<sup>®</sup> 5010 Unit (Perimed AB, Järfälla, Schweden) von Mikrozirkulation mittels einer Lasersonde (Abbildung 16). Dem hier angewandten Messprinzip liegt eine Frequenzänderung zu Grunde, die auftritt, wenn Licht oder andere Strahlungstypen auf sich bewegende Objekte (Blutzellen) treffen. Dieser Effekt wurde erstmals von dem Physiker Christian Doppler (1803-1853) beschrieben und nach ihm benannt. Über eine Lichtleiterfaser wird der monochromatische Laser zum Sondenkopf geführt, der direkt der mit physiologischer Kochsalzlösung benetzten Mucosa aufliegt. Das Licht tritt dadurch in das Gewebe ein und wird mehrfach gestreut. Vor dem Sondenkopf entsteht ein ausgeleuchtetes Messvolumen. Wird dieses von Blutkörperchen durchquert, so entsteht eine Frequenzverschiebung des eintreffenden Lichts, welche über einen gesonderten Kanal aufgenommen und im PC digitalisiert wird. Das Signal entspricht hierbei einer Funktion aus Zahl und Geschwindigkeit der Blutkörperchen, die das Messvolumen passieren, und wird als arbiträre perfusion units (au) ausgedrückt. Hierbei bewirkt eine Geschwindigkeit von 1mm/s eine Frequenzverschiebung von 4 kHz.

Die Sonde wurde in unserem Versuchsmodell zur Messung der intestinalen Mikrozirkulation auf 10 beliebige Dünndarmabschnitte platziert und ein Messsignal jeweils 10 Sekunden aufgenommen. Die ermittelten LDF-Werte wurden aufgezeichnet und mit einer speziellen Computersoftware (PeriSoft, Perimed, Järfälla, Schweden) ausgewertet. Für alle Laser-Doppler-Flussmessungen wurde eine Zeitkonstante von 0,2 Sekunden und eine Bandbreite von 12 kHz verwendet. Die Kalibrierung erfolgte nach der Empfehlung des Herstellers. Als eine Messung wurde das mittlere Laser-Doppler-Signal ohne Artefakte während einer Zeitspanne von 10 bis 30 Sekunden gewertet.

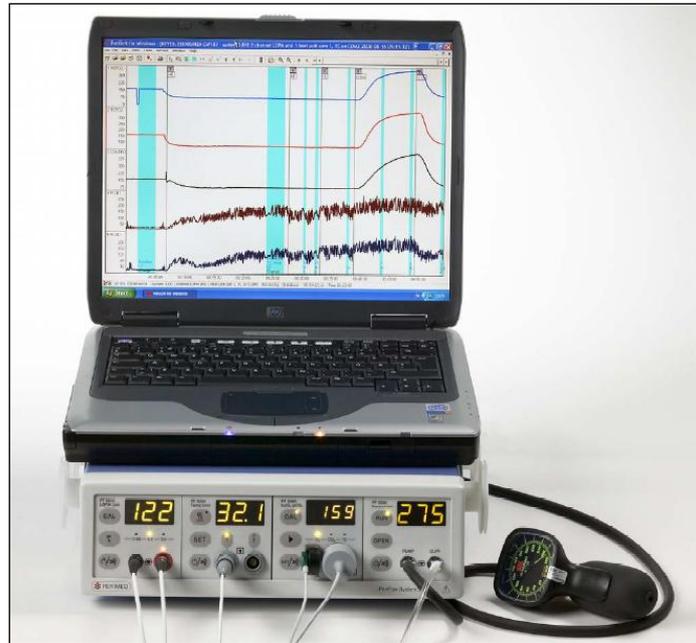


Abbildung 16: Laser-Doppler-Flowmeter Periflux mit Perimed-Software

### 5.3.3.2 Intravitalmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Eigenschaft fluoreszenzfähiger Stoffe, bei Anregung durch Licht definierter Wellenlänge ( $\lambda$ ) Lichtquanten zu emittieren. Da jedoch nicht der gesamte Anteil der einstrahlenden Lichtenergie als Licht zurückgestrahlt wird, sondern zum Teil in anderer Energieform (z. B. Wärmeenergie) abgegeben wird, werden im Vergleich zu den einfallenden Lichtquanten energieärmere Lichtquanten emittiert. Entsprechend der physikalischen Formel

$$\lambda = (h * c) / E$$

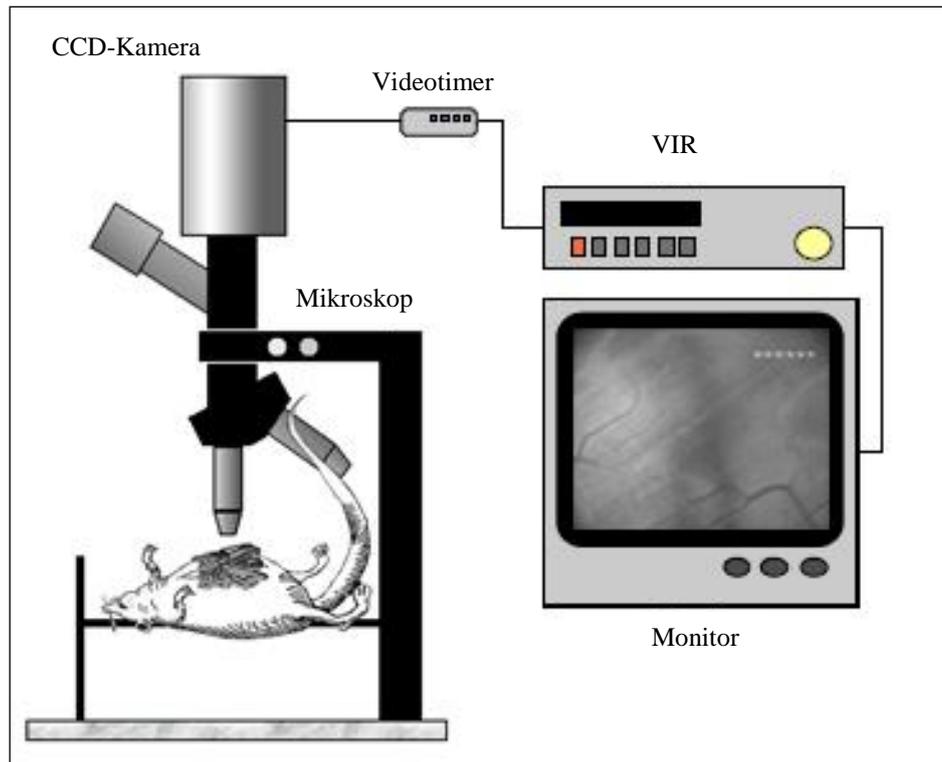
( $\lambda$ : Wellenlänge;  $h$ : Planck'sches Wirkungsquantum;  $c$ : Lichtgeschwindigkeit;  $E$ : Energie)

ist das emittierte Licht langwelliger als das anregende Licht. Das Spektrum der emittierten Wellenlängen ist hierbei unabhängig von der Anregungswellenlänge, sondern lediglich von den Fluoreszenz-Eigenschaften des angeregten Moleküls. Mit Hilfe verschiedener Filter und einer definierten Anordnung dieser kann aus dem emittierten

Wellenlängenspektrum nur das herausgefiltert werden, das für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifisch ist.

Bei den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuchen erfolgte die Intravitalmikroskopie des Intestinums 3 Tage nach Gallengangligatur bzw. 6 Stunden nach 90% Leberresektion. Hierzu diente ein modifiziertes Zeiss-Axiotech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampf-Lampe als Lichtquelle (HBO 100 W OFR, Fa. Osram, Augsburg, Deutschland), die an ein Filter-System zur Auflichtbeleuchtung angeschlossen war. Der Filterblock entsprechend des gewählten Farbstoffes Fluoreszein-Isothiocyanat (Filterblock Nr.15, Erregungswellenlänge: 450-490 nm, Emissionswellenlänge: >515 nm) konnte in den Strahlengang eingebracht werden. Die mikroskopischen Bilder wurden von einer hochempfindlichen CCD (charge coupled device) Videokamera (FK 6990; Lichtempfindlichkeit  $10^{-2}$  lux; Prospective Measurements, San Diego, California, USA) aufgenommen und über einen Bildschirm (33 cm Bildschirmdiagonale; PVM-1444 QM, Sony, München) an einen S-VHS-Videorecorder mit einer Aufzeichnungsrate von 50 Bildern pro Sekunde (AG-7350, Panasonic, Ratingen, Deutschland) weitergeleitet. Während des Studienzeitraumes wurde der S-VHS-Videorecorder durch einen DVD-Recorder (Panasonic, Hamburg, Deutschland) ersetzt. Ein zwischen Videokamera und Bildschirm geschalteter Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokyo, Japan) diente zur gleichzeitigen Einblendung und Aufnahme der Zeit in Minuten, Sekunden und Hundertstel-Sekunden.

Für Übersichtsaufnahmen wurde ein 10xObjektiv (numerische Apertur [n. a.]: 0.30, Zeiss) mit langem Arbeitsabstand, für die quantitativen Analysen der intestinalen Mikrozirkulation ein 20xWasser-Immersionsobjektiv (n. a.: 0.50, Zeiss) eingesetzt. Mit den verwendeten Objektiven konnten eine 360fache bzw. 720fache Gesamtvergrößerung auf dem Bildschirm der Aufnahmeeinheit erzielt werden.



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung des Arbeitsplatzes zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Das Versuchstier liegt auf dem Operationstisch, in den eine Heizplatte integriert ist. Hierbei wird der Darm auf einem Metallstativ ausgelagert und mit einem Deckglas (24x32 mm) versehen. Das verstellbare Stativ erlaubt die plane Oberfläche des Dünndarms nahezu frei von Atemexkursionen parallel zur Fokusebene des Mikroskops zu positionieren. (VIR = S-VHS-Videorecorder/DVD-Recorder)

Zu Beginn der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde Fluoreszein-Isothiocyanatmarkiertes Dextran (FITC-Dextran 0,5%, MG 150.000, Exzitationsmaximum 490 nm, 0,1 ml/100g Körpergewicht i. v., Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland) verabreicht. FITC-Dextran führt zu einer Kontrastierung des Blutplasmas und erlaubt dadurch die Erfassung der Perfusion, der Flussgeschwindigkeit und des Gefäßdurchmessers.

#### 5.3.3.2.1 *In-Vivo-Aufnahme*

Nach erfolgter medianer Relaparotomie wurde mit der Darstellung des caecumnahen Ileumabschnittes begonnen. Der zu beurteilende Abschnitt wurde unter größter Vorsicht und der Zuhilfenahme zweier befeuchteter Wattestäbchen auf ein eigens konstruiertes Metallstativ gehoben, sodass der Dünndarm nicht verletzt wurde und die bereits berührten Stellen nicht im Gesichtsfeld lagen. Um eine Auskühlung und –trocknung des restlichen ausgelagerten Darms zu verhindern, erfolgte eine kontinuierliche Befeuchtung mit auf Körpertemperatur erwärmter Kochsalzlösung. Zudem befand sich das Tier für die gesamte Dauer des Versuches auf einer 38 Grad Celsius temperierten Wärmeplatte. Der gesamte Aufbau wurde auf das ZEISS Fluoreszenzauflichtmikroskop mit Wasserimmersionsoptik verbracht.

Um die mikrovaskuläre Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten sichtbar und messbar zu machen, wurde zu Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchungen über die kanülierte Vena jugularis dextra 0,1-0,2 ml FITC-Dextran (Molekulargewicht 150.000) appliziert. Mikroskopiert wurde nun die Tunica muscularis der 3 Dünndarmabschnitte Duodenum, Jejunum und Ileum zu je 5 Gesichtsfeldern und anschließend die Villi der Tunica mucosa im Ileum. Für die Dauer von 20 Sekunden wurde jedes Gesichtsfeld auf Videokassette aufgenommen. Nach der Aufnahme von 5 randomisiert ausgewählten Gesichtsfeldern der Tunica muscularis des distalen Ileums erfolgte die Aufnahme derselben Schicht von Jejunum und Duodenum. Schließlich wurde eine weiter kranial gelegene Stelle des Ileums längs inzidiert und eröffnet, sodass nun möglichst wenig durch die bisherigen Untersuchungen beeinträchtigte Villi der Tunica mucosa ausgelagert und aufgenommen werden konnten.



**Abbildung 18:** Intravitalmikroskopische Aufnahme der Tunica muscularis mit kontrastierten Gefäßen. Vergrößerung  $\times 465$ .

#### 5.3.3.2.2 *Offline-Analyse der mikrozykulatorischen Parameter*

Zur Offline-Auswertung der auf VHS bzw. später auf DVD aufgenommenen Darmabschnitte kam das computerunterstützte Programm CapImage (Cap-Image, Zeintl, Heidelberg, Deutschland) und ein DVD-Player (Panasonic, Hamburg, Deutschland) zum Einsatz. Analysiert wurden die Anzahl perfundierter und nicht-perfundierter Gefäße, der Durchmesser der Gefäße und die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten.

##### 5.3.3.2.2.1 *Perfundierte und nicht-perfundierte Gefäße*

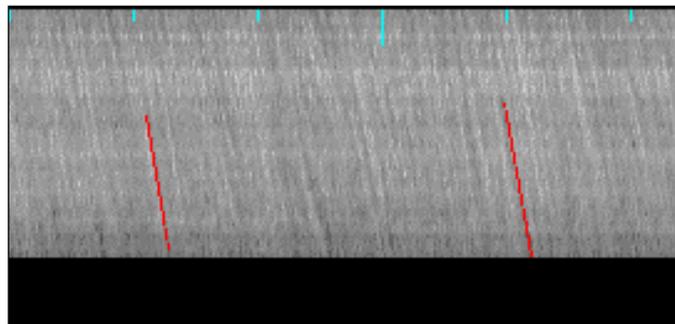
Um erkennen zu können, welche Gefäße perfundiert sind und welche nicht, musste die Analyse am laufenden Film erfolgen. Gezählt wurden dann die perfundierten Gefäße eines Gesichtsfeldes, welche an einem stetigen Fluss zu erkennen waren und die nicht-perfundierten, die durch stagnierende dunkel gefärbte Erythrozyten ebenfalls deutlich sichtbar waren. Die gezählten nicht-perfundierten Gefäße wurden dann in Prozent zur Gesamtzahl aller gezählten Gefäße ausgedrückt.

#### 5.3.3.2.2.2 *Durchmesser*

Der Gefäßdurchmesser ist definiert als der Abstand zwischen den zwei gefäßbegrenzenden Endothelwänden. Zu messen galt es das Gefäß, dessen Blutflussgeschwindigkeit bestimmt wurde, um einen eventuellen Zusammenhang erkennen zu können. Dies erfolgte mittels mehrfacher Einzeichnung einer Messlinie im Innendurchmesser des Gefäßes am eingefrorenen Bild. An drei verschiedenen Stellen fand diese Art der Messung statt. Als Ergebnis wurde der Mittelwert aus den drei Zahlen in  $\mu\text{m}$  bestimmt.

#### 5.3.3.2.2.3 *Fließgeschwindigkeit*

Zur Bestimmung der erythrozytären Fließgeschwindigkeit wendeten wir die Line Shift Methode an. Hierzu wurde jeweils eine etwa 10 Sekunden lange Bildsequenz ausgewählt. Mit der Laptop-Maus wurden eine oder mehrere gerade oder beliebig gekrümmte Messlinien entlang des Blutgefäßes gezogen. Während der Messung werden die Grauwertdaten entlang der Messlinie gelesen und im Bildspeicher als vertikale Linien nebeneinander aufgezeichnet. Dabei ist die Messung umso genauer, je länger die Messlinie ist [HARRIS et al. 2000]. Bewegt sich während der Messsequenz eine helle Plasmalücke entlang der Messlinie, so wird die Fortbewegung im Diagramm als helle, schräg verlaufende Linie sichtbar. Erythrozyten hingegen werden als dunkle Linien abgebildet. Dies wird als Line Shift Diagramm bezeichnet.



**Abbildung 19:** Darstellung eines Line Shift Diagramms zur Messung der Fließgeschwindigkeit

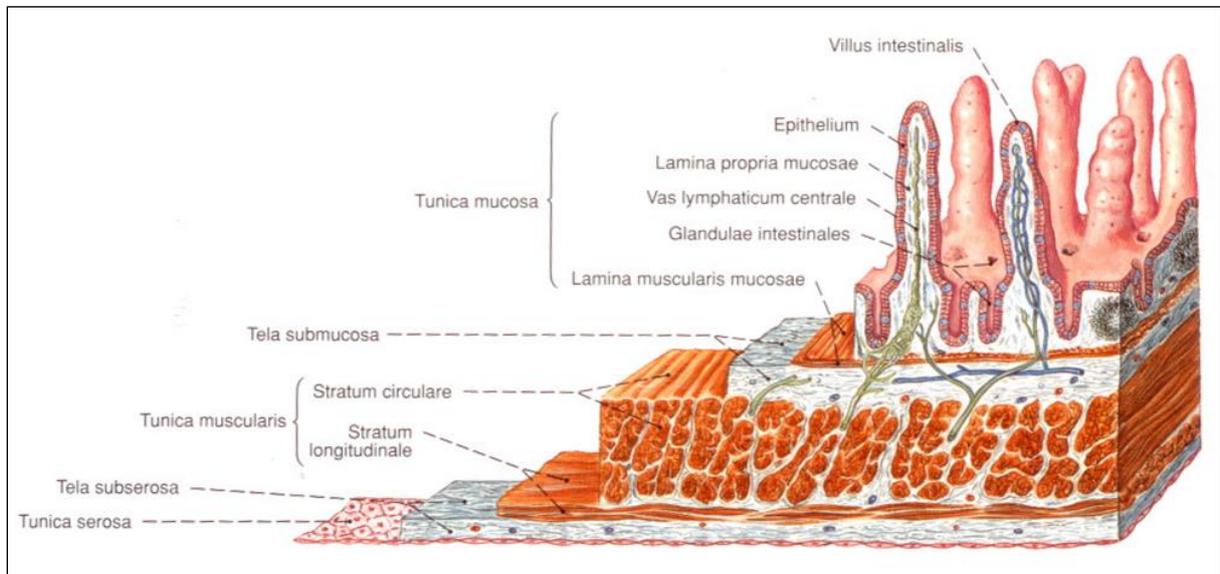
Durch Anklicken dieser schrägen Linien wird automatisch deren Steigung ermittelt (die Y- Achse repräsentiert die Distanz entlang der Linie und die X- Achse entspricht der Zeit) und daraus die Geschwindigkeit in mm/s berechnet. Von diesen Linien wurden 7 ausgewählt. Aus den 7 sich ergebenden Zahlen wurde der Mittelwert der Fließgeschwindigkeit des Blutes in mm/s berechnet. Auf diese Weise wurde in 4 Dünndarmabschnitten zu je 5 Gesichtsfeldern ein Gefäß untersucht. Die Maximalgeschwindigkeit, welche mit Cap Image gemessen werden kann, liegt bei etwa 1,5 mm/sec. Wird diese überschritten, so kommt es aufgrund der begrenzten Frame-Rate des S-VHS Videorecorders zu Messungenauigkeiten [HARRIS et al. 2000, LINDERT et al. 2002, MATHURA et al. 2000].

### **5.3.4 Probenentnahme**

Nach den Untersuchungen wurde den Versuchstieren das Ileum zu histologischen Analysen entnommen und eine Überdosis Pentobarbital verabreicht. Das entnommene Gewebe wurde in 4%-igem Phosphat-gepuffertem Formalin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für etwa 3-4 Tage fixiert und anschließend zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung in Paraffinwachs eingebettet.

### **5.3.5 Histologische Analysen**

Der Dünndarm besteht aus 5 Wandschichten (siehe Abbildung 20). Die Schleimhaut des Darms, also die Tunica mucosa beinhaltet den Randsaum aus einschichtigem Säulenepithel, die Lamina propria mucosae aus retikulärem Bindegewebe und die Lamina muscularis mucosae mit glatten Muskelzellen. Die Epithelzellen werden aus protektiven Gründen von einer Schleimschicht überzogen, der sog. Glykokalix. Darunter folgt die Tela submucosa und die für die Transportleistung zuständige Tunica muscularis mit dem Stratum circulare und Stratum longitudinale. Die untersten beiden Schichten bilden die Tela subserosa und die Tunica serosa [VOSS HERRLINGER, 1988].



**Abbildung 20:** *Intestinum tenue, Wandschichten stufenweise abgetragen [SOBOTTA Atlas 21. Auflage]*

Die in Paraffinwachs eingebetteten Gewebeproben wurden mit einem Mikrotom in Schnitte mit 4  $\mu\text{m}$  Dicke in Dünnschnitt-Präparationstechnik geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Die fixierten Schnitte wurden entparaffiniert und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

### 5.3.5.1 Villusschaden

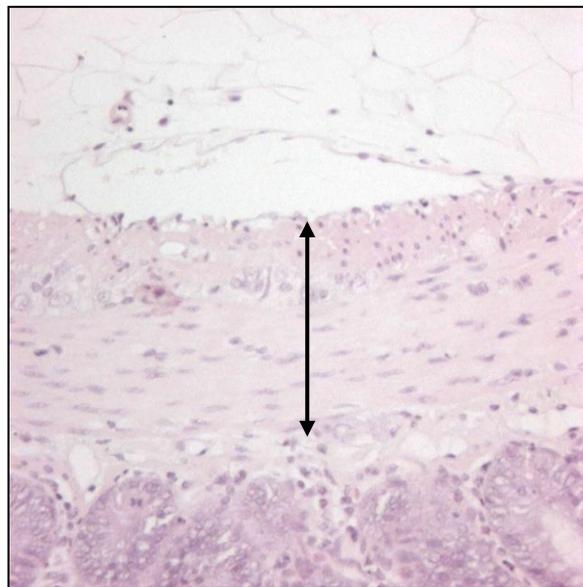
Die Auswertung der HE gefärbten Darmhistologien erfolgte an einem Olympus BX60 Lichtmikroskop mit einer angeschlossenen Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc). Es wurden pro Gewebeschnitt jeweils 10 Gesichtsfelder (high power fields HPF, x40 Objektiv) bei 400facher Vergrößerung analysiert. Betrachtet wurde die Intaktheit der ilealen Villi und Beschädigungen der Villi nach dem Schema von Chiu et al. semiquantitativ ausgewertet.

Grad	Beschreibung
0	Normale Villi
1	Subepithelialer Raum an der Spitze des Villus
2	Ausbreitung des subepithelialen Raumes an der Spitze des Villus mit mäßiger Abhebung der Mucosa von der Lamina propria
3	Ausgedehnte Abhebung von der Lamina propria entlang der Villi, Ulzerationen der Tips
4	Denudierte Villi
5	Völlige Auflösung der Lamina propria

**Tabelle 1:** Schema zur Bestimmung des ilealen Schadens [CHIU et al. 1970]

### 5.3.5.2 Muscularisdicke

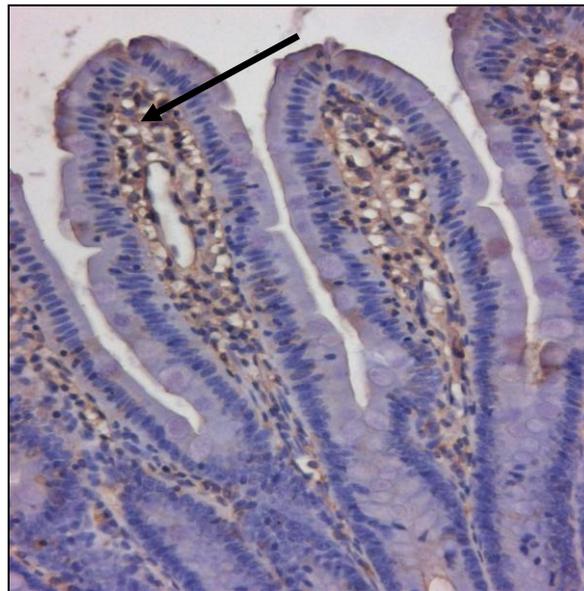
Die Tunica muscularis wurde an 10 Stellen des jeweiligen Präparates mit dem 40er-Objektiv am PC-Bildschirm in einer Gesamtvergrößerung von 720 in ihrer Höhe gemessen und die Werte notiert. Schließlich wurde der Mittelwert hieraus für die Statistik verwertet.



**Abbildung 21:** Stärke der Tunica muscularis mit Stratum circulare und Stratum longitudinale des Ileums in 400facher Vergrößerung, markiert durch den Pfeil.

### 5.3.6 Immunhistochemische Analysen

Die in Paraffinwachs eingebetteten Gewebeschnitte wurden im Xylolbad entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100–70% Ethanol) bewässert. Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung gegen Häm-Oxygenase-1 durchgeführt. Dabei wurde als Primärantikörper ein rabbit-anti-rat-HO-1-Antikörper (Stressgen Biotechnol Corp, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein goat-anti-rabbit-Antikörper (Amersham, Freiburg, Deutschland; 1:100). Anschließend wurden die Schnitte mit aktiviertem Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid inkubiert. Nach Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% Ethanol) entwässert, mit Xylol entparaffiniert und eingedeckt.



**Abbildung 22:** Hämoxxygenase-1-Färbung mit HO-1 positivem Stroma (siehe Pfeil) und HO-1 negativen Randsaumzellen (Grad 2). Vergrößerung x40

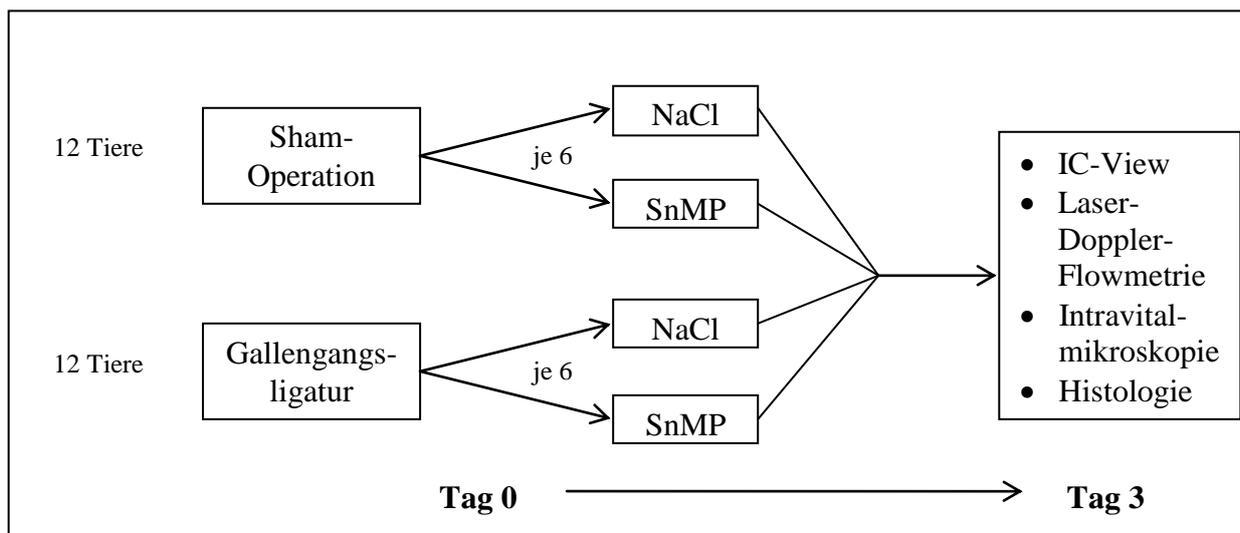
In den verschiedenen Versuchsgruppen sollte das Ausmaß der Häm-Oxygenase-1 Expression bestimmt werden. Hierbei unterschieden sich HO-1 positive Zellen von HO-1 negativen Zellen durch eine deutliche Braunfärbung. Aufgrund der relativ hohen Zahl an HO-1 positiven Zellen kam hier eine semiquantitative Ermittlungsmethode zur Anwendung. Festgelegt wurden 5 Grade des Anteils HO-1 positiver Zellen. Zur näheren Erläuterung konnte festgelegt werden, dass keine oder vereinzelt vorkommende braun gefärbte Zellen

Grad 0 entsprachen. Muscularisnahes, flächenhaft HO-1 positiv erscheinendes Stroma wurde Grad 1 zugeteilt. Ein durchwegs HO-1 positives Stroma mit HO-1 negativem Randsaum entsprach Grad 2 (siehe Abbildung 22), mit zusätzlich eher vereinzelt braun gefärbten Randsaumzellen Grad 3. HO-1 positives Stroma mit überwiegend HO-1 positivem Randsaum war Grad 4 zuzuordnen.

## 5.4 Experimentelles Protokoll

### 5.4.1 Gallengangsligatur

Untersucht wurden 24 Tiere, aufgeteilt in 4 Gruppen mit einer jeweiligen Gruppenstärke von 6 Tieren. Die Hälfte der Versuchstiere bekam eine Gallengangsligatur. Zur Kontrolle wurden die anderen 12 Tiere Sham-operiert. Um die Auswirkung der Hämoxxygenase-1-Blockade zu untersuchen, bekamen wiederum die Hälfte der gallengangsligierten Tiere und die Hälfte der Sham-operierten Tiere den HO-1-Blocker SnMP-IX in die Vena renalis injiziert.

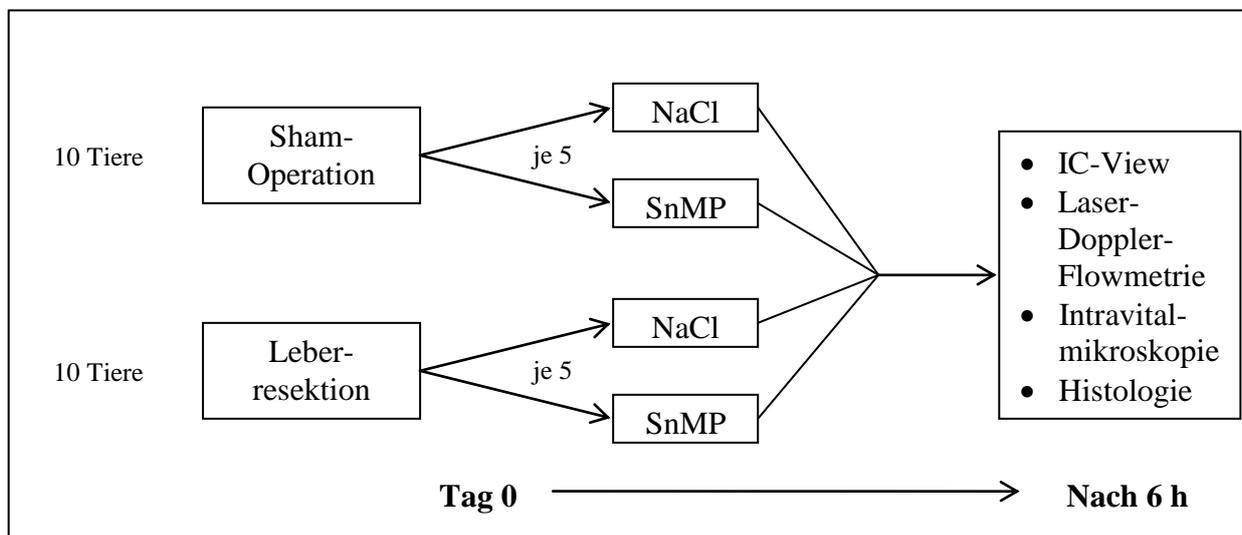


**Abbildung 23:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Versuchsreihe „Gallengangsligatur“. Insgesamt wurden hierzu 24 Tiere untersucht.

Nach 3 Tagen in Quarantäne mit freiem Futterzugang und Wasser ad libitum wurden die Tiere dem Untersuchungszyklus mit Intravitalmikroskopie, Periflux und IC-View zur Bestimmung der intestinalen Perfusion unterzogen. Hierbei wurde sowohl kontinuierlich Herzfrequenz, Blutdruck und Körpertemperatur erfasst, als auch das Körpergewicht am Tag 0 und Tag 3. Abschließend wurde zur histologischen und immunhistochemischen Untersuchung Gewebe asserviert.

#### 5.4.2 90% Leberteilresektion

Die Einteilung der Gruppen erfolgte analog der Gallengangsligaturstudie. Untersucht wurden 20 Tiere, aufgeteilt in 4 Gruppen mit einer jeweiligen Gruppenstärke von 5 Tieren. Die Hälfte der Versuchstiere bekam eine 90%ige Leberresektion. Zur Kontrolle wurden die anderen 10 Tiere Sham-operiert. Um die Auswirkung der Hämoxxygenase-1 Blockade zu untersuchen, bekamen wiederum die Hälfte der leberteilresezierten Tiere und die Hälfte der Sham-operierten Tiere den HO-1-Blocker SnMP-IX in die Vena renalis injiziert.



**Abbildung 24:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs der Versuchsreihe „90% Leberresektion“. Insgesamt wurden hierzu 20 Tiere untersucht.

Da die Tiere bereits 6 Stunden nach Operation untersucht wurden, war es nicht nötig sie für diese Zeit in den Quarantänebereich zu verbringen. Entsprechend den gallengangsligierten Gruppen wurde auch hier die intestinale Perfusion mittels Intravitalmikroskopie, Periflux und IC-View untersucht. Ebenso wurden Herzfrequenz,

Blutdruck, Körpertemperatur und -gewicht festgehalten und abschließend Gewebeproben des Ileums entnommen.

## 5.5 Statistik

Bei der Auswertung des Videomaterials, der histologischen und immunhistochemischen Schnitte und der Laser-Doppler-Untersuchungen wurden die während der primären Datenerfassung erhobenen Daten zunächst tabellarisch auf Papier festgehalten. Erst nach abgeschlossener Datenerhebung kam es zur elektronischen Datenverarbeitung durch Eingabe in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel). Die so erhobenen Ergebnisse wurden unter Verwendung der Software SigmaPlot (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA) in Säulendiagrammen als absolute oder prozentuale Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes ( $MW \pm SEM$ ) dargestellt.

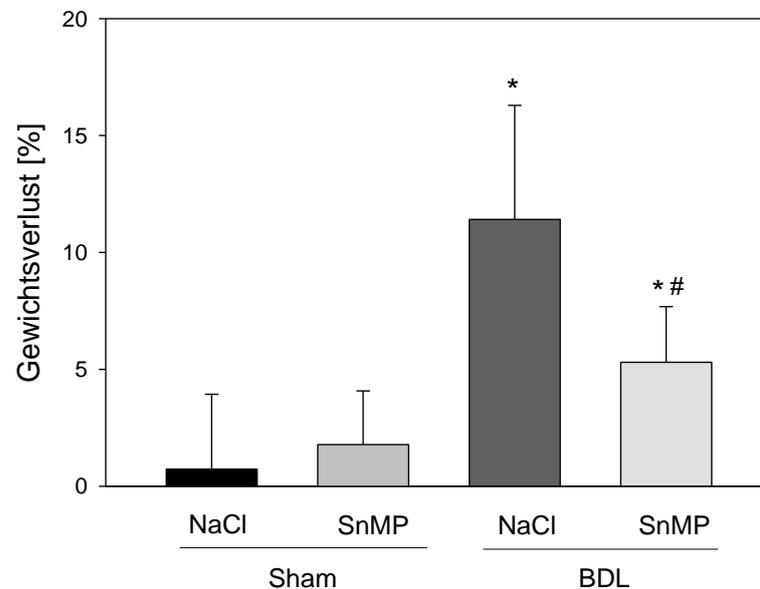
Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen unter Verwendung der SigmaStat® Statistical Software, Version 2.03 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Es erfolgte ein one-way ANOVA gefolgt von einem Holm-Sidak-Test als post-hoc Test. Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  wurden Unterschiede in den Ergebnissen als signifikant angenommen. Beim Auftreten signifikanter Unterschiede wurde keine weitere Unterscheidung hinsichtlich bestimmter Signifikanzniveaus getroffen.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Auswirkungen der HO-1 Blockade und Gallengangsligatur auf die intestinale Perfusion und Integrität

#### 6.1.1 Überleben und Gewichtsverlauf

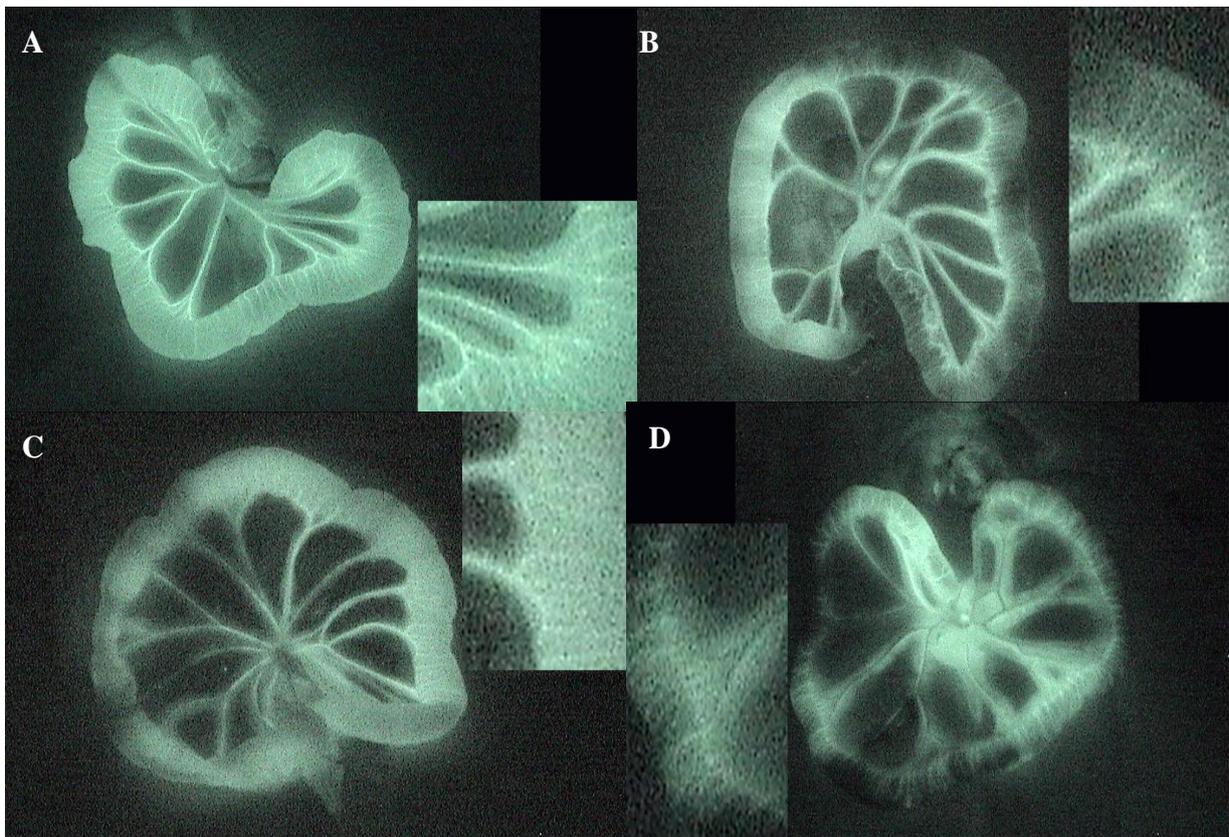
Alle Tiere haben den gesamten Beobachtungszeitraum von 3 Tagen nach Sham-Operation bzw. Gallengangsligatur (BDL) mit oder ohne HO-1 Blockade überlebt. Während die sham-operierten Tiere im Verlauf der 3 Tage ihr Ausgangsgewicht konstant beibehielten, führte die BDL-Operation zu einem drastischen Gewichtsverlust von 11,4% bezogen auf das Ausgangsgewicht (Abbildung 25). Dieser Gewichtsverlust konnte durch die zusätzliche Gabe von SnMP bei BDL signifikant auf etwa die Hälfte reduziert werden.



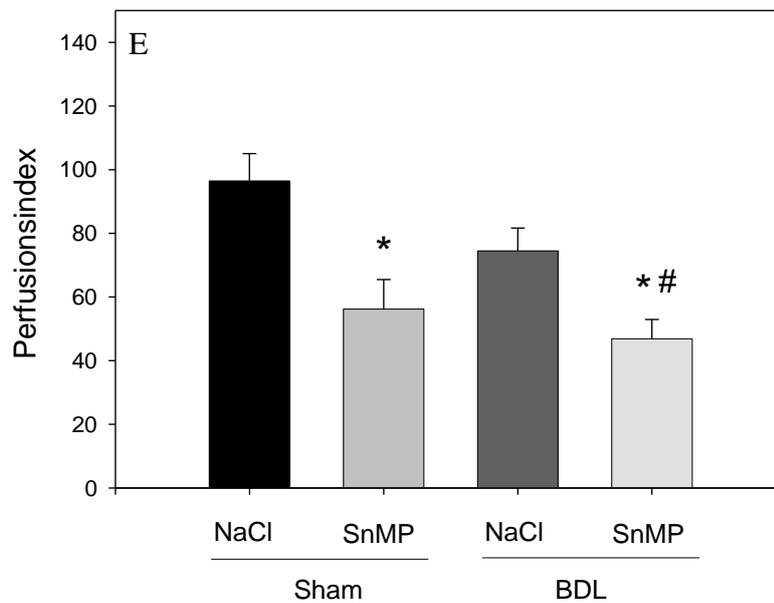
**Abbildung 25:** Postoperativer Gewichtsverlust nach einem Beobachtungszeitraum von 3 Tagen im Vergleich zum Ausgangsgewicht. MW  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl; # $p < 0,05$  vs BDL+NaCl

## 6.1.2 Einfluss von Gallengangsligatur und HO-1 Blockade auf die regionale Darmperfusion

Im Vergleich zur Kontrolle nach Sham-Operation (Abbildung 26, A), war die Perfusion der Darmwand nach HO-1 Blockade signifikant reduziert (Abbildung 26, B). Nach BDL waren zwar auch die ermittelten Werte für die Perfusion vermindert, jedoch war dieses Ergebnis nach Testung nicht signifikant. Auffallend war, dass sich die ermittelten Perfusionsstörungen nicht homogen über den gesamten ausgelagerten Darmabschnitt erstreckt haben, sondern fleckförmig neben Arealen mit anscheinend normaler Perfusion bzw. Hyperperfusion lagen.

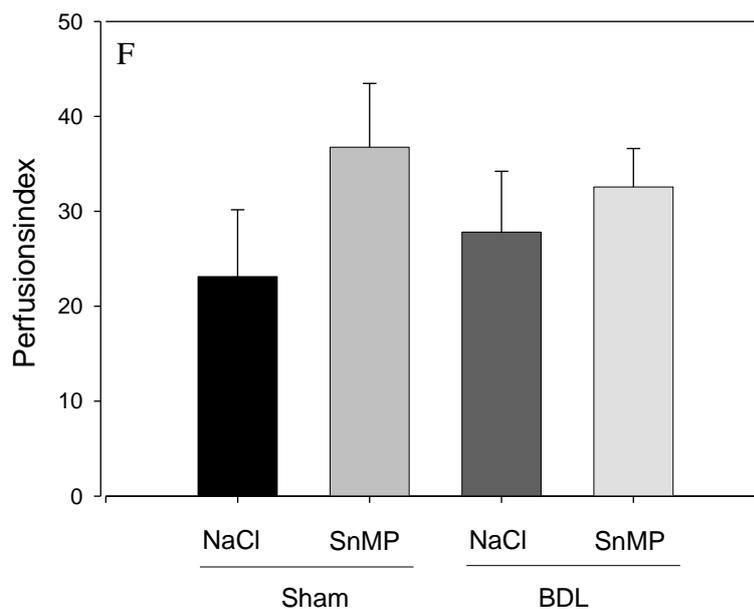


**Abbildung 26, A-D:** Videofluoreszenzangiographie ausgelagerter Dünndarmabschnitte. Während sich drei Tage nach Sham-Operation (A) eine regelhafte Perfusion mit typischer Darstellung der Gefäßarchitektur zeigt, ist die Darmwand nach HO-1 Blockade und Sham-Operation (B) und in geringerem Maße auch 3 Tage nach BDL (C) weniger homogen kontrastiert. Stattdessen finden sich fleckförmige, minderperfundierte Areale, eine weniger scharfe Gefäßzeichnung aufgrund eines Darmwandödems, sowie eine vermehrte Tortuosität der Gefäße. Die am meisten pathologischen Veränderungen waren in der Gruppe mit BDL und HO-1 Blockade (D) zu finden.



**Abbildung 26, E:** Perfusionsindex (Anstieg der Mean pixel intensity der Darmwandabschnitte im Vergleich zur Referenz [100%] an der Mesenterialwurzel) drei Tage nach Sham-Op bzw. BDL.  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl; # $p < 0,05$  vs BDL+NaCl.

Da dieses Phänomen der fleckförmigen Alterationen der Perfusion möglicherweise dem üblichen Auswertemodus mit Berechnung des Perfusionsindices entgangen sein könnte, wurde zusätzlich noch die Mittelwertabweichung der ermittelten Perfusionsindices aller ausgemessenen Darmwandabschnitte, wie unter Kapitel 5.3.2.3 ausgeführt, berechnet.



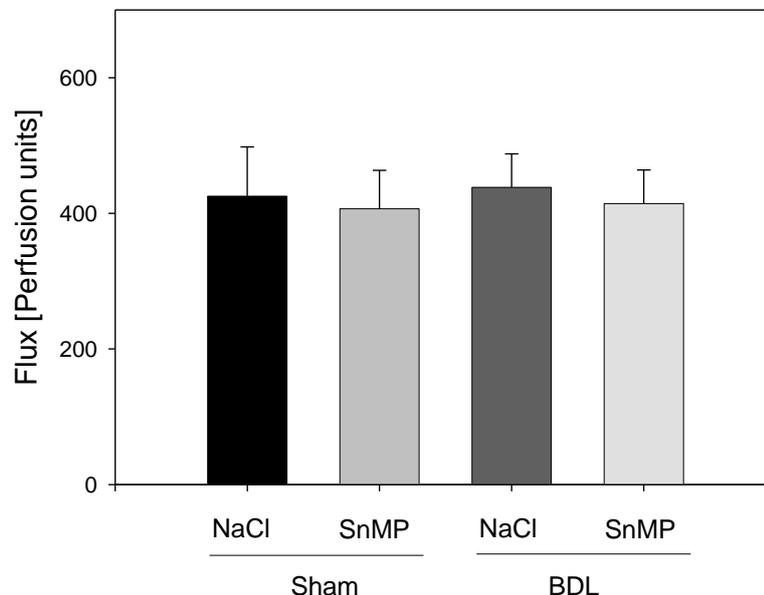
**Abbildung 26, F:** Mittelwertabweichung der berechneten Perfusionsindices drei Tage nach Sham-Op bzw. BDL.  $MW \pm SEM$ .

Wie Abbildung 26 F zeigt, fand sich bereits in der Kontrollgruppe mit Sham-Operation und Messung der regionalen Darmperfusion drei Tage nach Laparotomie eine Mittelwertabweichung des Perfusionsindex von gut 20. Sowohl nach BDL, als auch nach HO-1 Blockade, sowie BDL und HO-1 Blockade zusammen war die Mittelwertabweichung höher, wengleich sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen errechnen ließen.

### 6.1.3 Auswirkungen der Gallengangsligatur und HO-1 Blockade auf die Mikrozirkulation des Darmes

#### 6.1.3.1 Laser-Doppler-Flowmetrie

Die Ergebnisse der Laser-Doppler-Flowmetrie der Darmwand sind in Abbildung 27 zusammengefasst. Im Mittel wurden rund 400 perfusion units für die Mikrozirkulation des Darmes ohne Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen ermittelt.

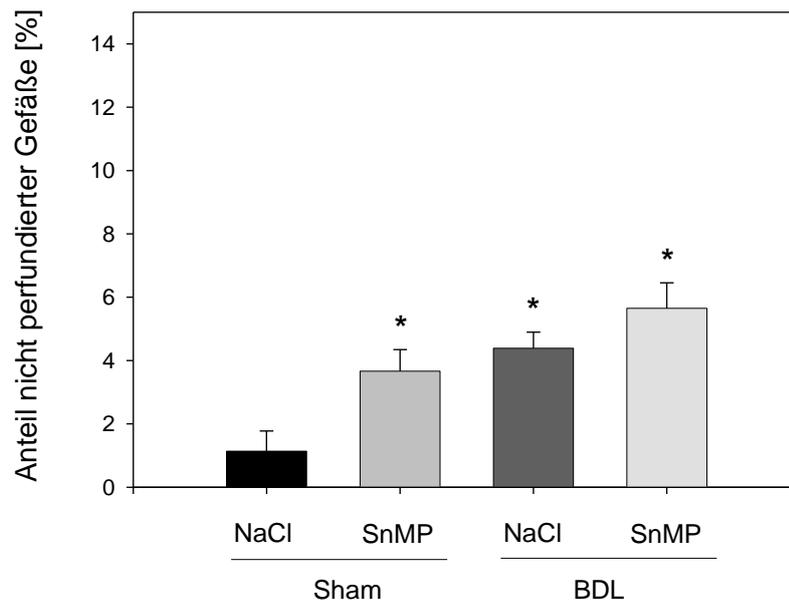


**Abbildung 27:** Intestinaler Fluss, gemessen mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) und angegeben in [Perfusion units] drei Tage nach Sham-Op bzw. Gallengangsligatur. MW  $\pm$  SEM.

### 6.1.3.2 Intravitalmikroskopie

#### 6.1.3.2.1 Anteil nicht-perfundierter Tunica muscularis Gefäße nach Gallengangsligatur und HO-1 Blockade

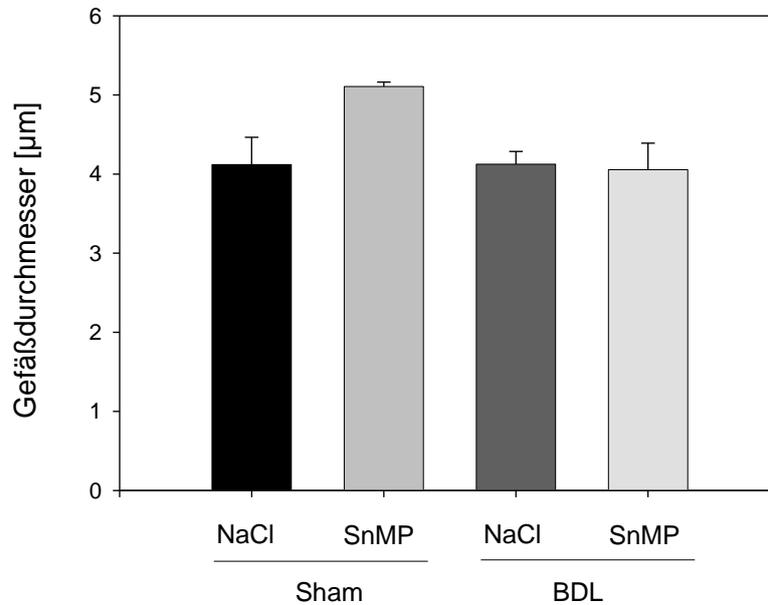
Durch Auszählung der Gefäße in der Tunica muscularis repräsentativer Abschnitte des Dünndarmes wurde der Anteil der in der Intravitalmikroskopie nicht-perfundierten Gefäße ermittelt (Abbildung 28). Es zeigte bereits in der Sham-Gruppe mit  $1,14 \pm 0,64\%$  ein nachweisbarer, aber insgesamt geringer Perfusionsausfall. Nach HO-1 Blockade waren  $3,66 \pm 0,68\%$  der Gefäße nicht perfundiert, nach BDL  $4,39 \pm 0,51\%$ . Bei der Kombination von BDL+SnMP nahm der Anteil nicht-perfundierter Gefäße auf  $5,65 \pm 0,81\%$  und damit signifikant gegenüber der Shamgruppe, aber auch gegenüber der Sham+SnMP Gruppe, zu.



**Abbildung 28:** Anteil nicht-perfundierter Tunica muscularis Gefäße des Dünndarmes (in Prozent aller sichtbaren Gefäße) drei Tage nach Sham-Op bzw. BDL. MW ± SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl; # $p < 0,05$  vs SnMP+Sham.

### 6.1.3.2.2 *Tunica muscularis Gefäßdurchmesser nach Gallengangsligatur und HO-1 Blockade*

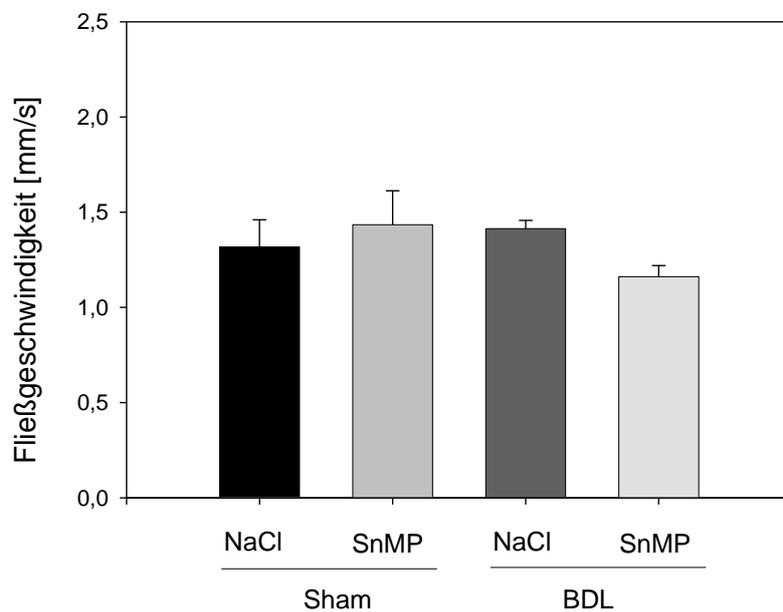
In Abbildung 29 sind die Durchmesser der Tunica muscularis Gefäße der Darmwand entsprechend der Auswertung der IVM-Aufnahmen dargestellt. Der mittlere Durchmesser war nach Sham-Op  $4,1 \pm 0,4 \mu\text{m}$ . Davon abweichend, war der Durchmesser in der Gruppe nach Sham-Op und HO-1 Blockade um etwa  $1 \mu\text{m}$  größer und im Mittel  $5,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$ . Aufgrund der höheren Standardabweichung in der Sham-Op Gruppe war dieser Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant. In den BDL Gruppen mit oder ohne HO-1 Blockade ließ sich gegenüber der Sham-Op Gruppe keine Veränderung des Gefäßdurchmessers nachweisen.



**Abbildung 29:** Durchmesser der Tunica muscularis Gefäße drei Tage nach Sham-Op bzw. BDL, mit und ohne SnMP-IX-Gabe. MW  $\pm$  SEM.

### 6.1.3.2.3 Fließgeschwindigkeit in den Tunica muscularis Gefäßen nach Gallengangsligatur und HO-1 Blockade

Die Ergebnisse der Messungen der Fließgeschwindigkeit in den Tunica muscularis Gefäßen des Darmes sind in Abbildung 30 dargestellt. Die Fließgeschwindigkeiten lagen hierbei zwischen 1,16 und 1,41 mm/s und zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen.



**Abbildung 30:** Fließgeschwindigkeit in den Tunica muscularis Gefäßen drei Tage nach Sham-Op bzw. BDL.  $MW \pm SEM$ .

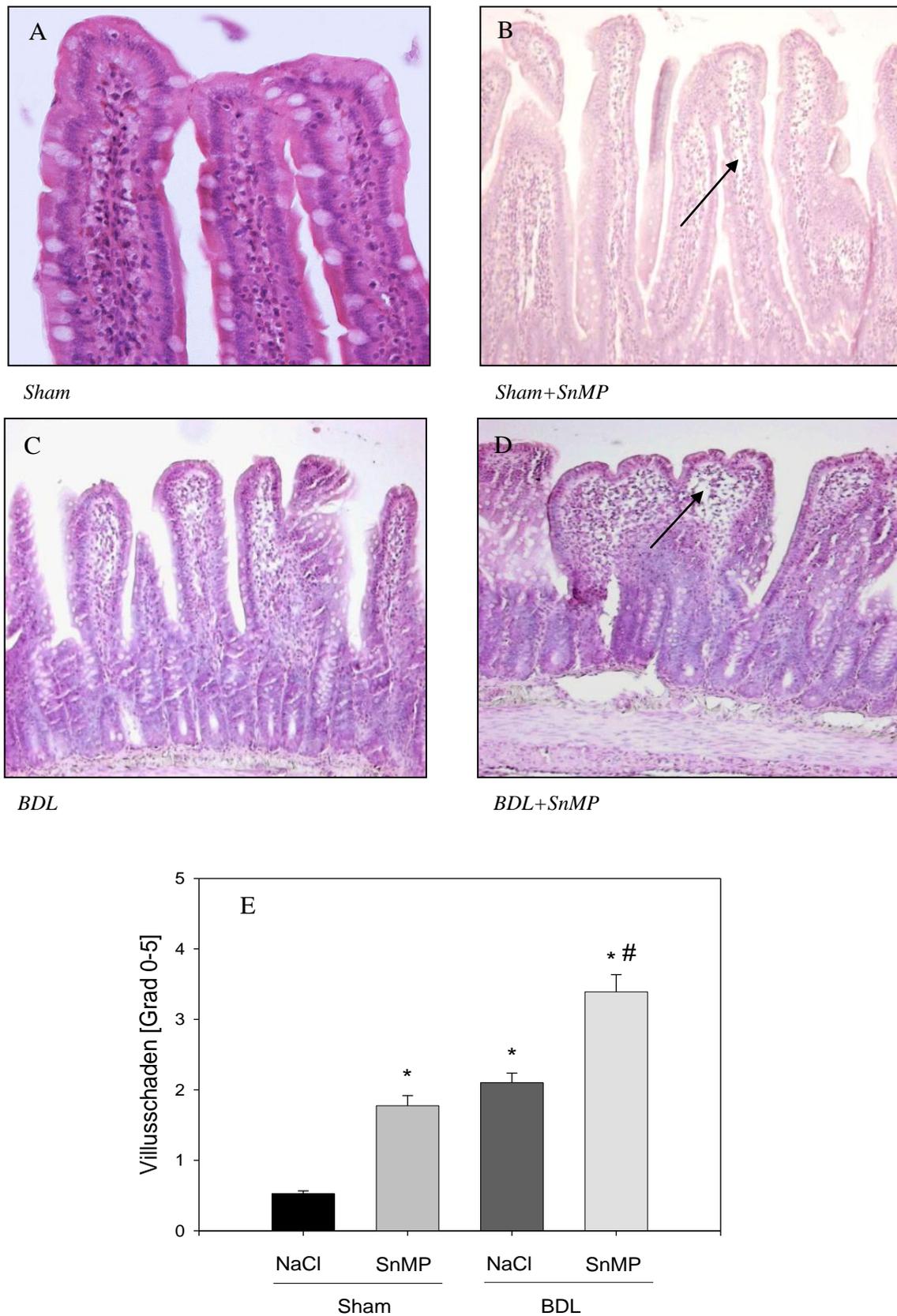
Zusätzlich wurden hier die Fließgeschwindigkeit und Durchmesser der Mikrogefäße in den Villi untersucht. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

## **6.1.4 Auswirkungen der Gallengangsligatur und HO-1 Blockade auf die Schädigung der Darmwand**

### **6.1.4.1 Villusschaden**

Qualitativ zeigten sich in der Gruppe der Sham-operierten Tiere überwiegend intakte Villi mit intaktem Randsaum (Epithel) und darauf sichtbarer Glykokalix (Abbildung 31, A). Bei beginnendem Schaden entwickelte sich an der Spitze des Villus ein subepithelialer Raum, der sich bei zunehmender Schädigung nach basal ausbreitete (siehe Pfeile in Abbildung 31, B und D) und schließlich zu einer ödematösen Abhebung der Mucosa von der Lamina propria führte. Massive Zerstörungen der Villi waren an abgehobenen oder ulcerierten Tips mit verletztem Epithel und der völligen Auflösung der Lamina propria zu erkennen.

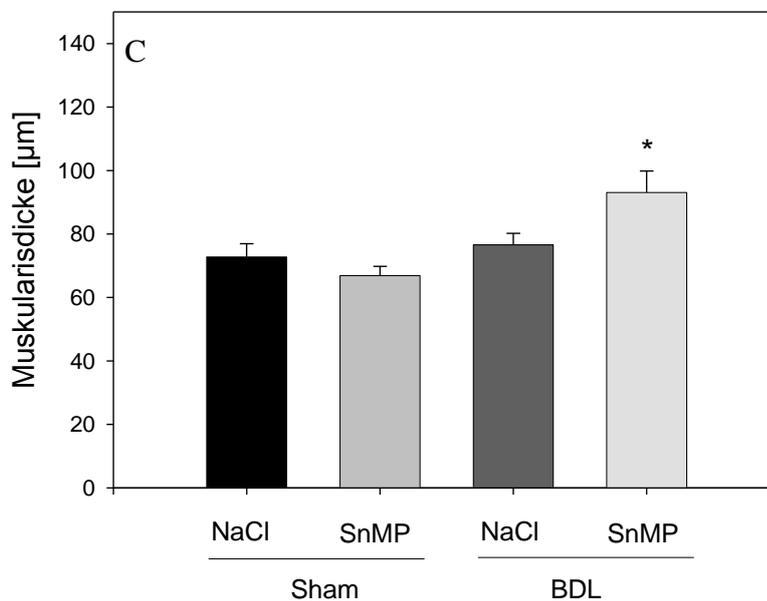
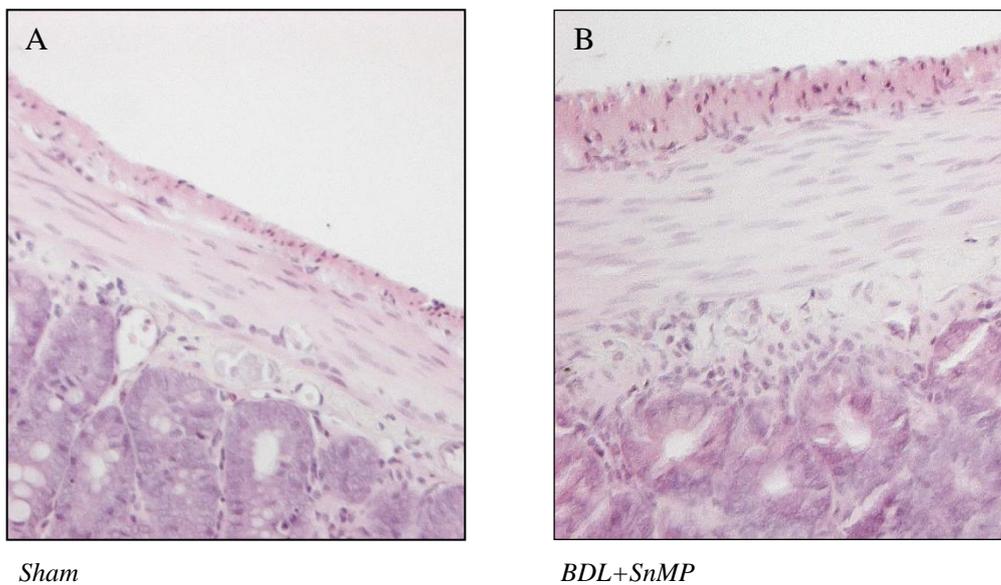
Zur semiquantitativen Auswertung der beschriebenen Veränderungen der Villi intestinales wurde der Schädigungsgrad entsprechend der Klassifikation nach Chiu et al. [CHIU et al. 1970] (siehe unter Kap. 5.3.5.1) bestimmt. Nach Sham-Operation zeigte sich nur ein minimaler Schaden ( $0,53 \pm 0,04$  [Abbildung 31 A, E]). Sowohl HO-1 Blockade als auch BDL alleine führten zu einem vergleichbaren und gegenüber der Sham-Gruppe signifikant größeren Villusschaden (Sham+SnMP:  $1,78 \pm 0,14$  [Abbildung 31 B, E]; BDL+NaCl:  $2,10 \pm 1,14$  [Abbildung 31 C, E]). Die Kombination von HO-1 Blockade und BDL war mit einer stark ausgeprägten Schädigung ( $3,39 \pm 0,25$ ) der Villi intestinales verbunden (Abbildung 31 D, E).



**Abbildung 31, A-E:** Repräsentative Darstellung (A-D): Nach Sham-Op (A) überwiegend intakte Villi. Vergrößerung  $\times 400$ . Nach SnMP-Gabe (B) und alleiniger BDL (C) deutliche Abhebung der Lamina propria (Pfeil), die sich nach BDL+SnMP (D) aufzulösen beginnt (Pfeil). Vergrößerung  $\times 200$ . Semi quantitative Auswertung (E) des histologischen Villusschadens drei Tage nach Sham-Op bzw. BDL. MW  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl; # $p < 0,05$  vs NaCl+BDL

### 6.1.4.2 Muskularisdicke

Zur Quantifizierung des Muskularisschadens wurde die Schichtdicke bestimmt, die mit zunehmender Schädigung aufgrund der damit verbundenen Ödembildung zunahm (Abbildung 32, A und B).



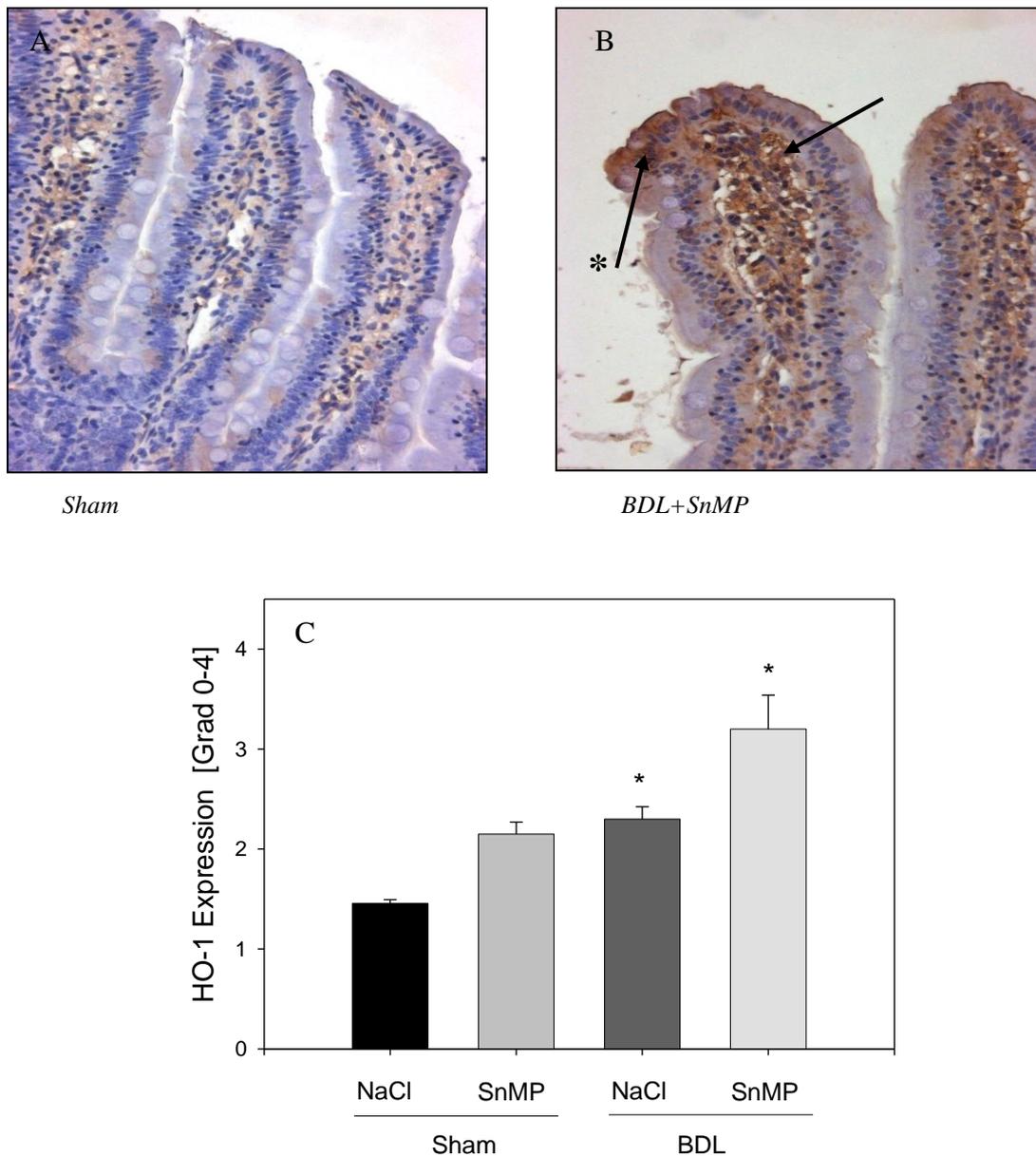
**Abbildung 32, A-C:** Repräsentative Darstellung der Tunica muscularis (HE-Färbung) 3 Tage nach Sham-OP (A) und 3 Tage nach BDL+SnMP (B) mit ödematöser Muskularisschicht. Vergrößerung x400. Quantitative Auswertung der Schichtdicke der Tunica muscularis drei Tage nach Sham-Op bzw. BDL (C) MW ± SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl, Sham+SnMP, BDL+NaCl.

Gegenüber allen anderen Versuchsgruppen war in der Gruppe mit BDL und HO-1 Blockade die Schichtdicke der Tunica muscularis im Mittel  $93,08 \pm 6,77 \mu\text{m}$ , und damit im Vergleich zur Sham-OP Gruppe um etwa 30% höher (Abbildung 32). HO-1 Blockade oder Gallengangsligatur alleine führten zu keiner Zunahme der Schichtdicke.

### **6.1.5 Auswirkungen der Gallengangsligatur und HO-1 Blockade auf die intestinale HO-1 Expression**

Nach Shamoperation war in zahlreichen Villi keine HO-1 Expression zu erkennen. Die in Bild A sichtbare sehr blasse braune Farbe des Stromas wurde im Sinne einer Hintergrundfärbung nicht positiv gewertet. Nur einzelne Zellen der lamina propria ließen eine HO-1 positive Färbung erkennen. Bei zunehmender Invasivität des Eingriffs nahm der Grad der HO-1 Expression zu. So waren nach BDL (Gallengangsligatur) immer mehr Zellen der lamina propria HO-1 positiv, zu erkennen an den kräftig braun eingefärbten Zellen (siehe Pfeil in Abbildung 33, Bild B).

Schließlich waren auch einzelne Säulenepithelzellen des Randsaumes betroffen. Diese zeigten bevorzugt an der Spitze des Villus eine positive HO-1 Färbung (siehe \* in Abbildung 33, Bild B). Die maximale Ausprägung der HO-1 Expression war in einzelnen Villi der Gruppe mit BDL+SnMP zu finden. Hier waren sowohl in der gesamten lamina propria als auch im überwiegenden Anteil des Epithels braungefärbte Zellen zu sehen.



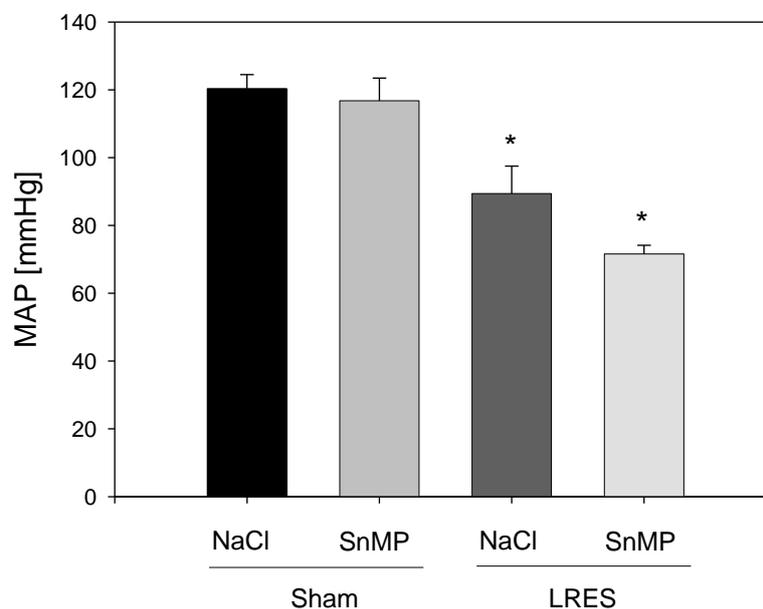
**Abbildung 33, A-C:** Repräsentative Bilder der HO-1 Expression drei Tage nach Sham-Op (A) mit minimaler HO-1 Expression, bzw. BDL+SnMP (B) mit HO-1 Überexpression (Pfeil) und positivem Randsaum (Stern). Vergrößerung  $\times 400$ . Semiquantitative Auswertung der HO-1 Expression (C). MW  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl

Die semiquantitative Analyse des Grades der HO-1 Expression ergab den geringsten HO-1 positiven Anteil in der Sham-operierten Gruppe mit 1,46. In der Gruppe BDL+SnMP ließ sich mit 3,2 der höchste Grad an HO-1 positiven Zellen ermitteln, was einer HO-1-Überexpression gleichkommt. Die beiden anderen Gruppen, nämlich BDL mit 2,3 und SnMP mit 2,1 zeigten eine vergleichbar mäßige Überexpression von HO-1.

## 6.2 Auswirkungen der HO-1 Blockade und 90% Leberresektion auf die intestinale Perfusion und Integrität

### 6.2.1 Auswirkungen der HO-1 Blockade und 90% Leberresektion auf Kreislauf, Lebermikrozirkulation, strukturelle Schäden der Leberarchitektur und Überleben

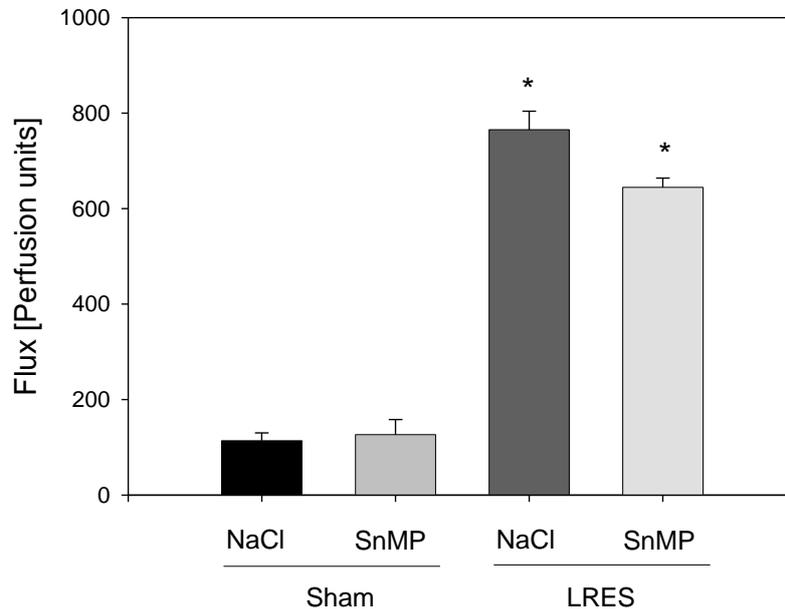
Der massive Eingriff der 90% Leberresektion stellte eine erhebliche Beeinträchtigung der Versuchstiere dar. Nach einem Beobachtungszeitraum von 6 Stunden war der MAP zwischen den Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich (Abbildung 34). Während Tiere mit Shamoperation und alleiniger SnMP-Gabe oder NaCl-Gabe normale MAP-Werte aufwiesen (Sham-OP+NaCl: 120,4±4,1 mmHg, Sham-OP+SnMP: 116,8±6,6 mmHg), war der MAP sechs Stunden nach 90% Leberresektion deutlich auf 89,4±8,1 mmHg erniedrigt, und bei zusätzlicher HO-1 Blocker Gabe sogar nur 71,6±2,5 mmHg.



**Abbildung 34:** Mittlerer arterieller Druck sechs Stunden nach Sham-Op bzw. LRES. MW ± SEM.  
\* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl

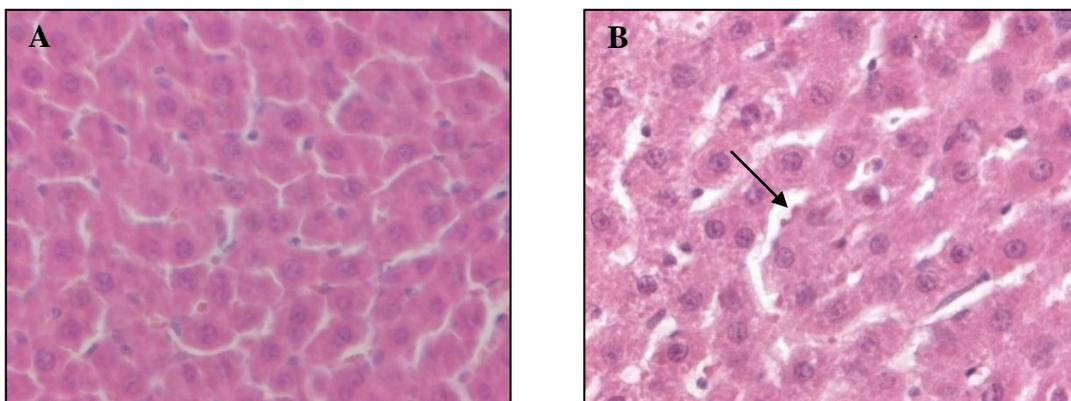
Trotz des geringeren systemischen Blutdrucks zeigte der relative hepatische Flux eine etwa 4-fache Zunahme durch die 90% Leberresektion (Abbildung 35). Durch HO-1 Blockade

war die Zunahme des hepatischen Flux geringer ausgeprägt. Allerdings ließ sich zur Gruppe LRES+NaCl kein signifikanter Unterschied berechnen.



**Abbildung 35:** Hepatischer Flux, gemessen mittels Laser-Doppler-Flowmetrie 6 Stunden nach Sham-Operation (Sham) bzw. nach 90% Leberresektion (LRES). MW  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl

Strukturell wiesen Restlebern, die 6 Stunden nach 90% Leberresektion entnommen wurden, eine erhebliche Dilatation der Sinusoide, Schwellung der Hepatozyten und eine schollige Inhomogenität des Zytoplasmas der Hepatozyten auf (Abbildung 36).

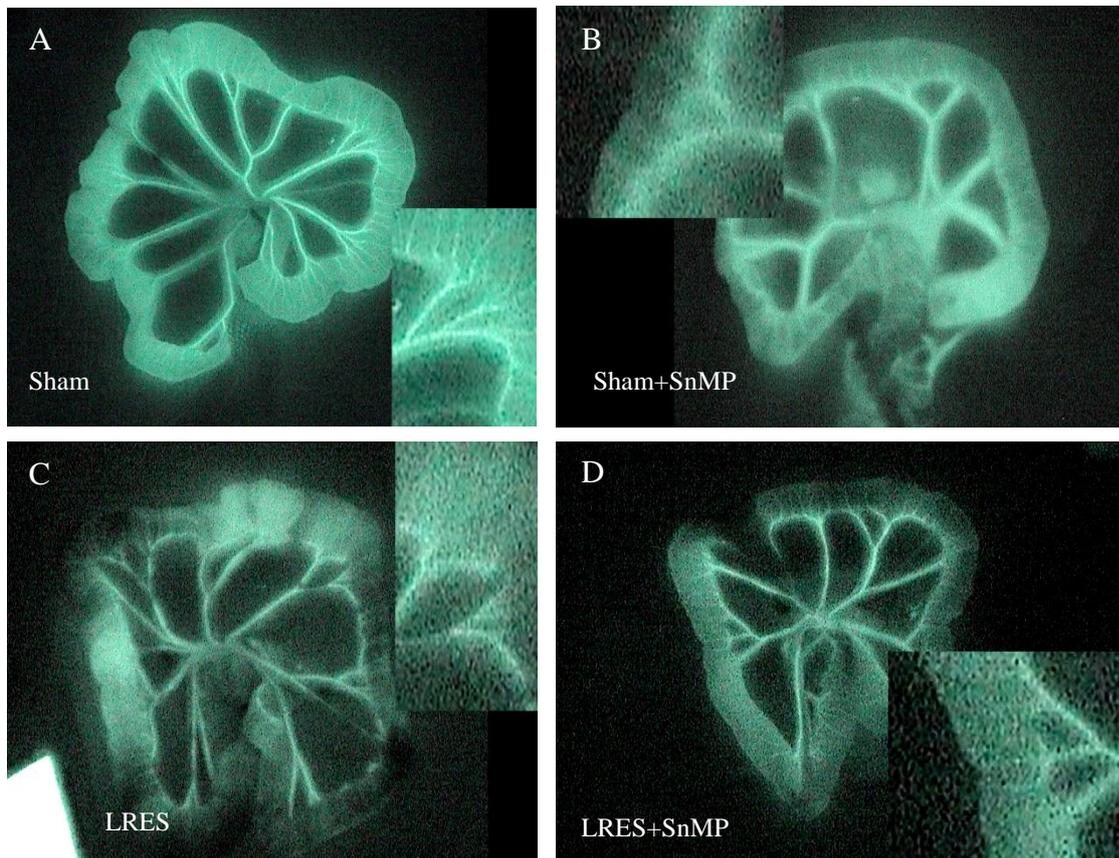


**Abbildung 36:** HE Schnitte einer Sham-Op-Leber (A) und der entnommenen Leber sechs Stunden nach 90% Leberresektion (B). Nach Leberresektion finden sich deutlich aufgeweitete Sinusoide (Pfeil), geschwollene Hepatozyten mit geschwollenen, kondensierten Kernen und scholligem Zytoplasma. Vergrößerung x400.

Die 90% Leberresektion war bereits bei dem Untersuchungszeitraum von nur 6 Stunden mit einer erheblichen Mortalität verbunden. Die Mortalitätsrate betrug bei 13 Tieren mit alleiniger Leberresektion 31%.

### 6.2.2 Einfluss von HO-1 Blockade und 90% Leberresektion auf die regionale Darmperfusion

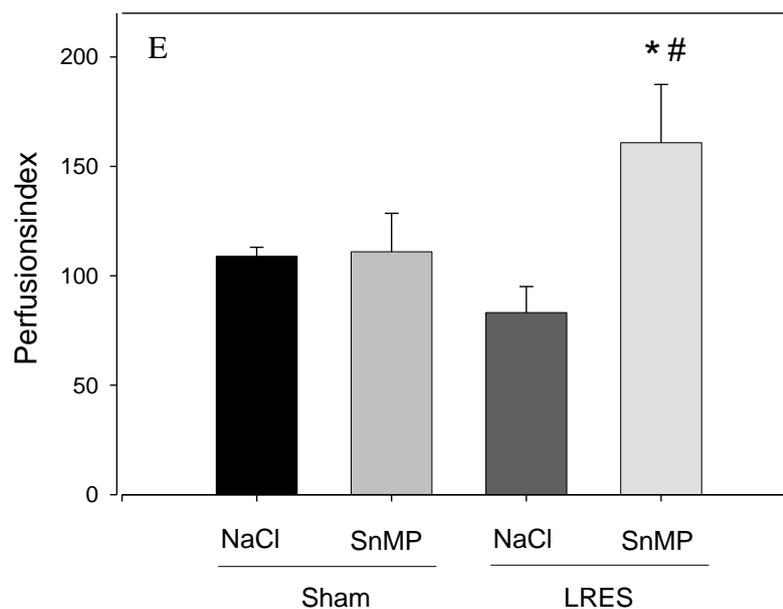
Im Vergleich zur Kontrolle sechs Stunden nach Sham-Operation war die Perfusion der Darmwand nach HO-1 Blockade nicht verändert (Abbildung 37, Bild A, Bild B).



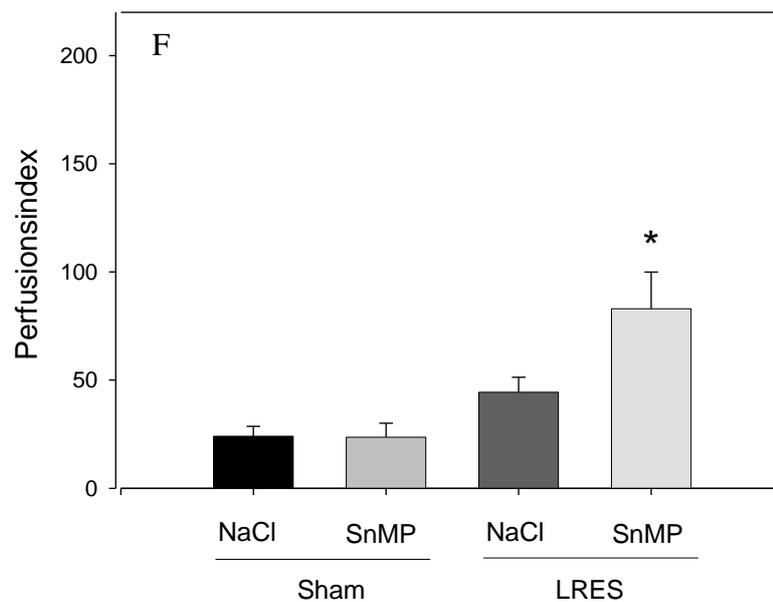
**Abbildung 37, A-D:** Aufnahmen der durch Fluoreszenz sichtbar gemachten Perfusionsunterschiede zwischen den Gruppen. Sechs Stunden nach 90% Leberresektion waren deutliche Perfusionsausfälle zu erkennen (C). Bei gleichzeitiger SnMP-Gabe waren Areale mit Hypo- und Hyperperfusion zu messen (D). Zum Vergleich dient oben links der Darm 6 h nach Shamoperation als Kontrolle (A).

Sechs Stunden nach 90% Leberresektion war die Perfusion der Darmwand gegenüber der Sham-OP Gruppe vermindert, jedoch war dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant. Interessanterweise war sechs Stunden nach 90% Leberresektion und gleichzeitiger HO-1 Blockade die Perfusion der Darmwand sowohl gegenüber der Sham-OP Gruppe, als auch der 90% Leberresektionsgruppe ohne HO-1 Blockade deutlich erhöht (Abbildung 37, E).

Auffallend war, dass sich die ermittelten Perfusionsstörungen nicht homogen über den gesamten ausgelagerten Darmabschnitt erstreckt haben, sondern fleckförmig vorlagen, was mit einer erheblichen Spannweite der gemessenen Werte verbunden war. Um dies besser zu quantifizieren, wurde die Mittelwertabweichung der Messungen des Perfusionsindex berechnet (Abbildung 37, F). Es zeigte sich, dass gegenüber der Sham-OP Gruppe die Mittelwertabweichung in der Gruppe mit 90% Leberresektion und HO-1 Blockade signifikant erhöht war.



**Abbildung 37, E:** Perfusionsindex (Anstieg der Mean pixel intensity der Darmwandabschnitte im Vergleich zur Referenz [100%] an der Mesenterialwurzel) sechs Stunden nach Sham-Op bzw. 90% Leberresektion (LRES). MW  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl; # $p < 0,05$  vs LRES+NaCl.

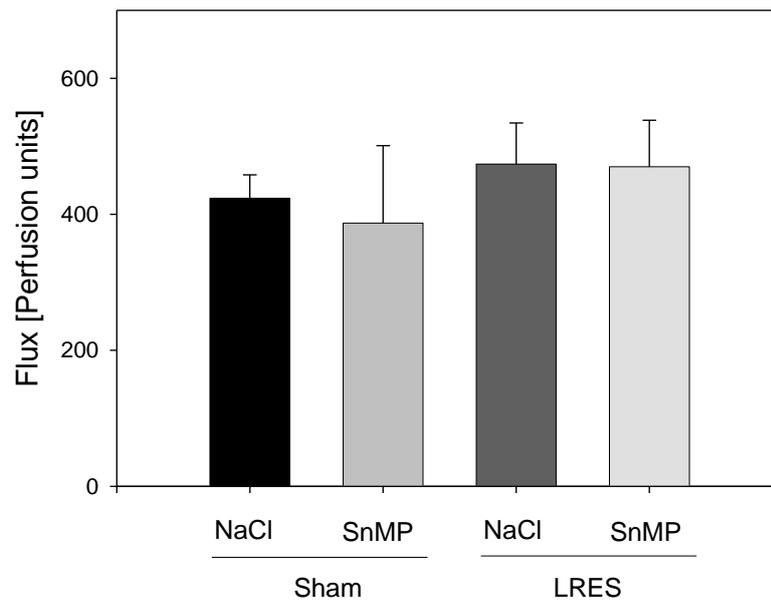


**Abbildung 37, F:** Mittelwertabweichung der berechneten Perfusionsindices sechs Stunden nach Sham-Op bzw. 90% Leberresektion (LRES). MW  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl.

## 6.2.3 Auswirkungen der HO-1 Blockade und 90% Leberresektion auf die Mikrozirkulation des Darmes

### 6.2.3.1 Laser-Doppler-Flowmetrie

Die Ergebnisse der Laser-Doppler-Flowmetrie der Darmwand sind in Abbildung 38 zusammengefasst. Vergleichbar mit der Studie nach Gallengangsligatur wurden rund 400 perfusion units für die Analyse der Mikrozirkulation des Darmes ohne Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen gemessen.

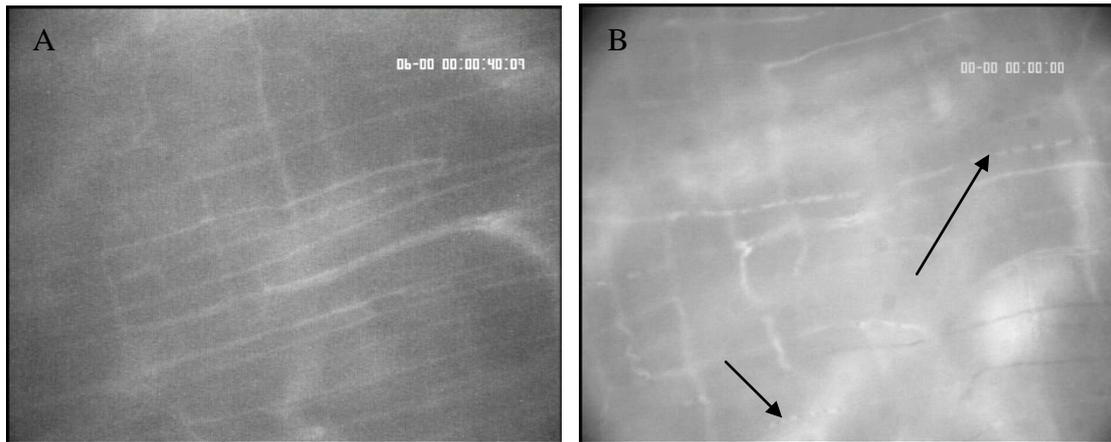


**Abbildung 38:** Intestinaler Fluss, gemessen mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) und angegeben in [Perfusion units] sechs Stunden nach Sham-Op bzw. 90% Leberresektion (LRES). MW  $\pm$  SEM.

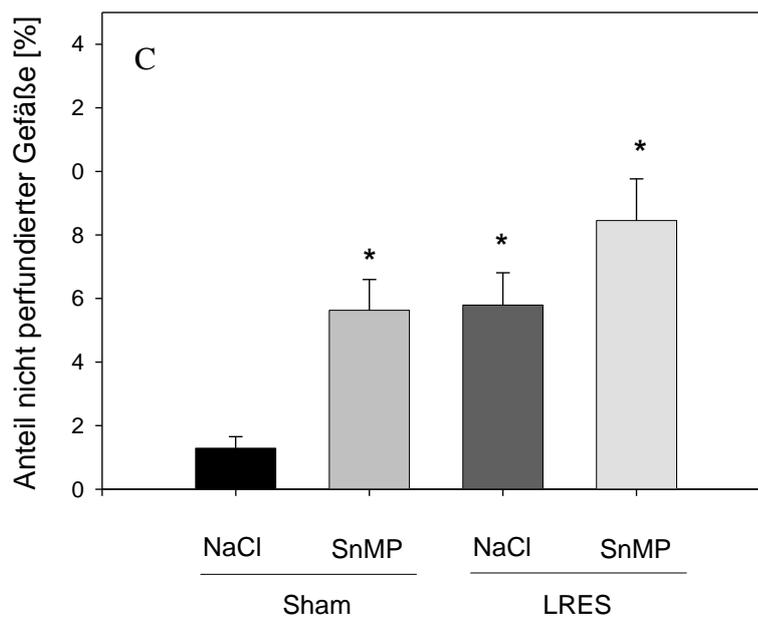
### 6.2.3.2 Intravitalmikroskopie

#### 6.2.3.2.1 Anteil nicht-perfundierter Tunica muscularis GefäÙe nach 90% Leberresektion und HO-1 Blockade.

Vergleichbar wie bei der Gallengangligatur (vgl. 6.1.3.2.1) zeigte sich auch in diesem Untersuchungsabschnitt bereits 6 h nach Sham-OP ein leichter Perfusionsausfall in den Tunica muscularis GefäÙen von  $1,3 \pm 0,4\%$  (Abbildung 39). Sowohl nach HO-1 Blockade als auch nach 90% Leberresektion war ein signifikant höherer Anteil nicht perfundierter GefäÙe zu beobachten (Sham+SnMP:  $5,6 \pm 1,0\%$ , LRES+NaCl:  $5,8 \pm 1,0\%$ ). HO-1 Blockade bei LRES führte zu noch höheren Perfusionsausfällen auf  $8,5 \pm 1,3\%$ .



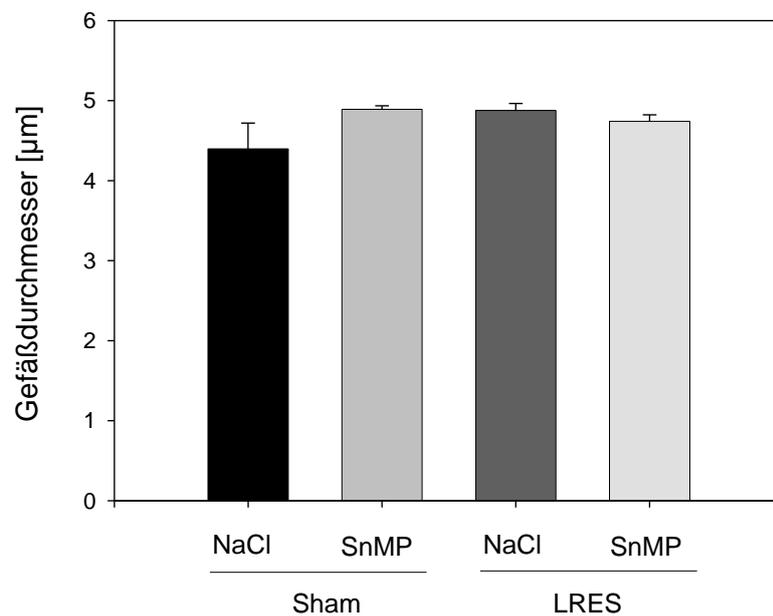
**Abbildung 39, A und B:** Intravitalmikroskopische Aufnahme der Gefäße in der Tunica muscularis nach Sham-Op (A, alle Gefäße perfundiert). Im Gegensatz dazu finden sich Gefäße mit stagnierenden dunkel gefärbten Erythrozyten nach LRES (siehe Pfeile in B). Vergrößerung x720.



**Abbildung 39, C:** Anteil nicht-perfundierter Tunica muscularis Gefäße des Dünndarmes (Quotient aus nicht-perfundierten Gefäßen zu allen gezählten Gefäßen) sechs Stunden nach Sham-Op bzw. 90% Leberresektion (LRES). MW  $\pm$  SEM. \*p < 0,05 vs Sham+NaCl

### 6.2.3.2.2 *Tunica muscularis Gefäßdurchmesser nach 90% Leberresektion und HO-1 Blockade*

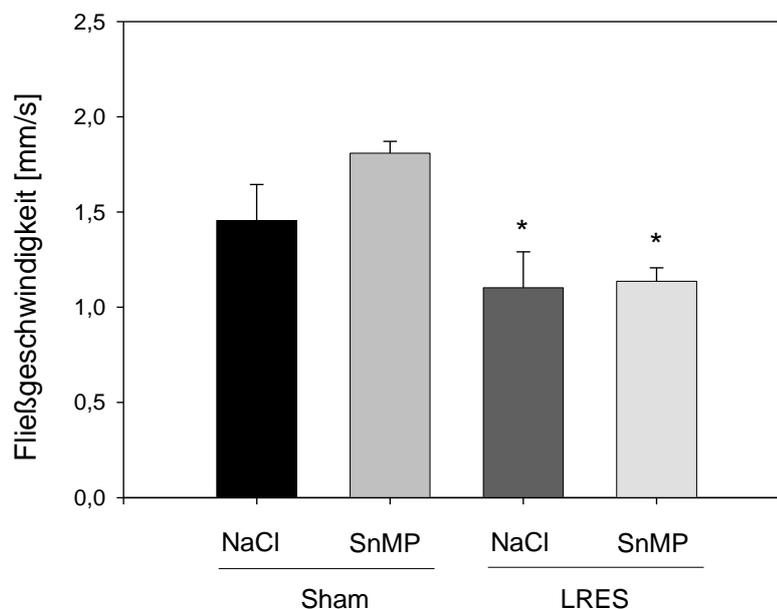
In Abbildung 40 sind die Durchmesser der Tunica muscularis Gefäße der Darmwand dargestellt. Der mittlere Durchmesser war 6 Stunden nach Sham-OP  $4,4 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . Gegenüber den restlichen Untersuchungsgruppen ließ sich kein Unterschied des Gefäßdurchmessers nachweisen.



**Abbildung 40:** Durchmesser der Tunica muscularis Gefäße sechs Stunden nach Sham-Op bzw. 90% Leberresektion (LRES).  $MW \pm SEM$ .

### 6.2.3.2.3 Fließgeschwindigkeit in den Tunica muscularis- und Villus-Gefäßen nach 90% Leberresektion und HO-1 Blockade

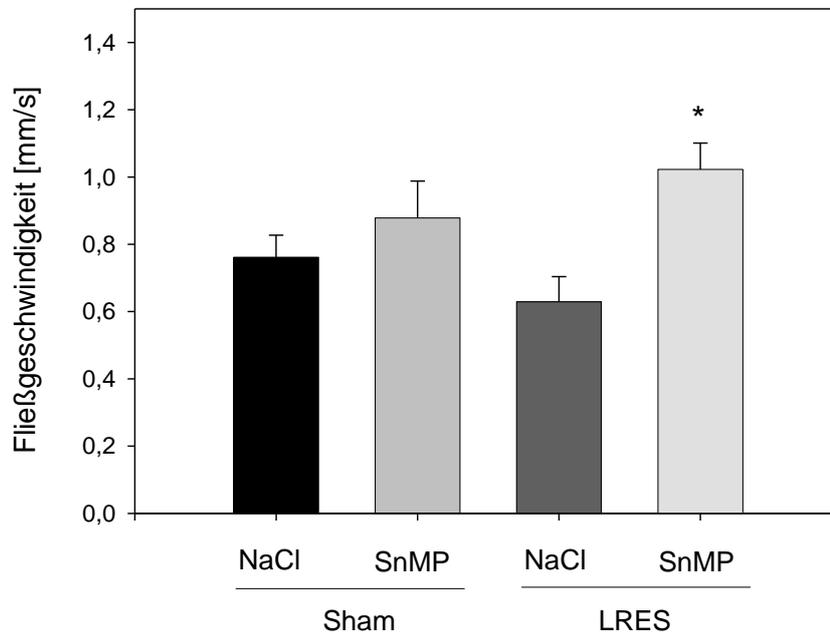
6 Stunden nach Sham-OP betrug die Fließgeschwindigkeit in den Gefäßen der Tunica muscularis  $1,46 \pm 0,19$  mm/s (Abbildung 41). HO-1 Blockade führte nach Sham-OP zu einer leichten Zunahme auf  $1,81 \pm 0,06$  mm/s, jedoch muss dieser Wert aufgrund der erhöhten Messungenauigkeit ab einer Geschwindigkeit von 1,5 mm/s aus der Wertung genommen werden. Nach 90% Leberresektion ließ sich eine signifikante Reduktion der Fließgeschwindigkeit auf  $1,10 \pm 0,19$  mm/s nachweisen. Zusätzliche HO-1 Blockade hatte nach 90% Leberresektion keinen weiteren Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit ( $1,14 \pm 0,07$  mm/s).



**Abbildung 41:** Fließgeschwindigkeit in den Tunica muscularis Gefäßen sechs Stunden nach Sham-Op bzw. 90% Leberresektion (LRES).  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl, Sham+SnMP.

Zusätzlich wurde in diesem Untersuchungsabschnitt auch die Fließgeschwindigkeit in den Villusgefäßen gemessen (Abbildung 42). Hierbei betrug die Fließgeschwindigkeit 6 Stunden nach Sham-OP ohne HO-1 Blockade  $0,76 \pm 0,07$  mm/s. Sowohl nach Sham-OP mit HO-1 Blockade als auch nach 90% Leberresektion ohne HO-1 Blockade war die Fließgeschwindigkeit nicht wesentlich verändert (Sham+SnMP:  $0,88 \pm 0,11$  mm/s, LRES+NaCl:  $0,63 \pm 0,08$  mm/s). Hingegen führte die HO-1 Blockade nach 90%

Leberresektion zu einer signifikanten Zunahme der Fließgeschwindigkeit in den Villusgefäßen auf  $1,02 \pm 0,08$  mm/s.



**Abbildung 42:** Fließgeschwindigkeit in den Villusgefäßen sechs Stunden nach Sham-Op bzw. 90% Leberresektion (LRES).  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl.

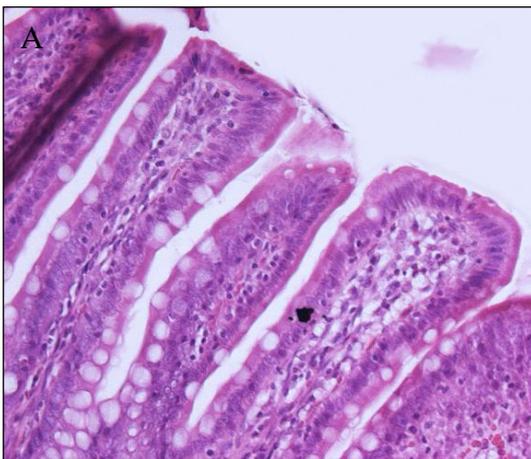
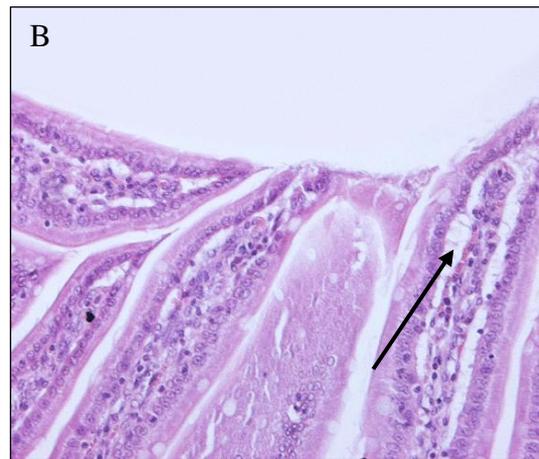
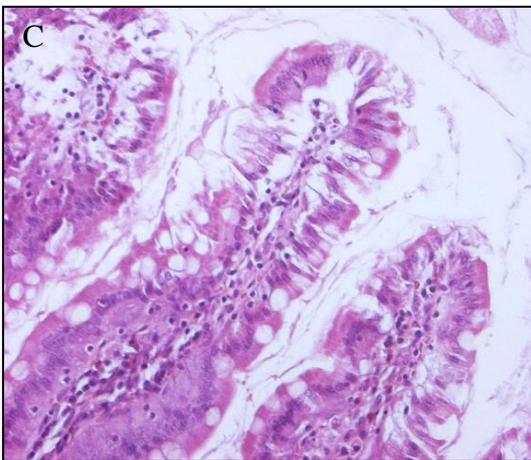
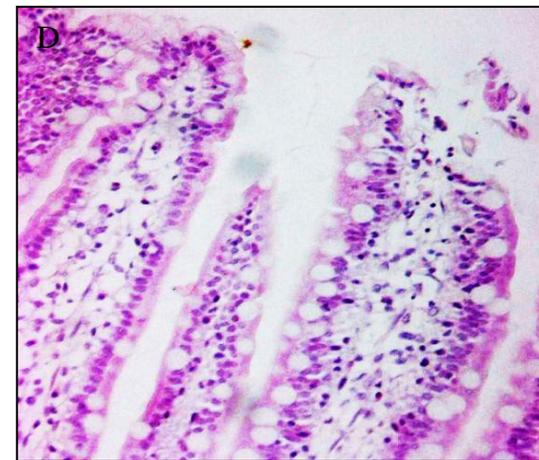
## 6.2.4 Auswirkungen der 90% Leberresektion und HO-1 Blockade auf die Schädigung der Darmwand

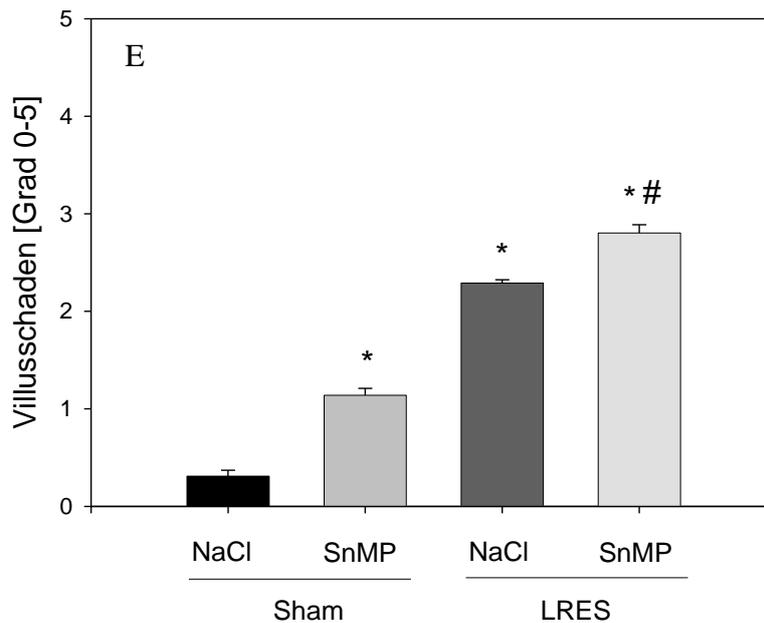
### 6.2.4.1 Villusschaden

Qualitativ zeigten sich, wie auch in Kap. 6.1.4.1 beschrieben, in der Gruppe der shamoperierten Tiere nahezu vollständig intakte Villi mit intaktem Randsaum (Epithelium) und darauf sichtbarer Glykokalix (Abbildung 43, A). Bei beginnendem Schaden entwickelte sich an der Spitze der Villi ein subepithelialer Raum, der sich bei zunehmender Schädigung nach basal ausbreitete (siehe Pfeil in Abbildung 43, B) und schließlich zu einer Abhebung der Mucosa von der Lamina propria führte. Nach ausgedehnter Leberresektion waren schon abgehobene oder ulcerierte Tips zu finden (Abbildung 43, C). Bei zusätzlicher SnMP-Gabe

kam es zur ödematösen Schwellung bzw. zur vollständigen Ablösung der Lamina propria (Abbildung 43, D).

Die quantitative Analyse (Abbildung 43, E) der Schädigung der Villi intestinales entsprechend der Chiu-Klassifikation [CHIU et al. 1970, siehe Kap. 5.3.5.1] zeigte 6 Stunden nach Sham-Operation nur einen minimalen Schaden ( $0,31 \pm 0,06$ ) (Abbildung 43, A). Unter HO-1 Blockade nach Sham-OP nahm die Schädigung bereits auf  $1,14 \pm 0,07$  zu (Abbildung 43, B). Demgegenüber war nach 90% Leberresektion ohne HO-1 Blockade (Abbildung 43, C) eine noch ausgeprägtere Schädigung der Villi zu beobachten ( $2,29 \pm 0,03$ ). HO-1 Blockade nach 90% Leberresektion (Abbildung 43, D) führte zu den am stärksten ausgeprägten Schäden ( $2,80 \pm 0,08$ ).

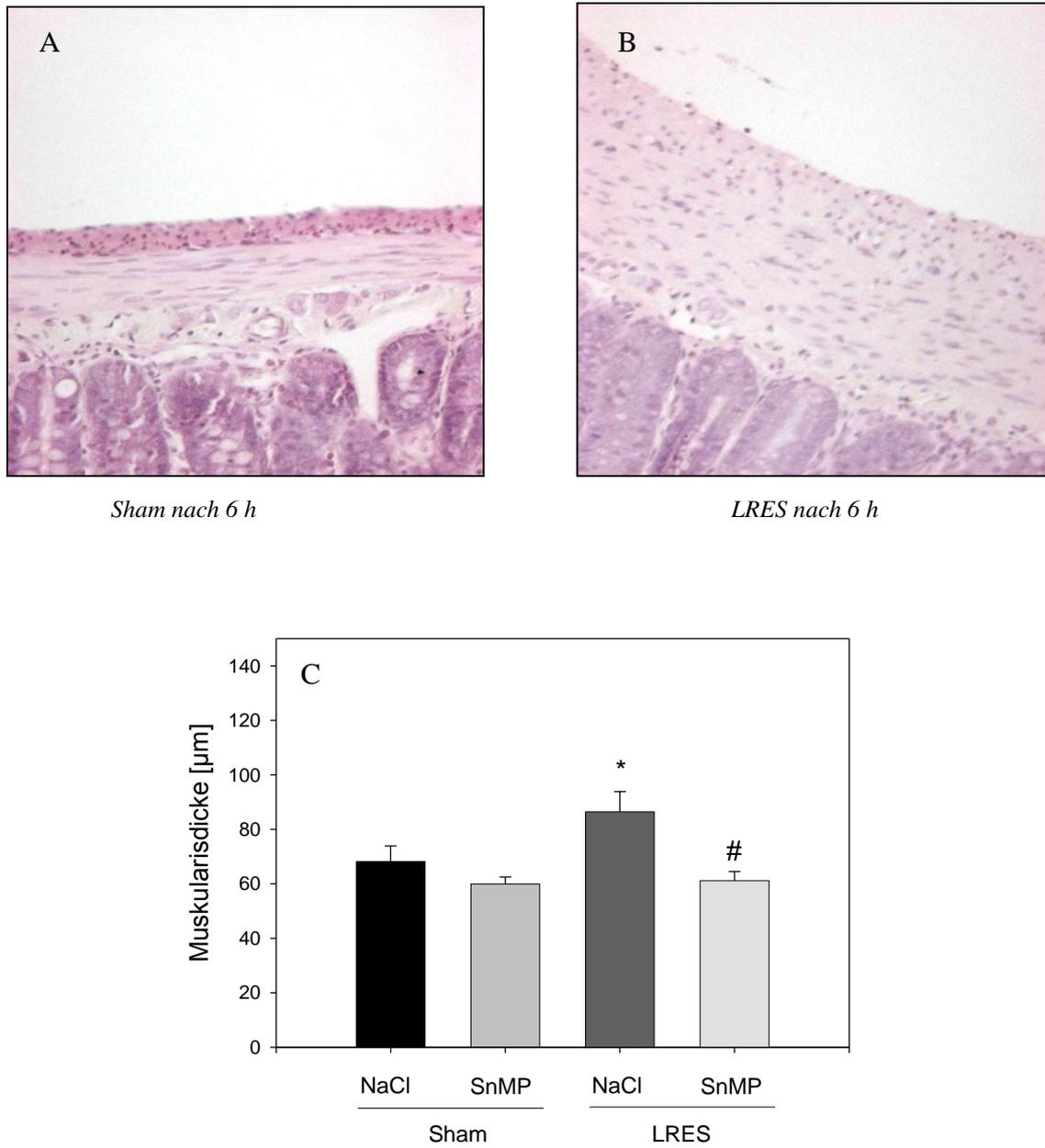
*Sham**Sham+SnMP**LRES**LRES+SnMP*



**Abbildung 43, A-E:** Repräsentative Darstellung (A-D) Vergrößerung  $\times 400$ . Semiquantitative Auswertung (E) des histologischen Villusschadens sechs Stunden nach Sham-Op bzw. 90% Leberresektion (LRES).  $MW \pm SEM$ . \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl; # $p < 0,05$  vs NaCl+LRES.

#### 6.2.4.2 Muskularisdicke

Die Ausmessung der Muskularisdicke ergab in der Gruppe 6 Stunden nach Sham-OP einen Wert von  $68,2 \pm 5,7 \mu\text{m}$  (Abbildung 44, A). Nach HO-1 Blockade und Sham-OP war die Schichtdicke nicht wesentlich verändert. Im Gegensatz dazu wies die Gruppe mit 90% Leberresektion ohne HO-1 Blockade eine erhöhte Schichtdicke mit  $86,4 \pm 7,4 \mu\text{m}$  auf (Abbildung 44, B). In der Gruppe mit 90% Leberresektion und HO-1 Blockade war hingegen die Schichtdicke wieder etwa so hoch wie in der Sham-OP Gruppe ( $61,2 \pm 3,4 \mu\text{m}$ ) und signifikant geringer im Vergleich zur Gruppe nach 90% Leberresektion ohne HO-1 Blockade (Abbildung 44, C).

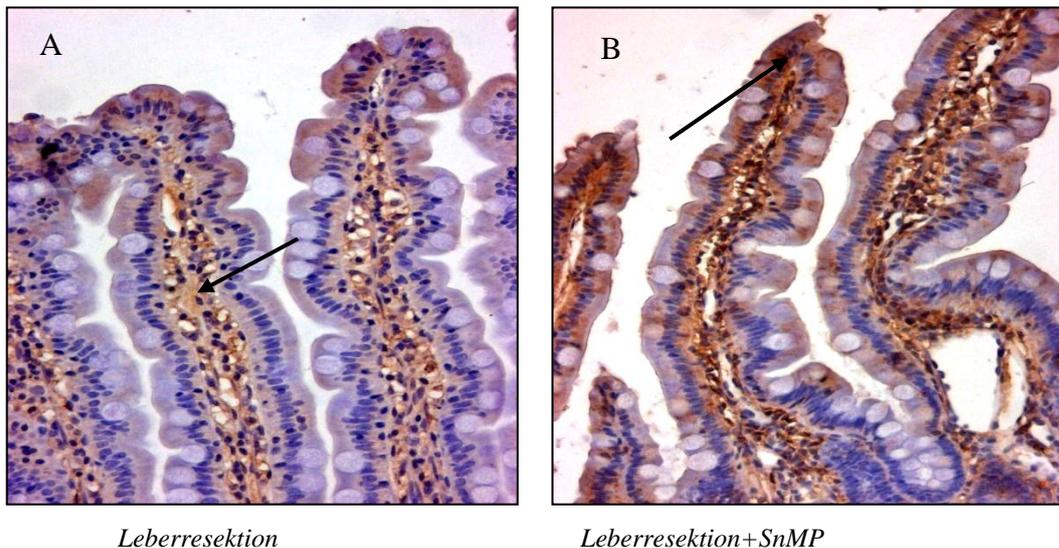


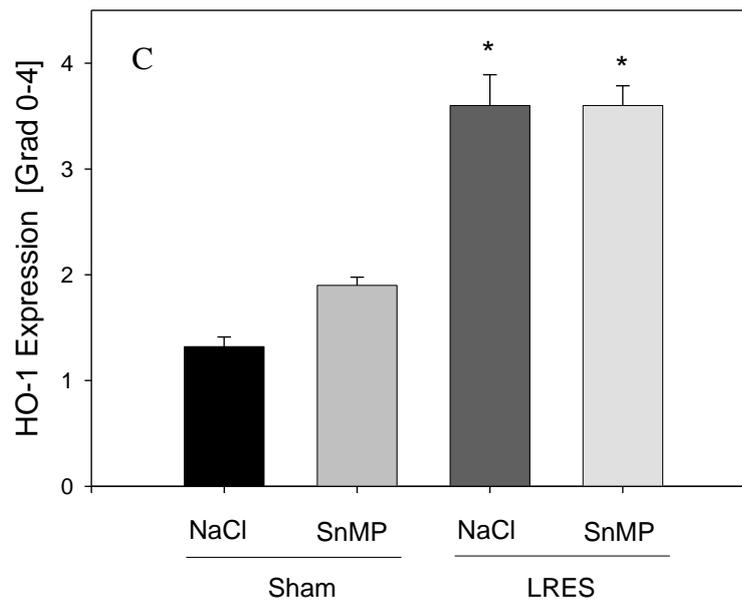
**Abbildung 44, A-C:** Repräsentative Darstellung der Tunica muscularis (HE-Färbung) 6 h nach Sham-OP (A) bzw. 90% Leberresektion (LRES) (B) Vergrößerung x400. Quantitative Auswertung der Schichtdicke (C). MW ± SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl; # $p < 0,05$  vs NaCl+LRES.

## 6.2.5 Immunhistochemie

Zunächst war eine HO-1 positive Färbung einzelner Zellen der Lamina propria zu erkennen. Bei zunehmender HO-1 Expression waren immer mehr Zellen der Lamina propria betroffen bis schließlich auch einzelne Säulenepithelzellen des Randsaumes, bevorzugt an der Spitze des Villus, eine positive HO-1 Färbung zeigten. Bei der maximalen Ausprägung der HO-1 Expression zeigten sowohl die gesamte Lamina propria als auch das überwiegende Epithelium braungefärbte Zellen.

Die semiquantitative Analyse der HO-1-positiven Zellen zeigte eine geringe Zahl HO-1-positiver Zellen in der Shamgruppe ( $1,3 \pm 0,1$ ) (Abbildung 45, A). Auch nach HO-1 Blockade und Sham-OP fanden sich etwa vergleichbar viele HO-1-positive Zellen ( $1,9 \pm 0,1$ ). 90% Leberresektion führte unabhängig von der HO-1 Blockade zu einer deutlichen Zunahme der HO-1 Expression (LRES+NaCl:  $3,6 \pm 0,3$ ; LRES+SnMP:  $3,6 \pm 0,2$ ).





**Abbildung 45, A-C:** HO-1 Expression (Braunfärbung in der Immunhistochemie) (A) nach 90% Leberresektion (LRES), (B) nach 90% Leberresektion und HO-1 Blockade (LRES+SnMP), die Pfeile deuten auf die Braunfärbung der gesamten Lamina propria und des Epithels an der Spitze des Villus. Vergrößerung  $\times 400$ . (C) HO-1 Expression sechs Stunden nach Op. MW  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs Sham+NaCl.

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Diskussion der Modelle

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Bedeutung der Hämoxxygenase-1 für die Darmperfusion und die zelluläre Integrität bei Gallengangsligatur und nach Leberresektion zu analysieren. Bei vorbestehender Cholestase oder ausgedehnten Leberresektionen steht die postoperative Leberfunktion im Mittelpunkt des klinischen Interesses. Deshalb wurden in dieser Arbeit Modelle ausgewählt, die das erhöhte Risiko nach Leberoperationen abbilden. Hierbei darf jedoch nicht nur auf die Leber fokussiert werden, nachdem experimentelle Befunde (LITERATUR siehe 3.8.2. und 7.3.2) zeigen, dass der Darm pathophysiologisch eine ebenso zentrale Rolle spielt und dabei möglicherweise sogar das Leberversagen auslöst. Zur Untersuchung der Cholestase kam das Modell der Gallengangsligatur zur Anwendung. Die ausgedehnte Leberresektion erfolgte in Form der 90% Leberresektion.

#### 7.1.1 Narkoseverfahren

Die chirurgischen Eingriffe der Gallengangsligatur und der 70% bzw. 90% Leberresektion machen eine Narkose erforderlich. Ein Problem hierbei stellt neben den Auswirkungen auf Atmung und Kreislauf, die vorwiegend hepatische Metabolisierung vieler Narkotika dar. Für Eingriffe wie die Gallengangsligatur und die 90% Leberresektion musste deshalb auf die Äthernarkose zurückgegriffen werden, da Äther als einziges Narkotikum nicht hepatisch metabolisiert wird. Äther bietet außerdem die Vorteile der analgetischen und muskelrelaxierenden Wirkung. Durch die rasch flüchtige Eigenschaft des Narkotikums ergibt sich zudem die Möglichkeit, die Operation unter Spontanatmung durchzuführen und war somit ideal für die nur kurzzeitig notwendigen Betäubungen geeignet. Andererseits erschwerte das rasche An- und Abfluten die Narkoseführung. Als nachteilig erwies sich auch der während der Narkoseeinleitung auftretende Stress für die Tiere durch die Schleimhautreizung und das ausgeprägte Exzitationsstadium. Die Reizung der Atemwege bewirkt eine Hypersalivation mit bisweilen auftretender Aspiration bei atemdepressiver

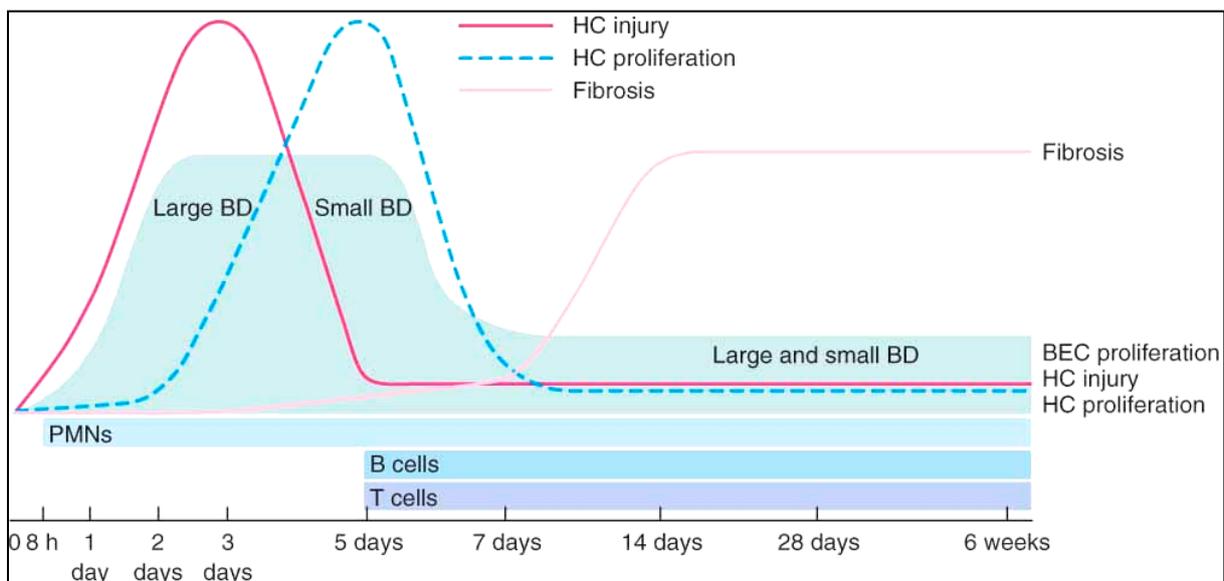
Wirkung des Narkotikums. So machten immer wieder auftretende Atemstillstände bei akuter Atemwegsverlegung oder Asphyxie eine künstliche Beatmung notwendig. Für die sich anschließenden länger dauernden in vivo Untersuchungen mit chirurgischer Manipulation war diese schwer zu kontrollierende Narkoseführung nicht mehr akzeptabel. So war eine Narkose mit einem Barbiturat notwendig, da die Tiere ruhig liegen mussten und zeitlich keine Möglichkeit für häufige repetitive Dosen eines Narkotikums bestand. Die Pentobarbitalmonoanästhesie zeichnet sich gerade gegenüber den alternativen Anästhetika Chloralhydrat und Ketamin durch eine bessere Steuerbarkeit und nur geringgradig kreislaufdepressive Wirkung aus [BÜHREN 1989].

Das verwendete Anästhetikum Pentobarbital (Narcoren) wird nach intraperitonealer Applikation und nachfolgender Resorption über die Leber metabolisiert. Hiermit bieten sich die Vorteile einer schonenden Narkoseeinleitung und eine langanhaltende Wirkung nach nur einmaliger Gabe. Obschon der vergleichsweise geringen Kreislaufdepression war eine invasive Blutdrucküberwachung sowie repetitive Volumengaben mittels Bolusapplikationen von Ringer-Lösung notwendig. Als nachteilig gilt die stark atemdepressive Wirkung, welche eine Tracheotomie erforderte, was einen anschließenden Überlebensversuch ausschloss [LONGNECKER et al. 1986]. Theoretisch führt Pentobarbital zu einer Induktion des hepatischen Cytochrom P450-Enzymsystems. Bei - wie in den vorliegenden Untersuchungen - lediglich einmaliger Anwendung dieses Narkoseverfahrens spielt diese Enzyminduktion aber wohl eine eher untergeordnete Rolle. Außerdem wurde postuliert, dass Pentobarbital zu einer Reduktion der portalvenösen Durchblutung führt [SEYDE et al. 1985]. Dies konnte jedoch in neueren Untersuchungen nicht bestätigt werden [RICHTER 2008].

### **7.1.2 Gallengangsligatur**

Als tierexperimentelles Modell für die extrahepatische Cholestase hat sich das Modell der Gallengangsligatur (bile duct ligation, BDL) bewährt. Durch eine chirurgische Intervention mit Ligatur des Ductus communis kann künstlich die Situation der obstruktiven Cholestase induziert werden [JOHNSTONE et al. 1976]. Anhand dieses Modells können cholestatische Mechanismen und Veränderungen ideal untersucht werden. So konnte die zeitliche Abfolge spezifischer Phasen bei akutem und chronischem Cholestaseschaden analysiert werden (Abbildung 46).

Schon wenige Stunden nach Eintritt der Cholestase finden sich histologisch hepatozelluläre Schäden und auch im Serum sind erhöhte Transaminasen nachzuweisen. Parallel dazu beginnt die periportale Neutrophileninfiltration. Ihren Höhepunkt erreicht die Leberzellschädigung nach etwa 2-3 Tagen. Im Abstand von weiteren 2-3 Tagen folgt der Höhepunkt der hepatozellulären Proliferation, was im Sinne von Regenerations- und Reparaturvorgängen zu verstehen ist. Die Proliferation der Cholangiozyten beginnt in den großen Gallengängen schon nach etwa 2-3 Tagen, in den kleinen Gallengängen jedoch erst um den 5. Tag. Nach etwa einer Woche kommt es zur lymphozytären Infiltration mit B- und T-Zellen und zum allmählichen Beginn der Fibrogenese mit Akkumulation von Kollagen [GEORGIEV et al. 2008].



**Abbildung 46:** Zeitliche Abfolge des cholestatischen Leberschadens. HC injury= hepatozellulärer Schaden; Large/Small BD= große/kleine Gallengänge; PMNs= polymorphonukleäre Leukozyten (Neutrophile); BEC proliferation= Proliferation der Gallengangsepithelzellen (Abb. aus GEORGIEV et al. 2008)

Als tierexperimentelles Modell für die Obstruktion des Gallengangs stehen prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Auswahl, die miteinander verglichen wurden. Der Gallengang kann entweder exzidiert oder ligiert werden, wobei ersteres das chirurgisch aufwändigere Verfahren darstellt [SYMEONIDIS et al. 1957]. Initial, das heißt während der ersten 14 Tage nach dem Eingriff, erwiesen sich beide Methoden als gleichwertig, d. h. weder klinisch noch histologisch ließ sich ein Unterschied zwischen ihnen erkennen. In der späteren Phase jedoch kam es in vielen Fällen nach Gallengangsligatur zur Rekanalisation des Gallengangs und

einer vollständigen Erholung der zuvor cholestatisch geschädigten Leber. Nach Gallengangsexzision entwickelten jedoch alle Tiere über einen Zeitraum von 4 Wochen eine stark ausgeprägte Leberfibrose und -zirrhose. Da nur der akute cholestatische Leberschaden mit seinen Auswirkungen auf die intestinale Perfusion und Integrität untersucht werden sollte, wurde in den vorliegenden Untersuchungen das technisch einfachere, aber für diese Phase gleichwertige Verfahren der Gallengangsligatur durchgeführt. Als Untersuchungstag sollte der Zeitpunkt gewählt werden, bei dem der cholestatische Leberschaden möglichst sein Maximum erreicht hat, fibrotische Veränderungen jedoch noch nicht eingetreten sind. Da ein Beginn der Fibrogenese etwa ab dem 7. Tag nach Eintritt der Cholestase sowie ein Maximum des hepatozellulären Schaden zwischen dem 2. und 4. Tag gezeigt werden konnten [GEORGIEV et al., 2008], wurden sämtliche Untersuchungen 3 Tage nach Gallengangsligatur durchgeführt.

### **7.1.3 70% und 90% Leberresektion**

Die 70% Leberresektion nach HIGGINS und ANDERSON ist unter anderem ein gut etabliertes Verfahren als Stimulus der Leberregeneration [HIGGINS und ANDERSON 1931; COURT et al. 2004] und verläuft in aller Regel komplikationslos. So dauert der Eingriff nur etwa 15 Minuten und kann unter Äthernarkose durchgeführt werden. Postoperativ erholen sich die Tiere innerhalb kürzester Zeit und zeigen bei voller Agilität eine sehr hohe Überlebensrate. 10 Tage nach Eingriff hat sich die Restleber wieder zur Ausgangsgröße entwickelt. Zur Untersuchung der Pathophysiologie des akuten Leberversagens nach ausgedehnter Leberresektion, wurde die 90% Leberresektion als Modell ausgewählt. In zahlreichen Studien wurde bereits die Regeneration, das Überleben und die Struktur nach 90% Leberresektion beschrieben [EMOND et al. 1989, GAUB et al. 1984, PANIS et al. 1997]. Dieser Eingriff endet meist, im Gegensatz zur 70% Leberresektion, letal. PANIS et al. (1997) berichten nach 90% Leberresektion eine Mortalität von 70% für die ersten 24 Stunden [PANIS et al. 1997]. Eine postoperative Überlebenszeit von 48 Stunden war schließlich bei keinem der Versuchstiere mehr zu verzeichnen. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen stellte sich nach 90% Leberresektion postoperativ eine hohe Letalitätsrate ein. So bestand die Problematik, dass einerseits eine genügend hohe Überlebensrate erzielt werden musste, andererseits sollten aber auch die typischen pathophysiologischen Veränderungen in

Hämodynamik und Mikrozirkulation vorzufinden sein, die möglicherweise zum Auftreten eines postoperativen Leberversagens führen. Man geht in diesem Zusammenhang davon aus, dass das postoperative Leberversagen Folge einer hepatischen Hyperperfusion mit erhöhtem „shear stress“ ist. In der vorliegenden Untersuchung fand sich analog ein vierfach erhöhter hepatischer Flux.

Als Intervall zwischen Operation und Beginn der Messungen wurden sechs Stunden festgelegt. Bei einem kürzer gewählten Zeitraum wären die Ergebnisse zu sehr von dem bestehenden Volumenmangel oder der durch die Narkose auftretenden Kreislaufdepression beeinflusst. Nach ausgedehnter Leberresektion war der MAP um bis zu 50 mmHg niedriger als normal. Die Ursache für die Hypotension lag vor allem an dem entstehenden Volumenmangel, der unweigerlich bei einer 90% Resektion der Leber auftritt, die ein großes Fassungsvermögen für Blut aufweist. Der MAP sechs Stunden nach der resultierenden Preloadsenkung dokumentierte aber, dass sich die Tiere nicht im Schock befanden.

#### **7.1.4 Auswahl und Applikation des Metalloporphyrins**

Ausschlaggebend für die Wahl des verwendeten HO-1 Blockers waren die Häufigkeit seiner Anwendung in experimentellen und klinischen Modellen, sowie die potentielle Bedeutung bei zukünftigen Experimenten aufgrund spezieller chemischer oder physiologischer Eigenschaften. SnMP und SnPP wurden bislang experimentell am häufigsten eingesetzt. SnMP hat eine große klinische Bedeutung bei der Behandlung des Neugeborenenikterus erlangt [VREMAN et al. 1991 und 1993].

Parallel zur Gallengangsligatur, Leberresektion bzw. Sham-Operation erfolgte die Applikation von Metalloporphyrin- oder Kochsalzlösung. Diese kann prinzipiell sowohl oral, intraperitoneal als auch intravenös erfolgen. Da die Wirkdauer der Metalloporphyrine bei oraler Zufuhr jedoch nur zwischen 24 und 48 Stunden beträgt, wäre eine wiederholte Zufuhr während der 3 Tage zwischen Operation und Zeitpunkt der Untersuchung nötig gewesen [MORIOKA et al. 2006]. Nach parenteraler Verabreichung eines Metalloporphyrins dagegen lässt sich für einen Zeitraum von mindestens 4 Tagen bis zu einer Woche eine ausgeprägte Inhibition der HO-1-Aktivität nachweisen [RODGERS et al. 1996]. Damit war eine einmalige intravenöse perioperative Injektion eines Metalloporphyrins für eine HO-1 Inhibition über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg ausreichend.

## 7.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

### 7.2.1 Videofluoreszenzangiographie (IC-View®)

Mit dem IC-View-System® (siehe auch 5.3.2) wurde eine nicht-invasive Methode zur Messung der intestinalen Mikrozirkulation gewählt, die lediglich einen i.v.-Zugang erforderte. Der für dieses System verwendete Fluoreszenzfarbstoff ICG bietet die Vorteile, dass er als nicht toxisch gilt und mit einer Plasmahalbwertszeit von 3-4 Minuten relativ schnell abgebaut wird. Durch Bindung an die Plasmaproteine des Blutes bleibt, nach Sichtbarmachung des Farbstoffes, ICG intravasal. Somit wird die Bestimmung der ICG-Konzentration nicht durch Farbe, die im interstitiellen Raum ist, verfälscht [MOTHES et al. 2004]. ICG wird auch im klinischen Alltag verwendet. Erstmals klinisch eingesetzt wurde ICG 1957 im Bereich der Hepatologie und gilt seitdem als Leberfunktionstest [LEEVY et al. 1959, SCHEINGRABER et al. 2007 und 2008]. Später wurde es auch zur Bestimmung der Koronarperfusion verwendet [FOX et al. 1957 und 1960, MILLER et al. 1962]. FLOWER und HOCHHEIMER waren im Jahr 1976 die ersten, die sich die Fluoreszenz von ICG zur Darstellung von Gefäßen erfolgreich zu Nutze machten [FLOWER et al. 1976]. Mit dem IC-View®-System wird durch Aktivierung eines Laserlichts der Fluoreszenzfarbstoff ICG sichtbar gemacht. Hiermit steht ein neues System zur Verfügung, das in-vivo die Mikrozirkulation nicht-invasiv messen kann. Zahlreiche Studien legten ihren Schwerpunkt auf die Erfassung der Haut- bzw. Lappendurchblutung aus dem Bereich der plastischen Chirurgie, Unfall- oder Gefäßchirurgie [GREEN et al. 1992, RUBBEN et al. 1994, EREN et al. 1995, STILL et al. 1999, HOER et al 2002].

Im Vergleich zu anderen Methoden, zeigt IC-View® die Minderperfusion erheblich früher an [MOTHES et al. 2004], wodurch rechtzeitig therapiert werden kann und die Erfolgsrate deutlich erhöht wird. Tierexperimentell wurde die Messung der Darmperfusion bei Ratten mit Hilfe von IC-View® bereits von der Bonner Arbeitsgruppe eingesetzt und als reproduzierbares und zuverlässiges System bewertet [BEHRENDT et al. 2004]. Ein Nachteil dieses Untersuchungsverfahrens kann die Tatsache sein, dass die Laser-Fluoreszenz-Videographie ein dreidimensionales Gewebe als eine flache, zweidimensionale Ebene darstellt. Der Füllungszustand des Darms beeinflusst deshalb die Perfusionsmessung, indem ein gefüllter Darm durch Verdeckung der hinteren Darmwand die Fluoreszenzdetektion des in der Darmwand zirkulierenden ICG reduzieren könnte, und umgekehrt bei einem leeren Darm durch Summation von vorderer und hinterer Darmwand die Intensität des emittierten

Fluoreszenzsignals erhöht ist. Es wurde deshalb streng darauf geachtet, dass der zu untersuchende Darmabschnitt nicht stuhlgefüllt war. Des Weiteren spielte die Position der Darmschlingen eine wichtige Rolle. Quantitative Messungen von Licht und Energie führen aufgrund physikalischer Eigenschaften bei schrägen Ebenen zu Summationseffekten, weshalb es wichtig war, den Darm in möglichst planer Ebene aufzunehmen [TOENS et al. 2006].

## 7.2.2 Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF)

Abhängig von der benutzten Sondenform kann mit der Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) sowohl eine invasive als auch eine nicht-invasive Variante der Flussmessung zur Anwendung kommen. Die in dieser Studie verwendete Methode hat den Vorteil, dass sie nicht-invasiv ist, andererseits aber den Nachteil, dass sie nur eine Eindringtiefe von ca. 1 mm aufweist. Um Daten des gemessenen Blutflusses auswerten zu können, ist es wichtig, die genaue Eindringtiefe der Sonde zu kennen. Die Eindringtiefe des Lasers hängt ab vom Durchmesser der optischen Fasern, der Geometrie der Sonden und der verwendeten Wellenlänge [GUSH et al. 1984, JOHANSSON et al. 1991]. Gerade der mikroanatomische Aufbau der Darmwand mit seinen Schichten und den entsprechend unterschiedlichen Flussverhältnissen erfordert eine genaue Kenntnis der Messtiefe. Der mukosale Blutfluss ist um das zwei- bis vierfache höher als der Fluss der oberflächlich gelegenen Muskularisschicht [GRANGER et al. 1980]. Methodenbedingt war deshalb mittels des in dieser Untersuchung verwendeten LDF-Messsystems nicht genau vorherzusagen, in welchem Anteil der Darmwand der Flux ermittelt wurde. Die Varianz der Messungen am Darm war erfahrungsgemäß deutlich höher als beispielsweise bei Messungen an der Leber.

Zu beachten ist, dass die Untersuchungsmethode der LDF keine Absolutwerte liefert, sondern nur relative Veränderungen des Blutflusses erfasst, da sich die Perfusion Units aus der Geschwindigkeit der sich bewegenden Teilchen und der intravasalen oder auch interstitiellen Teilchenkonzentration ergeben. Verändert sich einer der beiden letztgenannten Parameter, kann eine unkalkulierbare Fluxänderung hervorgerufen werden [LEHMANN 2001]. Bei Änderungen des Hämatokritwertes (intravasale Konzentration) oder auftretenden Ödemen (interstitielle Konzentration) ändert sich somit zwangsläufig der in der LDF ermittelte Flux, ohne dass es aber tatsächlich zu einer Veränderung der Perfusion gekommen sein muss. Des Weiteren ist die Laser-Doppler-Flowmetrie, gerade am ausgelagerten Darm, limitiert durch

auftretende Bewegungsartefakte durch Atmung, intestinale Peristaltik oder Manipulation des Operateurs [AHN et al. 1986]. Das Auftreten von plötzlichem außergewöhnlichem Anstieg des Laser-Doppler-Signals, mangelnder Pulssynchronität und Rückgang der Gesamtrückstreuung machen aber die Artefakte vom normalen Blutfluss unterscheidbar. Die Gesamtrückstreuung ist die anteilige Menge des abgestrahlten Laserlichts, das vom Gewebe wieder zurück gestreut und von den optischen Fasern gemessen wird. Eine hohe Gesamtrückstreuung bedeutet eine passende optische Kopplung und somit ein Dopplersignal von hoher Qualität [RONHOLM et al. 2001]. Die Gesamtrückstreuung wurde in den vorliegenden Untersuchungen kontinuierlich erfasst und diente als Qualitätskontrolle des Messsignals. Es wurden nur Messungen mit ausreichend hoher Gesamtrückstreuung erfasst.

### **7.2.3 Intravitalmikroskopie**

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der Leber ist eine etablierte Untersuchungsmethode, die an vielerlei Tiermodellen, wie etwa Mäusen [RAPPAPORT, 1977], Hamstern und Ratten [MENGER et al. 1991] durchgeführt worden ist. Erstmals beschrieben wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen der Lebermikrozirkulation 1939 [KNISELY et al. 1939], in den Folgejahren wurde diese Methode dann stetig weiterentwickelt und verbessert und gilt somit inzwischen als Standardmethode für mikrozirkulatorische Analysen. Grundsätzlich ist die Analyse der Mikrozirkulation mittels Epi-Illumination (Auflicht) oder Trans-Illumination (Durchlicht) möglich. Frühe intravitalmikroskopische Untersuchungen nutzten dabei vor allem die Trans-Illuminations-Technik [BLOCH 1955]. Um jedoch die Lebermikrozirkulation optimal analysieren zu können, eignet sich eher die Technik der Epi-Illumination. Die Trans-Illumination ist auf eine sehr dünne Gewebedicke angewiesen, was die Untersuchung der Leber auf den äußersten Leberrand beschränkt und somit zu einer limitierten Anzahl an untersuchbaren Azini führen würde. Außerdem ist die Untersuchung des Leberrandes durch mögliche mechanische Manipulationen im Rahmen der Präparation und der Auslagerung wie durch mögliche Austrocknung während der Mikroskopie in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Demgegenüber bietet die Technik der Epi-Illumination den Vorteil, dass die Mikroskopie unabhängig von der Gewebedicke an jeder beliebigen Stelle einer Organoberfläche durchgeführt werden kann [RAPPAPORT et al., 1958], wobei man entsprechend der Homogenitätshypothese davon ausgeht, dass die ausgesuchten Areale mit

den zu untersuchenden Gefäßen im vorliegenden Beispiel repräsentativ für das gesamte untersuchte Organ sind. Der Nachteil der Intravitalmikroskopie besteht in der dazu nötigen chirurgischen Manipulation des Versuchstiers, die eine Narkose des Tieres unvermeidbar macht. Schon allein durch die chirurgische Präparation kommt es zu einer Beeinträchtigung der Organperfusion, verantwortlich dafür ist insbesondere die Laparotomie [GELMAN et al. 1976, BOHRER et al. 1981]. Um die Leber oder den Darm überhaupt mikroskopisch untersuchen zu können, erfolgt eine Auslagerung des jeweiligen Organs auf ein Stativ zur Verminderung der Atemexkursionen. Anschließend wird das zu untersuchende Organ mit Kochsalzlösung benetzt und mit einem Deckglas abgedeckt. Bei diesem Manöver besteht prinzipiell immer die Möglichkeit der Alteration der Organperfusion. Durch die Notwendigkeit der systemischen Applikation von phototoxischen Fluoreszenzfarbstoffen (z. B. Fluorescein-Isothiocyanat) ist die Technik der Epi-Illumination nur beschränkt einsetzbar [SAETZLER et al. 1995]. Da eine längere Lichtexposition während einer Intravitalmikroskopie intrazelluläre photodynamische Prozesse induzieren kann [STEINBAUER et al. 2000], wurde bei der Auswahl der Gesichtsfelder darauf geachtet, während einer intravitalmikroskopischen Untersuchung nicht in unmittelbarer Nähe eines bereits belichteten Areals wiederholt zu mikroskopieren. Bisher wurde in der Intravitalmikroskopie noch keine Erfahrung mit SnMP gemacht. Die Phototoxizität der Metalloporphyrine im Allgemeinen ist aber bekannt. Daher sollte die Dosis möglichst gering gehalten werden.

## **7.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **7.3.1 Inhibition der HO-1 verstärkt die durch Cholestase bedingte Beeinträchtigung der Darmdurchblutung und Schädigung der Villusstruktur**

Die Untersuchungen des Darmes haben eindrücklich gezeigt, dass die BDL zu deutlichen Perfusionsdefekten der Darmwand, sowie zu manifesten morphologischen Schäden an den Dünndarmvilli führt. Die endogen induzierte HO-1 wirkt wohl protektiv, da die Hemmung der HO-1 zu einer stärkeren Schädigung in der Lamina propria der intestinalen Villi führte. Sowohl nach BDL, als auch nach HO-1 Blockade war außerdem eine erhöhte

HO-1 Proteinexpression in den Villi nachweisbar. Ähnlich wie schon bei der Leber diskutiert, fand sich auch unter physiologischen Bedingungen eine gewisse HO-1 Expression vor allem im Stroma der Lamina propria. Nur vereinzelt hatten sich die Enterozyten positiv auf HO-1 angefärbt. Diese Befunde decken sich mit Beobachtungen an isolierten Villuszellen der Ratte [HARTMANN et al. 1982] und immunhistochemischen Untersuchungen [DIJKSTRA et al. 2004]. Unter Stressbedingungen änderte sich das Muster hin zu einer Zunahme der HO-1 Expression vor allem der Enterozyten. Eine ähnliche Zunahme der Expression in den Enterozyten (Epithelzellen) wurde bereits nach Applikation von vermehrtem oxidativem Stress, nicht aber nach Endotoxingabe beschrieben [DIJKSTRA et al. 2004].

Schon in der Vergangenheit wurde die Darm-Leber-Achse bei Cholestase untersucht. Hierbei wandte sich die Aufmerksamkeit vor allem auf die gestörte Kupfferzellclearance aus dem portalen Blut, welche eine Einschwemmung von Bakterien und Endotoxin in den systemischen Kreislauf bis hin zum Auftreten eines Organversagens nach sich zieht [CLEMENT et al. 1998, SILIERI et al. 2002, MARGARITIS et al. 2005]. Es wurde nachgewiesen, dass das Fehlen von Gallensaft im Darm mit einer Endotoxinämie im Pfortaderblut einhergeht [DING et al. 1993]. Der genaue Mechanismus hierfür ist zwar nicht bekannt, es ist aber anzunehmen dass für die bakterielle Translokation bzw. Einschwemmung von Endotoxin eine intestinale Schrankenstörung verantwortlich ist. Es finden sich übereinstimmende Berichte eines subepithelialen Ödems in der Lamina propria mit einem resultierenden Abheben der Epithelschicht neben dilatierten Lymphgefäßen und Infiltration der Villi mit Entzündungszellen unter BDL [SLOCUM et al. 1992, DING et al. 1993, WEIXIONG et al. 1994]. Darüber hinaus hatte sich in der Elektronenmikroskopie eine Verdünnung der mukosalen Oberfläche, eine Separierung und Vakuolenbildung der Enterozyten mit Aufbrechen der Desmosomen und Bildung interzellulärer Spalträume gezeigt [PARKS et al. 2000]. Derartige Schäden finden sich auch beim hämorrhagischen Schock und stellen wohl ein allgemeines Prinzip morphologischer Schäden am Darm dar [CHIU et al. 1970]. Durch die Verwendung des standardisierten Klassifikationssystems zur Beschreibung der ilealen Mukosa lassen sich die intestinalen Schäden in unterschiedlichen Modellen miteinander vergleichen. So trat nach 30-minütiger Okklusion der Arteria mesenterica superior (AMS) mit anschließender zweistündiger Reperfusion eine Schädigung mit einem histologischen Score von etwa 3 (denudierte Villi und deutliches Abheben der Epithelschicht) auf [MALLICK et al. 2006], während 60-minütige Okklusion der AMS mit daran anschließender 60-minütiger Reperfusion einen Score von  $4,6 \pm 0,4$  (vollständige Zerstörung der Villi) ergab [ATTUWAYBI et al. 2004]. Interessanterweise hatte in beiden Fällen die HO-1 Induktion mit Hämin bzw.

Pyrrolidin-Dithiocarbamat zu einer Halbierung des Scorewertes geführt. Immerhin lag im Vergleich zu den Daten aus der Literatur in der vorliegenden Studie der Scorewert nach Gallengangsligatur und HO-1 Inhibition bei  $3,4 \pm 0,3$  und damit im Bereich eines signifikanten Ischämie-/Reperfusionsschadens. Die HO-1 Blockade hatte den Villusschaden um etwa 50% verstärkt, denn in den Darmschnitten der Gruppe mit Gallengangsligatur alleine betrug der Scorewert nur  $2,1 \pm 0,1$ . Wie diese strukturellen Schädigungen des Darmendothels nach Gallengangsligatur entstehen, ist noch unklar.

Eine Theorie postuliert beim hämorrhagischen Schock eine gesteigerte intestinale Permeabilität als Folge einer bakteriellen Schädigung bei pathologischer Darmflora [KOZIOL et al. 1988]. Die veränderte Darmflora könnte Folge eines Überwucherns pathologischer Darmbakterien als Folge des Gallensaftverlustes im Darm sein [DING et al. 1993]. Ein anderes Erklärungsmodell geht davon aus, dass die strukturellen Schäden am Villus weniger Folge einer bakteriellen Schädigung als vielmehr Ausdruck einer Störung des nutritiven Blutflusses sind [CHIU et al. 1970]. Als Beleg dafür wird geltend gemacht, dass die zu beobachtenden Schäden als erstes an der Spitze der Villi, also in dem Areal, welches auf Sauerstoffmangel am empfindlichsten reagiert, auftreten [LUNDGREN et al. 1978]. Durch die räumliche Nähe zuführender Arteriolen und abführender Venolen kommt es bei einer Blutflussreduktion, z. B. im Rahmen einer Hypotonie, besonders schnell zu einem Austausch von Sauerstoff zwischen den Gefäßen (Sauerstoffgegenstromprinzip) und damit zu einem Sauerstoffmangel, der von der Basis zur Spitze des Villus hin zunimmt.

Während dieses pathophysiologische Prinzip für das Modell des hämorrhagischen Schocks offenkundig ist, ist die Übertragung dieses Prinzips auf das Modell der BDL nicht ohne weiteres möglich. Einziger Anhaltspunkt für die Gültigkeit dieser Hypothese ist bisher in der Literatur die Beobachtung, dass die Gallensalze vasoaktive Eigenschaften haben. Es wurde gezeigt, dass Gallensalze am Ileum vasodilatierend wirken und somit zu einer Hyperämie führen [KVIETYS et al. 1981]. Dabei war es übrigens unerheblich, ob die Gallensäuren oral bzw. endoluminal oder über die Arteria mesenterica superior gegeben wurden. Neben diesen Befunden finden sich aber bisher in der Literatur keine Untersuchungen zu der Frage, ob das Vorhandensein von Gallensalzen im Darm bzw. ein kontinuierlicher Gallefluss für die Aufrechterhaltung der intestinalen Perfusion unter physiologischen Bedingungen notwendig ist. Aus diesem Grund stellen die Ergebnisse aus Abschnitt 6.1 zum ersten Mal einen Nachweis einer gestörten intestinalen Perfusion bei BDL dar. Dabei zeigt die intestinale Perfusionsstörung ein ganz charakteristisches, fleckförmiges Muster mit minderperfundierten Arealen neben anscheinend normal perfundierten Arealen.

Zur Messung der intestinalen Perfusion wurde eine Videofluoreszenzangiographie eines etwa 15 cm langen Ileumsegmentes durchgeführt (siehe auch 5.3.2 und 6.1.2). Der Vorteil dieses Verfahrens gerade auch gegenüber der Intravitalmikroskopie war der Nachweis dieser fleckförmigen Veränderungen. Die Perfusionsausfälle waren nicht nur nach BDL, sondern auch nach HO-1 Blockade zu beobachten. Nachdem vor allem auch schon die HO-1 Blockade bei Sham-operierten Tieren zu intestinalen Perfusionsausfällen führte, spielt die HO-1 wohl eine Rolle für die intestinale Perfusion unter physiologischen Bedingungen. Dieser Befund deckt sich auch mit der relativ hohen HO-1 Expression in der Lamina propria unter physiologischen Bedingungen. Interessanterweise entsprechen die Beobachtungen der verminderten Darmperfusion auch denen von BEHRENDT und Mitarbeiter 24 Stunden nach intestinaler Manipulation [BEHRENDT et al. 2004].

Im Gegensatz zu den dokumentierten Störungen der intestinalen Gewebsperfusion zeigten sich nach Auswertung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen weder Veränderungen in der Anzahl perfundierter Tunica muscularis Gefäße noch Veränderungen der Flussgeschwindigkeit in diesen Gefäßen. Normalerweise umfasst bei nüchternen Tieren der Blutfluss in der Mucosa bereits 70-80% des gesamten intestinalen Blutflusses, während sich der Rest auf Muscularis, Submucosa und Serosa verteilt [CHOU 1992]. Nach Endotoxinämie zeigte sich eine weitere Verteilung des intestinalen Blutflusses von der Tunica muscularis hin zur Mucosa, auch bei möglicherweise konstantem Herzzeitvolumen [REVELLY et al. 1996]. Damit droht der Tunica muscularis eine relevante Ischämie mit den Folgen der Paralyse bzw. spontanen Perforation. In den vorliegenden Untersuchungen ließ sich eine derartige Beeinträchtigung der Durchblutung in der Tunica muscularis nicht nachweisen.

Die vorliegenden Daten sind die ersten, die eine Rolle der intestinalen HO-1 für die Darmperfusion und Darmschädigung im Modell der BDL thematisieren. BDL und SnMP-Gabe führten zu einer verstärkten intestinalen HO-1 Expression. Wiederum zeigt sich das Phänomen einer verstärkten HO-1 Expression nach funktioneller Blockade, nicht nur bei der Leber, sondern diesmal auch am Darm. Gleiche Befunde am Darm waren auch von anderen Arbeitsgruppen unter Einsatz von SnPP oder ZnPP berichtet worden [MALLICK et al. 2005, GIRIŞ et al. 2006, GAN et al. 2007]. Die verstärkte HO-1 Expression fand sich sowohl nach BDL als auch nach SnMP-Gabe in etwa gleichem Ausmaß und spielte sich vor allem an der Spitze des Villus ab. Interessanterweise korrelierte die HO-1 Expression mit dem Schädigungsgrad. Die HO-1 Inhibition aggravierte die Schäden, die in der Lamina propria nach Gallengangsligatur zu beobachten waren und führte auch schon zu nachweisbaren Schäden beim gesunden, nicht der Gallengangsligatur ausgesetzten Darm. Damit wies die

HO-1 protektive Eigenschaften für die intestinale Integrität auf. Ähnlich wie schon bei der Leber können aufgrund der Komplexität der HO-1-vermittelten Effekte mehrere Mechanismen dafür in Frage kommen.

Zunächst war nach 30-minütiger Okklusion der AMS (Arteria mesenterica superior) aufgefallen, dass eine ischämische Präkonditionierung mit vorausgegangener zehnminütiger Okklusion der AMS und daran anschließender zehnminütiger Freigabe des Blutstromes, die Anzahl adhärenter Leukozyten im Kapillarendothel der Villusgefäße gegenüber der Gruppe ohne ischämische Präkonditionierung reduziert hatte [MALLICK et al. 2005]. Interessanterweise hatte die HO-1 Blockade mittels ZnPP diesen protektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung größtenteils aufgehoben. Nach Ischämie/Reperfusion konnte außerdem gezeigt werden, dass die Bildung von Sauerstoffradikalen mit dem Villusschaden korrelierte [WEIXIONG et al. 1994]. Obwohl nicht gesondert gemessen, kann auch bei den beschriebenen Perfusionsstörungen des Darmes eine vermehrte Radikalenbildung postuliert werden. Die vermehrte Bilirubinproduktion durch HO-1 Induktion hätte demzufolge als Radikalenfänger den oxidativen Stress und damit den intestinalen Schaden minimiert. Jedoch finden sich nach BDL erhöhte Bilirubinkonzentrationen per definitionem und es ist somit fraglich, ob die HO-1-abhängige Bilirubinproduktion tatsächlich der Mechanismus ist, der die Zytoprotektion am Villus vermittelt.

Über den anderen möglichen Kandidaten der HO-1-vermittelten Zytoprotektion, nämlich CO, liegen bisher keine Untersuchungen einer möglichen Regulation der Durchblutung für den Darm vor. Arteriolen, präkapillare Sphinktere, Kapillarendothelien sowie Perizyten steuern, wohl auf Grund ihrer Ausstattung mit kontraktilen Filamenten, den Blutfluss in der intestinalen Endstrombahn [HIRSCHI et al. 1996, WILLE et SCHNORR 2003]. Im Hinblick auf mögliche Angriffspunkte für CO scheint vor allem das perizytäre Zytoskelett mit seinem hohen Anteil an alpha-glattem Muskelaktin, welches nahezu komplett das kapillare Netzwerk der Villusgefäße umwebt, von besonderem Interesse zu sein. Bei der Leber entsprechen diese Perizyten mit ihren kontraktilen Fortsätzen den Itozellen, für die gezeigt worden ist, dass sie hauptsächlich für die CO-abhängige sinusoidale Blutflussregulation verantwortlich zu machen sind [SUEMATSU et al. 1995, SUEMATSU et al. 1996]. Außerdem ist bekannt, dass CO die Thrombozytenaggregation hemmt, was aufgrund des ungehinderten Flusses zu einer Erhöhung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit in der Mikrostrombahn führt [BRUNE et al. 1987]. Damit verbunden sind ein verbesserter nutritiver Blutfluss sowie eine verbesserte Elimination toxischer Produkte. Tatsächlich konnte in einer

tierexperimentellen Studie bereits das Konzept einer CO-vermittelten intestinalen Zytoprotektion untermauert werden [NAKAO et al. 2003]. Bei der Dünndarmtransplantation der Ratte hatte die Inhalation von CO zu einer deutlichen Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens geführt. Eine gleichartige günstige Wirkung der exogenen CO-Gabe für die intestinale Integrität ist auch bei anderen Modellen vorstellbar.

### **7.3.2 HO-1 vermindert die Schädigung der intestinalen Villi bei 90% Leberresektion**

Nach 90% Leberresektion war, wie auch schon nach BDL, eine Störung der intestinalen Perfusion und Villusintegrität zu verzeichnen. Diese Befunde unterstreichen die Hypothese, dass Schädigungen am Darm zur Pathogenese des Leberversagens nach ausgedehnter Leberresektion beitragen [VAN LEEUWEN et al. 1991, BOERMEESTER et al. 1995]. Darüber hinaus hatte die HO-1 Blockade auch die Beeinträchtigung der Darmdurchblutung und Schädigungen am Villus verschärft. Ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen Pathologien des Darmes und der Leber wird durch die Hypothese der bakteriellen Translokation postuliert. Die bakterielle Translokation wurde formuliert, nachdem Darmbakterien außerhalb des Darmes beispielsweise in mesenterialen Lymphknoten aber auch Organen wie Leber, Milz oder Lunge kultiviert werden konnten [BERG et al. 1979]. Die bakterielle Translokation kann ganz unterschiedlichen Ätiologien wie dem hämorrhagischen Schock, dem Verbrennungstrauma, der totalen parenteralen Ernährung, entzündlichen Darmerkrankungen, sowie der intestinalen Obstruktion zugeordnet werden mit jeweils ganz unterschiedlichen klinischen Verläufen. Die bakterielle Translokation wurde auch nach Leberresektionen und zwar schon nach zwei Stunden beobachtet [WANG et al. 1995]. Die bakterielle Translokation wurde sowohl nach Leberresektionen bei Cholestase [NORIOKA et al. 2002] als auch bei 90% Leberresektion beschrieben [WANG et al. 1993].

Der genaue Mechanismus wodurch die bakterielle Translokation ausgelöst wird ist weder für die Leberresektion noch für die BDL bekannt. Auch in Zusammenhang mit der Leberresektion wurde die mukosale Schrankenstörung als Folge einer toxischen Schädigung bakterieller Endo- oder Exotoxine [STEFFEN et al. 1983, BATT et al. 1984, NORIOKA et al. 2002] oder als Zytokin- oder Radikalen-vermitteltes Trauma interpretiert [DEITCH et al. 1988]. Nachdem die bakterielle Translokation aber bereits schon zwei Stunden nach

Leberresektion beobachtet wurde, ist es fraglich, ob tatsächlich diese Erklärungsmodelle Richtigkeit besitzen.

Eine andere Hypothese geht von einer ischämischen Schädigung der mukosalen Schranke aus. Unter dieser Vorstellung wurde in den vorliegenden Untersuchungen erstmalig die intestinale Perfusion nach Leberresektion thematisiert. Nach 90% Leberresektion trat eine leichte Hypotonie auf, die aber nicht so ausgeprägt war, als dass schon eine mukosale Ischämie zu erwarten gewesen wäre. Zum Vergleich trat beim hämorrhagischen Schock die bakterielle Translokation nicht vor zwei Stunden bei einem arteriellen Mitteldruck von 30 mmHg auf [KOZIOL et al. 1988]. Trotz des signifikanten, aber nicht kritischen Blutdruckabfalls hatte sich die Blutflussgeschwindigkeit in den Muskularisgefäßen nicht signifikant vermindert, und war in den intestinalen Villi nach Leberresektion und SnMP-Gabe sogar leicht erhöht. Nach 90% Leberresektion war der Leberblutfluss vervierfacht. In vorhergegangenen Studien wurde gezeigt, dass die 70%, wie auch die 90% Leberresektion zu einem intermittierenden Anstieg des Pfortaderdrucks und einer relativen Zunahme des portalen Flusses pro Lebergewebe führen, nachdem der gesamte Pfortaderstrom durch die kleine Restleber fließen muss [SATO et al. 1997, LAI et al. 2000, MORSIANI et al. 1998, RICHTER 2008]. Der Anstieg des portalvenösen Drucks zieht eine myogen-kontrollierte arterielle Vasokonstriktion im intestinalen Stromgebiet nach sich, die zu einer verminderten intestinalen Perfusion führt [GRANGER et al. 1980]. Dies konnte auch in einer klinischen Studie bei Lebertransplantationen gezeigt werden, indem während der anhepatischen Phase bei vollständig okkludierter Vena portae die Dünndarmdurchblutung abnimmt [RONHOLM et al. 2001].

Auch in dem Untersuchungsabschnitt der intestinalen Perfusion nach 90% Leberresektion fand sich bei der Videofluoreszenzangiographie eines etwa 15 cm langen ausgelagerten Ileumsegmentes eine fleckförmige Beeinträchtigung der Perfusion nach Leberresektion, HO-1 Blockade und Kombination von Leberresektion und HO-1 Blockade. Wiederum zeigte sich, dass einerseits die Perfusionsdefekte nicht einfach nur Ausdruck eines Abfalls des systemischen Blutdrucks waren und andererseits, dass die HO-1 offenbar auch unter physiologischen Bedingungen eine Rolle für die Regulation der intestinalen Perfusion spielt. Im Gegensatz zu dem Untersuchungsabschnitt der intestinalen Perfusion nach BDL konnte nun auch in der Intravitalmikroskopie nach Leberresektion eine signifikante Abnahme der Anzahl der perfundierten Tunica muscularis-Gefäße beobachtet werden. HO-1 Blockade hatte den Perfusionsausfall verstärkt. Eine Veränderung des Gefäßdurchmessers z. B. als Folge eines Wegfalls des möglichen Vasodilatators CO konnte aber nicht gezeigt werden. In

diesem Untersuchungsabschnitt wurde aber zusätzlich wegen der oben beschriebenen Zunahme der mukosalen Perfusion auf Kosten der Perfusion der Tunica muscularis auch eine Intravitalmikroskopie der Villi durchgeführt. Tatsächlich zeigte die Messung der Fließgeschwindigkeit eine Abnahme in den Tunica muscularis-Gefäßen und eine Zunahme in den Villi nach Leberresektion und HO-1 Blockade.

Nach Leberresektion wurden verschiedene histologische Schäden der Darmwand beschrieben. Bereits nach vier Stunden wurden eine Degeneration der Enterozyten, eine Verkürzung der Villi und nekrotische Areale in der Mucosa beobachtet [WANG et al. 1983]. Diese Veränderungen waren im Ileum und Dickdarm ausgeprägter als im Jejunum. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten bereits nach 70% Leberresektion eine Verkürzung und Verdickung der Villi [WANG et al. 1995]. Außerdem waren die Mitochondrien geschwollen und vor allem in der Submucosa haben sich Makrophagen angereichert. Diese Beobachtungen wurden auch nach 90% Leberresektion bestätigt [WANG et al. 1994]. In den Untersuchungen des Abschnitts 6.2.4 waren nicht nur Veränderungen der Enterozyten, sondern auch im Bereich der Lamina propria aufgezeigt worden. Ähnliche Veränderungen sind auch nach Ischämie und Reperfusion oder hämorrhagischem Schock gesehen und klassifiziert worden [CHIU et al. 1970, MALLICK et al. 2005]. Die HO-1 Blockade hatte die histologischen Schäden, nämlich die Auflockerung in der Lamina propria mit Bildung von Vakuolen und die Destruktion der Enterozyten, verstärkt. Nachdem die Transaminasen sich gleichermaßen wie die LDH verändert hatten, sind LDH Messungen wenig spezifische Marker eines intestinalen Schadens. Die erhöhten LDH Konzentrationen resultierten am ehesten auch von den Schäden der Restleber nach ausgedehnter Leberresektion.

### **7.3.3 HO-1 bei Cholestase und nach Leberresektion: zytotoxisch oder zytoprotektiv?**

Am Ende steht nun die Frage, ob die HO-1 zytotoxische oder zytoprotektive Eigenschaften aufweist. Nach vorliegenden Untersuchungen lautet die Antwort: sowohl als auch. Auch wenn die HO-1, wie in 3.2 dargestellt, in allen möglichen Stressmodellen involviert zu sein scheint, wirken sich die vier Eigenschaften der HO-1 (Abbau von Häm, Bildung von CO, Eisen und Biliverdin) jeweils ganz unterschiedlich aus. Hierbei darf auch nicht nur ein Organ betrachtet werden.

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die HO-1 Inhibition sowohl bei Gallengangsligatur als auch nach 90% Leberresektion eine schädigende Wirkung auf den Darm hat. In einer anderen Studie führte aber die HO-1 Inhibition nach Leberresektion bei Gallengangsligatur zu einer verbesserten Überlebensrate [SCHEINGRABER et al. 2009]. Damit wird deutlich, wie wichtig es ist, beispielsweise beim Modell der Cholestase nicht nur auf ein Organ zu fokussieren, sondern möglichst das Zusammenspiel vor Augen zu haben. Auch wenn die Cholestase zu erheblichen Schädigungen am Darm geführt hat und HO-1 Inhibition die Darmdurchblutung zusätzlich gestört und sogar histologische Schäden verursacht hat, hat dieser Effekt offenbar keine Rolle für das Überleben gespielt. Eine Reduktion der Schädigung in der Leber scheint damit bei der Cholestase wichtiger als eine Reduktion der Schäden am Darm. Ein genaues Verständnis derartiger Zusammenhänge ist wichtig für das Entwickeln neuer Konzepte. Bei isolierter Betrachtungsweise der protektiven Effekte der HO-1 im Modell der Gallengangsligatur beim Darm wäre man motiviert der Frage nachzugehen, ob eine zusätzliche HO-1 Stimulation noch mehr Protektion bieten würde. Tatsächlich war dies auch im Ischämie-/Reperfusionmodell der Fall. Die Gabe von unterschiedlichen HO-1 Induktoren führte zu einer signifikanten Reduktion der histologischen Schäden am Darm nach Okklusion der AMS mit anschließender Reperfusion, bei der Strahlenenteritis, sowie der intestinalen Atonie nach Verbrennungstrauma [ATTUWAYBI et al. 2004, MALLICK et al. 2006, GIRIŞ et al. 2006, WASSERBERG et al. 2007, GAN et CHEN 2007]. Andererseits stellte die Arbeitsgruppe Froh et al. durch den Einsatz des HO-1 Induktors CoPP und der damit verbundenen HO-1 Überexpression eine zunehmende Leberfibrose nach BDL fest [Froh et al. 2007]. In Kenntnis dieser Daten scheint eine weitere Stimulation nicht sinnvoll.

Eine ganz andere Bedeutung hat die HO-1 bei der 90% Leberresektion. Hier hatte die Inhibition der HO-1 zu einer, wenn auch in der statistischen Testung nicht signifikanten Reduktion des systemischen Blutdrucks und der hepatischen Mikrozirkulation geführt. Am Darm hatte die fleckförmige Perfusionsstörung zugenommen, eine schocktypische Umverteilung der Darmwandperfusion stattgefunden und der Villusschaden sich verstärkt. Während der Versuche war nicht aufgefallen, dass sich durch HO-1 Inhibition das ohnehin limitierte Überleben nach 90% Leberresektion verändert hätte. Von daher ist es ein sinnvoller Ansatz zu untersuchen, ob durch eine HO-1 Stimulation das Überleben nach Leberresektion verbessert werden kann. Relativ aktuelle Untersuchungsbefunde einer Vorbehandlung mit hyperbarem Sauerstoff (HBO) untermauern diesen Ansatz [MORI et al. 2007]. Durch dreitägige HBO konnte eindrucksvoll das Überleben bei der 90% Leberresektion der Ratte verbessert werden. Die HBO führte verglichen mit Kontrolltieren ohne HBO zu einem 1,38-fachen Anstieg der HO-1 mRNA und 3-fachen Zunahme der HO-1 auf Proteinebene. Neben dem Überleben, war der Lebergewicht/Körpergewicht-Quotient ebenso wie die Leberlaborparameter in der HBO-Gruppe günstiger. Weitere Untersuchungen mit anderen Stimulatoren für die HO-1 müssen aber erfolgen, um tatsächlich der HO-1 die Verantwortung für das verbesserte Überleben nach 90% Leberresektion zuzuschreiben.

## 8 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BDL	Gallengangsligatur (= bile duct ligation)
bzw.	beziehungsweise
CCl <sub>4</sub>	Tetrachlorkohlenstoff
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
chron.	chronisch
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoPP	Cobalt-Protoporphyrin
CrMP	Chrom-Mesoporphyrin
e. g.	exempli gratia (engl. für zum Beispiel)
Fe <sup>2+</sup>	Eisen (2-wertige Ionen)
FITC	Fluoreszein-isothio-zyanat
g	Gramm
HF	Herzfrequenz
HO-1	Hämoxygenase-1
ICG	Indocyaningrün
i. v.	intravenös
IVM	Intravitalmikroskopie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LDF	Laser-Doppler-Flowmetrie
LRES	Leberresektion
MAP	mittlerer arterieller Druck
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinasen
MP	Metalloporphyrin
MRP	multidrug resistance protein
MW	Mittelwert
n. a.	numerische Apertur
NO	Stickstoffmonoxid

---

NOS	NO-Synthetase
OP	Operation
PU	perfusion units
r	Radius
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
sGC	lösliche Guanylatcyclase
Sham-Op	Scheinoperation
SnMP	Zinn-Mesoporphyrin
SnPP-IX	Zinn-Protoporphyrin-IX
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
u.v.a.m.	und viele andere mehr
v	Geschwindigkeit
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
ZnPP	Zink-Protoporphyrin

## 9 LITERATUR

1. Ahn H, Lindhagen J, Nilsson GE, Oberg PA, Lundgren O. Assessment of blood flow in the small intestine with laser doppler flowmetry. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21:863-870
2. Alam J, Caj J, Smith A. Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase-1 gene. Distal 5' sequences are required for induction by heme or heavy metals. *J Biol Chem* 1994; 269:1001-1009
3. Albright JW, Matuszewicz NM, Albright JF. Aging of the murine immune system is reflected by declining ability to generate antibodies that promote elimination of trypanosoma musculi. *J Immunol* 1988; 141:1318-1325
4. Alrefei WA, Gill RK. Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res* 2007; 24:1803-1823
5. Amersi F, Buelow R, Kato H, Ke B, Coito A, Shen X, Zhao D, Zaky J, Melinek J, Lassman C, Kolls J, Alam J, Ritter T, Volk H, Farmer D, Ghobral R, Busuttill R, Kupiec-Weglinski J. Up regulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 1999; 104:1631-1639
6. Appleton SD, Chretien ML, Mclaughlin BE, Vreman HJ, Stevenson DK, Brien JF, Nakatsu K, Maurice DH, Marks GS. Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug Metab Dispos* 1999; 10:1214-1219
7. Armstrong CP, Dixon JM, Taylor TV, Davies GC. Surgical experience of deeply jaundiced patients with bile duct obstruction. *Br J Surg* 1984; 71:234-238
8. Attuwaybi BO, Hassoun HT, Zou L, Kozar RA, Kone BC, Weisbrodt NW, Moore FA. Hypothermia protects against gut Ischemia/Reperfusion-induced impaired intestinal transit by inducing heme oxygenase-1. *J Surg Res* 2003; 115:48-55
9. Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, Sato N, Hassoun HT, Weisbrodt-Moore FA. Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2004; 118:53-57
10. Baer HU, Guastella T, Wheatley AM, Zimmermann A, Blumgart LH. Acute effects of partial hepatectomy on liver blood flow in the jaundiced rat. *J Hepatol* 1993; 19:377-382
11. Balla G, Jacob H, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton J, Vercellotti G. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* 1992; 267:18148-18153
12. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:9285-9289
13. Balla J, Vercellotti GM, Nath K, Yachie A, Nagy E, Eaton JW, Balla G. Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:8-12
14. Baranano D, Rao M, Ferris C, Snyder S. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:16093-16098
15. Batt RM, Carter MW, Peters TJ. Biochemical changes in the jejunal mucosa of dogs with a naturally occurring enteropathy associated with bacterial overgrowth. *Gut* 1984; 25:816-823

16. Bauer I, Wanner G, Rensing H, Alte C, Miescher E, Wolf B, Pannen B, Clemens M, Bauer M. Expression pattern of heme oxygenase isoenzymes 1 and 2 in normal and stressexposed rat liver. *Hepatology* 1998; 27:829-838
17. Behrendt FF, Tolba RH, Overhaus M, Hirner A, Minor T, Kalff JC. Indocyanine green fluorescence measurement of intestinal transit and gut perfusion after intestinal manipulation. *Eur Surg Res* 2004; 36:210-218
18. Belboul A, Lofgren C, Storm C, Jungbeck M. Heparin-coated circuits reduce occult myocardial damage during CPB: A randomized, single blind clinical trial. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000; 17:580-586
19. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23:403-411
20. Bird MA, Lange PA, Schrum LW, Grisham JW, Rippe RA, Behrns KE. Cholestasis induces murine hepatocyte apoptosis and DNA synthesis with preservation of the immediate-early gene response. *Surgery* 2002; 131:556-563
21. Bismuth H, Houssin D, Mazmanian G. Postoperative liver insufficiency: prevention and management. *World J Surg* 1983; 7:505-510
22. Bissell D, Hammaker L, Schmid R. Hemoglobin and erythrocyte catabolism in rat liver: the separate roles of parenchymal and sinusoidal cells. *Blood* 1972; 40:812-822
23. Bloch EC. In vivo microscopic observations of the circulating blood in acute myocardial infarction. *Am J Med Sci.* 1955; 229:280-294
24. Boermeester MA, Straatsburg IH, Houdijk APJ, Meyer C, Frederiks WM, Wesdorp RIC, Van Noorden CJF, Van Leeuwen PAM. Endotoxin and interleukin-1 related hepatic inflammatory response promotes liver failure after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995; 22:1499-1506
25. Bohlen HG. Integration of intestinal structure, function, and microvascular regulation. *Microcirculation* 1998; 5:27-37
26. Bohrer SL, Rogers EL, Koehler RC, Traystman RJ. Effect of hypovolemic hypotension and laparotomy on splanchnic and hepatic arterial blood flow in dogs. *Curr Surg* 1981; 38:325-328
27. Bongard O, Fagrell B. Variations in laser Doppler flux and flow motion patterns in the dorsal skin of the human foot. *Microvasc Res* 1990; 39:212-222
28. Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol* 1987; 32:497-504
29. Bühren V. Hohe Aortenblockade nach Trauma. Klinische Bedeutung und experimentelle Studie. Habilitationsschrift, Homburg, Universität des Saarlandes 1989.
30. Cahill CJ, Pain JA, Bailey ME. Bile salts, endotoxin and renal function in obstructive jaundice. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 165:519-522
31. Chen Y, Gines P, Yan J, Summer S, Falk S, Russel N, Schrier R. Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 2004; 39:1075-1087
32. Cherqui D, Benoist S, Malassagne B, Humeres R, Rodriguez V, Fagniez PL. Major liver resection for carcinoma in jaundiced patients without preoperative biliary drainage. *Arch Surg* 2000; 135:302-308
33. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101:478-483

34. Chou C, Intestinal blood flow regulation. In R. Dulbecco (ed), Encyclopedia of human biology. San Diego: Academic Press 1992; 4:547-556
35. Christ F, Bauer A, Brügger D. Different optical methods for clinical monitoring of the microcirculation. *Eur Surg Res* 2002; 34:145-151
36. Clement W, Erwin P, McCaigue M, Halliday I, Barclay G, Rowlands B. Conclusive evidence of endotoxemia in biliary obstruction. *Gut* 1998; 42:293-299
37. Court FG, Laws PE, Morrison CP, Teague BD, Metcalfe MS, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. Subtotal hepatectomy: A porcine model for the study of liver regeneration. *J Surg Res* 2004; 116:181-186
38. Da Silva J, Morishita T, Escalante B, Staudinger R, Drummond G, Golgorsky M, Lutton J, Abraham N. Dual role of heme oxygenase in epithelial cell injury: contrasting effects of short-term and long-term exposure to oxidant stress. *J Lab Clin Med* 1996; 128:290-296
39. Deitch EA, Bridges W, Baker J, Ma JW, Grisham MB, Granger DN, Specian RD, Berg R. Hemorrhagic shock-induced bacterial translocation is reduced by xanthine oxidase inhibition or inactivation. *Surgery* 1988; 104:191-198
40. Deitch EA, Sittig K, Berg R, Specian RD. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 1990; 159:79-84
41. Diamond T, Parks RW. Perioperative management of obstructive jaundice. *Br J Surg* 1997; 84:147-149
42. Dijkstra G, Blokzijl H, Bok L, Homan M, van Goor H, Faber KN, Jansen PLM, Moshage H. Opposite effect of oxidative stress on inducible nitric oxide synthase and haemoxygenase-1 expression in intestinal inflammation: anti-inflammatory effect of carbonmonoxide. *J Pathol* 2004; 204:296-303
43. Ding J, Andersson R, Soltesz V, Willén R, Bengmark S. The role of bile and bile acids in bacterial translocation in obstructive jaundice in rats. *Eur Surg Res* 1993; 25:11-19
44. Drummond GS, Kappas A. Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:6466-6470
45. Drummond GS, Galbraith RA, Sardana MK, Kappas A. Reduction of the C2 and C4 vinyl groups of Sn-protoporphyrin to form Sn-mesoporphyrin markedly enhances the ability of the metalloporphyrin to inhibit in vivo heme catabolism. *Arch Biochem Biophys* 1987; 255:64-74
46. Eipel C, Eisold M, Schütt H, Vollmar B. Inhibition of heme oxygenase-1 protects against tissue injury in carbon tetrachloride exposed livers. *J Surg Res* 2007; 139:113-120
47. Eisenstein R, Garcia-Mayol D, Pettingell W, Munro HN. Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:688-692
48. Emond JC, Capron-Laudereau M, Meriggi F, Bernuau J, Reynes M, Houssin D. Extent of hepatectomy in the rat: evaluation of basal condition and effect of therapy. *Eur Surg Res* 1989; 21:215-59
49. Eren S, Krein R, Hafemann B. Objective evaluation of the microcirculation in the skin with indocyanine green angiography (ICGA). A method for the clinic? *Handchir Plast Chir* 1995; 27:307-314
50. Fagrell B. Advances in microcirculation network evaluation: an update. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995; 15:34-40
51. Fagrell B, Intaglietta M. Microcirculation: its significance in clinical and molecular medicine. *J Intern Med* 1997; 241:349-362
52. Farombi EO, Surh Y. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39:479-491

53. Ferrero A, Viganò L, Polastri R, Muratore A, Eminefendic H, Regge D, Capussotti L. Postoperative liver function and future remnant liver: where is the limit? Results of a prospective study. *World J Surg* 2007; 31:1643-1651
54. Ferris C, Jaffrey S, Sawa A, Takahashi M, Brady S, Barrow R, Tysoe S, Wolosker H, Baranano D, Dore S, Poss K, Snyder S. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nat Cell Biol* 1999; 3:152-157
55. Fink MK, Kaups KL, Wang H, Rothschild HR. Maintenance of superior mesenteric arterial perfusion prevents increased intestinal permeability in endotoxic pigs. *Surgery* 1991; 110:154-161
56. Flower RW, Hochheimer BF. Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography. *Johns Hopkins Med J* 1976; 138:33-42
57. Fox IJ, Wood EH. Applications of dilution curves recorded from the right side of the heart or venous circulation with the aid of a new indicator dye. *Proc Mayo Clin* 1957; 32:541-549
58. Fox IJ, Wood EH. Circulatory system, methods, blood flow measurements by the dye dilution techniques. *Med Phys* 1960; 3:163-178
59. Friedman RL, Moon RJ. Role of Kupffer cells, complement, and specific antibody in the bactericidal activities of perfused liver. *Infect Immun* 1980; 29:152-157
60. Froh M, Conzelmann L, Walbrun P, Netter S, Wiest R, Wheeler M, Lehnert M, Uesugi T, Scholmerich J, Thurman R. Heme oxygenase-1 overexpression increases liver injury after bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol* 2007; 13:3478-3486
61. Gan HAT, Chen JDZ. Induction of heme oxygenase-1 improves impaired intestinal transit after burn injury. *Surgery* 2007; 141:385-393
62. Gaub J, Iverson J. 90% Partial hepatectomy in rats: a model of reversible liver insufficiency. *Hepatology* 1984; 4:902-904
63. Gelman SI. Disturbances in hepatic blood flow during anesthesia and surgery. *Arch Surg* 1976; 111:881-883
64. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg* 2008; 95:646-656
65. Geuken E, Buis C, Visser D, Blokzijl H, Moshage H, Balazs N, Leuvenink H, de Jong K, Peeters P, Slooff M, Porte RJ. Expression of heme oxygenase-1 in human livers before transplantation correlates with graft injury and function after transplantation. *Am J Transpl* 2005; 5:1875-1885
66. Giriş M, Erbil Y, Ötzeçan S, Olgaç V, Barbaros U, Deveci U, Kirgiz B, Uysal M, Toker GA. The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on radiation-induced intestinal damage: the effect of heme oxygenase-1 on radiation enteritis. *Am J Surg* 2006; 191:503-509
67. Glanemann M, Eipel C, Nussler AK, Vollmar B, Neuhaus P. Hyperperfusion Syndrome in Small-for-Size Livers. *Eur Surg Res* 2005; 37:335-341
68. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M. Distribution of Heme Oxygenase Isoforms in Rat Liver. *J Clin Invest* 1998; 101:604-612
69. Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995; 23:646-651
70. Goris RJ. MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J Surg* 1996; 20:418-421

71. Granger DN, Richardson PDI, Kvietys PR, Mortillaro NA. Intestinal blood flow. *Gastroenterology* 1980; 78:837-863
72. Green HA, Bua D, Anderson RR, Nishioka NS. Burn depth estimation using indocyanine green fluorescence. *Arch Dermatol* 1992; 128:43-49
73. Gush RJ, King TA, Jayson MI. Aspects of laser light scattering from skin tissue with application to laser doppler blood flow measurement. *Phys Med Biol* 1984; 29:1463-1476
74. Haga Y, Tempero M, Zetterman R. Unconjugated bilirubin inhibits in vitro major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of human lymphocytes. *Biochem Biophys Acta* 1996; 1316:29-34
75. Hajdena-Dawson M, Zhang W, Contrag P, Wong R, Vreman H, Stevenson D, Contrag C. Effects of metalloporphyrins on heme oxygenase-1 transcription: correlative cell culture assays guide in vivo imaging. *Mol Imaging* 2003; 2:138-149
76. Harris AG, Leiderer R, Peer F, Messmer K. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 40:H2388-H2398
77. Harris AG, Sinitsina I, Messmer K. Quantitative analysis of orthogonal polarization spectral images. Validation in the hamster dorsal skinfold chamber. *Prog Appl Microcirc Basel, Karger*. 2000; 24:21-31
78. Hartmann F, Owen R, Bissel DM. Characterization of isolated epithelial cell from rat small intestine. *Am J Physiol* 1982; 242:G147-G155
79. Herold G und Mitarbeiter. *Lehrbuch der Inneren Medizin*, Herold-Verlag 2005; 440-442
80. Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 1931; 12:186-202
81. Hillenkamp J, Saika P, Herrmann WA, Frame C, Gabel VP, Sachs HG. Surgical removal of idiopathic epiretinal membrane with or without the assistance of indocyanine green: a randomised controlled trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245:973-979
82. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996; 32:687-698
83. Hoer J, Toens C, Schachtrupp A, Anurov M, Titkova S, Oettinger A, Wetter O, Schumpelick V. Quantitative evaluation of abdominal wall perfusion after different types of laparotomy closure using laser-fluorescence videography. *Hernia* 2002; 6:11-16
84. Hoffmann U, Franzeck UK, Geiger M, Yanar A, Bollinger A. Variability of different patterns of skin oscillatory flux in healthy controls and patients with peripheral arterial occlusive disease. *Int J Microcirc Clin Exp* 1993; 12:255-73
85. Holman JM, Rikkers LF, Moody FG. Sepsis in the management of complicated biliary disorders. *Am J Surg* 1979; 138:809-813
86. Hsia FY, Allen SH, Gellis SS, Diamond LK. Erythroblastosis fetalis. VIII. Studies of serum bilirubin in relation to Kernicterus. *N Engl J Med* 1952; 247:668-671
87. Hyogo H, Tazuma S, Kajiyama G. Biliary excretory function is regulated by canalicular membrane fluidity associated with phospholipid fatty acyl chains in the bilayer: implications for the pathophysiology of cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15:887-894
88. Isaji S, Kawada Y. Analysis of 100 consecutive hepatectomies: risk factors in patients with liver cirrhosis or obstructive jaundice. *World J Surg* 2001; 25:266-273
89. Ischiropoulos H, Beers M, Ohnishi S, Fisher D, Garner S, Thom S. Nitric oxide production and perivascular nitration in brain after carbon monoxide poisoning in the rat. *J Clin Invest* 1996; 97:2260-2267

90. Ito Y, Bethea N, Baker G, McCuskey M, Urbaschek R, Mc Cuskey R. Hepatic microcirculatory dysfunction during cholestatic liver injury in rats. *Microcirculation* 2003; 10:421-432
91. Ito Y, Doelle SM, Clark JA, Halpern MD, McCuskey RS, Dvorak B. Intestinal microcirculatory dysfunction during the development of experimental necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res* 2007; 61:180-184.
92. Jarnagin WR, Gonen M, Fong Y, DeMatteo RP, Ben-Porat L, Little S, Corvera C, Weber S, Blumgart LH. Improvement in perioperative outcome after hepatic resection: analysis of 1,803 consecutive cases over the past decade. *Ann Surg* 2002; 236:397-406
93. Johansson K, Jakobsson A, Lindahl K, Lindhagen J, Lundgren O, Nilsson GE. Influence of fibre diameter and probe geometry on the measuring depth of laser Doppler flowmetry in the gastrointestinal application. *Int J Microcirc Clin Exp* 1991; 10:219-229
94. Johnstone JM, Lee EG. A quantitative assessment of the structural changes the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *Brit J Exp Pathol* 1976; 57:85-94
95. Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant* 2001; 1:121-128
96. Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002; 74:905-912
97. Keyse S, Tyrrell R. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 86:99-103
98. Kimmings AN, van Deventer SJH, Obertop H, Rauws EAJ, Huibregtse K, Gouma DJ. Endotoxin, cytokines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage. *Gut* 2000; 46:725-731
99. Kloek JJ, Marsman HA, van Vliet AK, Gouma DJ, van Gulik TM. Biliary drainage attenuates reperfusion injury in the cholestatic rat liver. *Surgery* 2008; 144:22-31
100. Knisely MH. Microscopic observations of the circulatory conditions in living frog liver lobules. *Anat Rec* 1939; 73:269-270
101. Koepfel TA, Trauner M, Baas JC, Thies JC, Schlosser SF, Post S, Gebhard MM, Herfarth C, Boyer JL, Otto G. Extrahepatic biliary obstruction impairs microvascular perfusion and increases leukocyte adhesion in rat liver. *Hepatology* 1997; 26:1085-1091
102. Koltai M, Pirotzky E, Braquet P. PAF-cytokine autocatalytic feed-back network in septic shock: involvement in acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9:69-72
103. Koziol JM, Rush BF, Smith SM, Machiedo GM. Occurrence of bacteremia during and after hemorrhagic shock. *J Trauma* 1988; 28:10-16
104. Krysztopik RJ, Bentley FR, Spain DA, Wilson MA, Garrison RN. Lazaroid improves intestinal blood flow in the rat during hyperdynamic bacteraemia. *Br J Surg* 1997; 84:1717-1721
105. Kviety P, McLendon J, Granger D. Postprandial intestinal hyperemia: role of bile salts in the ileum. *Am J Physiol* 1981; 241:G469-G477
106. Kyokane T, Norimizu S, Tani H, Yamaguchi T, Takeoka S, Tsuchida E, Naito M, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M. Carbon monoxide from heme catabolism protects against hepatobiliary dysfunction in endotoxin-treated liver. *Gastroenterology* 2001; 120:1227-1240

- 107.Lai O, Chow P, Tan S, Song I, Soo K, Eng Aw S, Yu WK, Fook-Chong SM, Satchithanatham S, Chan ST. Changes in prostaglandin and nitric oxide levels in the hyperdynamic circulation following liver resection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15:895-901
- 108.Leeuwen van PAM, Hong RW, Rounds JD, Rodrick ML, Wilmore D. Hepatic failure and coma after liver resection is reversed by manipulation of gut contents: the role of endotoxin. *Surgery* 1991; 110:169-175
- 109.Leevy CM, Stein SW, Cherrick GR, Davidson CS. Indocyanine green clearance: a test of liver excretory function. *Clin Res* 1959; 7:290-294
- 110.Lehmann Christian. Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin 2000; Kap.6:24-26
- 111.Lindert J, Werner J, Redlin M, Kuppe H, Habazettl H., Pries AR. OPSImaging of human microcirculation: a short technical report. *J Vasc Res* 2002; 39:368-372
- 112.Longnecker DE, Seyde WC. Anesthetic regimes: advantages and disadvantages in microcirculatory technology (Eds. Baker CH, Nastuk WL). Academic Press, Orlando 1986; 343-365
- 113.Lundgren O, Haglund U. The pathophysiology of the intestinal countercurrent exchanger. *Life Sci* 1978; 23:1411-1422
- 114.Luo D, Vincent SR. Metalloporphyrins inhibit nitric oxide-dependent cGMP formation in vivo. *Eur J Pharmacol* 1994; 267:263-267
- 115.Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* 1986; 261:411-419
- 116.Maines MD. Heme oxygenase: clinical applications and functions. CRC Press, Boca Raton, FL 1992
- 117.Maines MD, Gibbs P. 30 some years of heme oxygenase: from a „molecular wrecking ball“ to a „mesmerizing“ trigger of cellular events. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:568-577
- 118.Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg* 2005; 92:1169-1176
- 119.Mallick IH, Winslet MC, Seifalian AM. Pyrrolidine dithiocarbamate protects the small bowel from warm ischemia/reperfusion injury of the intestine: the role of heme oxygenase. *Clinical Science* 2006; 111:373-380
- 120.Man K, Lo CM, Oi-Lin Ng I, Wong YC, Qin LF, Fan SH, Wong J. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts. *Arch Surg* 2001; 136:280-285
- 121.Man K, Lo CM, Lee TKW, Li XL, Oi-Lin Ng I, Fan ST. Intra-graft gene expression profiles by cDNA microarray in small-for-size liver grafts. *Liver Transpl* 2003; 9:425-432
- 122.Mantovani A, Sozzani S, Introna M. Endothelial activation by cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 832:93-116
- 123.Margaritis V, Filos K, Michalaki M, Scopa C, Spiliopoulou I, Nikolopoulou V, Vagianos C. Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg* 2005; 29:1329-1334
- 124.Marks GS. Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins. *Cell Mol Biol* 1991; 40:863-870

125. Martins PN, Kessler H, Jurisch A, Reutzel-Selke A, Kramer J, Pascher A, Pratschke J, Neuhaus P, Volk HD, Tullius SG. Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity. *Transplant Proc* 2005; 37:384-386
126. Mathura KR, Ince C. First clinical use of orthogonal polarization spectral imaging. *Prog Appl Microcirc* 2000; 24:94-101
127. McCoubrey W, Huang T, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247:725-732
128. Meakins JL, Marshall JC. The gastrointestinal tract: the "motor" of MOF. *Arch Surg* 1986; 211:197-201
129. Menger MD, Marzi I, Messmer K. *In vivo* fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991; 23:158-169
130. Miller DE, Gleason WL, McIntosh HD. A comparison of the cardiac output determination by the direct Fick method and the dye-dilution method using indocyanine green and cuvette densitometer. *J Lab Clin Med* 1962; 59:345-350
131. Mori H, Shinohara H, Arakawa Y, Kanemura H, Ikemoto T, Imura S, Morine Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Shimada M. Beneficial effects of hyperbaric oxygen pretreatment on massive hepatectomy model in rats. *Transplantation* 2007; 84:1656-1661
132. Morioka I, Wong RJ, Abate A, Vreman HJ, Contag CH, Stevenson DK. Systemic effects of orally-administered zinc and tin (IV) metalloporphyrins on heme oxygenase expression in mice. *Pediatr Res* 2006; 59:667-672
133. Morsiani E, Aleotti A, Ricci D. Hemodynamic and ultrastructural observations on the rat liver after two-thirds partial hepatectomy. *J Anat* 1998; 192:507-515
134. Mothes H, Dönicke T, Friedel R, Simon M, Markgraf E, Bach O. Indocyanine-green fluorescence video angiography used clinically to evaluate tissue perfusion in microsurgery. *J Trauma* 2004; 57:1018-1024
135. Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Neto JS, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Nalesnik MA, Otterbein LE, Murase N. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol* 2003; 163:1587-1589
136. Norioka J, Nishi M, Ogata Y, Kuwahara T, Nakayama H, Tashiro S, Ohnishi Y. Promotion of bacterial translocation by major liver resection in obstructive jaundice in rats colonised predominantly with indigenous *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 2002; 51:687-694
137. Otani K, Shimizu S, Chijiwqa K, Morisaki T, Yamaguchi T, Yamaguchi K, Kuroki S, Tanaka M. Administration of bacterial lipopolysaccharide to rats induces heme oxygenase-1 and formation of antioxidant bilirubin in the intestinal mucosa. *Dig Dis Sci* 2000; 45:2313-2319
138. Otterbein LE, Choi AMK. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279:L1029-L1037
139. Pain JA, Bailey ME. Measurement of operative plasma endotoxin levels in jaundiced and non-jaundiced patients. *Eur Surg Res* 1987; 19:207-216
140. Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997; 121:142-149
141. Pannen B, Kohler N, Hole B, Bauer M, Clemens MG, Geiger KK. Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *J Clin Invest* 1998; 102:1220-1228
142. Parks R, Cameron C, Gannon C, Pope C, Diamond T, Rowlands B. Changes in gastrointestinal morphology associated with obstructive jaundice. *J Pathol* 2000; 192:526-532

143. Petrace I, Otterbein L, Alam J, Wiegand G, Choi A. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278:L312-L319
144. Pittet D, Rangel-Frausto S, Li N, Tarara D, Costigan M, Rempe L, Jebson P, Wenzel RP. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med* 1995; 21:302-309
145. Pons L, Droy-Lefaix M, Braquet P, Bueno L. Role of free radicals and platelet-activating factor in the genesis of intestinal motor disturbances induced by *Escherichia coli* endotoxins in rats. *Gastroenterology* 1991; 100:946-953
146. Popper H. Cholestasis: the future of a past and present riddle. *Hepatology* 1981; 1:187-191
147. Rappaport AM. The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec* 1958; 130:673-689
148. Rappaport AM. Microcirculatory units in the mammalian liver. Their arterial and portal components. *Bibl Anat* 1977; 16:116-120
149. Redaelli CA, Tian YH, Schaffner T, Ledermann M, Baer HU, Dufour JF. Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1. *Hepatology* 2002; 35:1082-1092
150. Revelly JP, Ayuse T, Brienza N, Fessler HE, Robotham JL. Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. *Crit Care Med* 1996; 24:1345-1351
151. Reynolds JV, Murchan P, Redmond HP, Watson RW, Leonhard N, Hill A, Clarke P, Marks P, Keane FBV, Tanner WA. Failure of macrophage activation in experimental obstructive jaundice: association with bacterial translocation. *Br J Surg* 1995; 82:534-538
152. Richter S. Die „hepatic arterial buffer response“ (HABR) bei Leberzirrhose, Pneumoperitoneum und Leberresektion. Makrohämodynamische und mikrovaskuläre Untersuchungen der Leberdurchblutung unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Habilitationsschrift, Homburg, Universität des Saarlandes 2008.
153. Rodgers PA, Seidman DS, Wei PL, Dennery PA, Stevenson DK. Duration of action and tissue distribution of zinc protoporphyrin in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996; 39:1041-1049
154. Rodriguez Sanz MB, Alarcón Garcia J, del Riego Tomás FJ, Vaquero Puerta C. Effects of partial hepatectomy on the distal ileum in rats. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96:185-190
155. Ronholm E, Bäckman L, Friman S, Karlsten KL, Mjörnstedt L, Olausson M, Aneman A. Endoluminal laser-doppler measurements of jejunal perfusion in patients undergoing liver transplantation. *Transpl Int* 2001; 14:24-30
156. Rubben A, Eren S, Krein R, Younossi H, Bohler U, Wienert V. Infrared videoangiofluorography of the skin with indocyanine green – Rat random cutaneous flap model and results in man. *Microvasc Res* 1994; 47:240-251
157. Ruh J, Ryschich E, Secchi A, Gebhard MM, Glaser F, Klar E, Herfarth C. Measurement of blood flow in the main arteriole of the villi in rat small intestine with FITC-labeled erythrocytes. *Microvasc Research* 1998; 56:62-69
158. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF, Saitoh N, Hiraoka T, Uchino R, Miyauchi Y. Endotoxemia and intestinal mucosal dysfunction after the relief of obstructive jaundice by internal and external drainage in rats. *Eur Surg Res* 1995; 27:11-18
159. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leucocytes. *J Histochem Cytochem* 1997; 45:505-513

- 160.Sammut I, Foresti R, Clark J, Exon D, Vesely M, Sarathchandra P, Green C, Motterlini R. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of heme oxygenase-1. *Br J Pharmacol* 1998; 125:1437-1444
- 161.Sano T, Shiomi M, Wakabayashi Y, Shinoda Y, Goda N, Yamaguchi T, Nimura Y, Ishimura Y, Suematsu M. Endogenous carbon monoxide suppression stimulates bile acid-dependent biliary transport in perfused rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1997; 272:G1268-G1275
- 162.Sato Y, Koyama S, Tsukada K, Hatakeyama K. Acute portal hypertension reflecting shear stress as a trigger of liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Today* 1997; 27:518-526
- 163.Sato K, Balla J, Otterbein L, Smith RN, Brouard S, Lin Y, Csizmadia E, Seigny J, Robson SC, Vercellotti G, Choi AM, Bach FH, Soares MP. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J Immunol* 2001; 166:4185-4194
- 164.Sawyer RT, Moon RJ, Beneke ES. Hepatic clearance of *Candida albicans* in rats. *Infect Immun* 1976; 14:1348-1365
- 165.Scheingraber S, Richter S, Igna D, Flesch S, Girndt M, Kleinschmidt S, Schilling MK. Indocyanine green elimination but not bilirubin decrease indicates improvement of graft function during MARS therapy. *Clin Transplant* 2007; 21:689-695
- 166.Scheingraber S, Richter S, Igna D, Flesch S, Schilling MK. Indocyanine green disappearance rate is the most useful marker for liver resection. *Hepatogastroenterol* 2008; 55:1394-1399
- 167.Scheingraber S, Bauer M, Bauer I, Bardens I, Abel K, Horn AK, Schilling MK, Wolff M. Inhibition of hemoxygenase-1 improves survival after liver resection in jaundiced rats. *Eur Surg Res* 2009; 42:157-167
- 168.Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Böhler H, Bach A, Martin E. Effect of low-dose dopamine on intestinal villus microcirculation during normotensive endotoxemia in rats. *Br J Anaesth* 1996; 76:707-712
- 169.Secchi A, Wellmann R, Martin E, Schmidt H. Dobutamine maintains intestinal villus blood flow during normotensive endotoxemia: an intravital microscopic study in the rat. *J Crit Care* 1997; 12:137-141
- 170.Seyde WC, McGowan L, Lund N, Duling B, Longnecker DE. Effects of anaesthetics on regional hemodynamics in normovolemic and hemorrhaged rats. *Am J Physiol* 1985; 249:H164-H173
- 171.Shinoda Y, Suematsu M, Wakabayashi Y, Suzuki T, Goda N, Yamaguchi T, Saito S, Ishimura Y. Carbon monoxide as a regulator of bile canalicular contractility in cultured rat hepatocytes. *Hepatology* 1998; 28:286-295
- 172.Silbernagl S, Lang F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Thieme Verlag, Stuttgart, 1998; 168-169
- 173.Silieri P, Morini S, Sica G, Schena S, Rastellini C, Gaspari AL, Benedetti E, Cicalese L. Bacterial translocation and intestinal morphological findings in jaundiced rats. *Digest Dis Sci* 2002; 47:929-934
- 174.Slocum M, Sittig K, Specian R, Deitch E. Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. *Am Surg* 1992; 58:305-310
- 175.Spapen H. Liver perfusion in sepsis, septic shock and multiorgan failure. *Anat Rec* 2008; 291:714-720
- 176.Steffen EK, Berg RD. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect Immun* 1983; 39:1252-1259
- 177.Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:290-298

178. Still J, Law E, Dawson J, Bracci S, Island T, Holtz J. Evaluation of the circulation of reconstructive flaps using laser-induced fluorescence of indocyanine green. *Ann Plast Surg* 1999; 42:266-274
179. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235:1043-1046
180. Suematsu M, Goda N, Sano T, Kashiwagi S, Egawa T, Shinoda Y, Ishimura Y. Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest* 1995; 96:2431-2437
181. Suematsu M, Wakabayashi Y, Ishimura Y. Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc Res* 1996; 32:679-686
182. Sun Y, Rotenberg MO, Maines MD. Developmental expression of heme oxygenase isozymes in rat brain. Two HO-2 mRNAs are detected. *J Biol Chem* 1990; 265:8212-8217
183. Suttner D, Dennery P. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *FASEB J* 1999; 13:1800-1809
184. Swain MG, Tjandra K, Kanwar S, Kubes P. Neutrophil adhesion is impaired in a rat model of cholestasis. *Gastroenterology* 1995; 109:923-932
185. Symeonidis A, Trams EG. Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct. *Am J Pathol* 1957; 33:13-27
186. Tenhunen R, Marver H, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61:748-755
187. Tenhunen R, Marver H, Schmid R. Microsomal heme oxygenase – Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969; 244:6388-6394
188. Tenhunen R, Marver H, Pimstone N, Trager W, Cooper D, Schmid R. Enzymatic degradation of heme. oxygenative cleavage requiring cytochrome P-450. *Biochemistry* 1972; 11:1716-1720
189. Toens C, Kronen CJ, Blum U, Fernandez V, Grommes J, Hoelzl F, Stumpf M, Klinge U, Schumpelick V. Validation of IC-View fluorescence videography in a rabbit model of mesenteric ischaemia and reperfusion. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21:332-338
190. Tooke JE. Microvasculature in diabetes. *Cardiovasc Res* 1996; 32:764-771
191. Tooke JE, Morris SJ, Shore AC. Microvascular functional abnormalities in diabetes: the role of the endothelium. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 31:S127-S132
192. Toyota N, Miayi K, Hardison WG. Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on the permeability of hepatocellular tight junction. *Lab Invest* 1984; 50:536-542
193. Tracy TF, Bailey PV, Goerke ME, Sotelo-Avila C, Weber TR. Cholestasis without cirrhosis alters regulatory liver gene expression and inhibits hepatic regeneration. *Surgery* 1991; 110:176-183
194. Trakshel GM, Kutty RK, Maines MD. Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The non inducible isoform. *J Biol Chem* 1986; 261:11131-11137
195. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *Mech Dis* 1998; 339:1217-1227
196. Tsui T, Lau C, Ma J, Glockzin G, Obend A, Schlitt H, Fan S. Adeno-associated virus mediated heme oxygenase-1 gene transfer suppresses the progression of micronodular cirrhosis in rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12:2016-2023
197. Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R, Reutzel-Selke A, Martins PN, Pratschke J, Bachmann U, Lehmann M, Southard D, Iyer S, Schmidbauer G, Sawitzki B, Reinke P, Neuhaus P, Volk HD. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. *Transplant* 2002; 74:591-598

198. Vedernikov YP, Graser T, Vanin AF. Similar endothelium-independent arterial relaxation by carbon monoxide and nitric oxide. *Biomed Biochim Acta* 1989; 48:601-603
199. Vollmar B, Glasz J, Senkel A, Menger MD, Messmer K. Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir* 1993; 118:691-696
200. Voss Herrlinger. Taschenbuch der Anatomie. Band 2. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1988
201. Vreman HJ, Lee OK, Stevenson DK. In vitro and in vivo characteristics of a heme oxygenase inhibitor: ZnBG. *Am J Med Sci* 1991; 302:335-341
202. Vreman HJ, Ekstrand BC, Stevenson DK. Selection of metalloporphyrin heme oxygenase inhibitors based on potency and photoreactivity. *Pediatr Res* 1993; 33:195-200
203. Wang XD, Andersson R, Soltész, Bengmark S. Bacterial translocation after major hepatectomy in patients and rats. *Arch Surg* 1992; 127:1101-1106
204. Wang XD, Andersson R, Soltész V, Guo W, Bengmark S. Watersoluble ethylhydroxyethyl cellulose prevents bacterial translocation induced by major liver resection in the rat. *Ann Surg* 1993; 217:155-167
205. Wang XD, Ar Rajab A, Andersson R, Soltész V, Wang W, Svensson M, Bengmark S. The influence of surgically induced acute liver failure on the intestine in the rat. *Scand J Gastroenterology* 1993; 28:31-40
206. Wang XD, Soltész V, Anderson R, Bengmark S. Bacterial translocation in acute liver failure induced by 90 per cent hepatectomy in the rat. *Br J Surg* 1993; 80:66-71
207. Wang XD, Pärsson H, Andersson R, Soltész V, Johansson K, Bengmark S. Bacterial translocation, intestinal ultrastructure and cell membrane permeability early after liver resection in the rat. *Br J Surg* 1994; 81:579-584
208. Wang XD, Pärsson H, Soltész V, Johansson K, Andersson R. Bacterial translocation and intestinal capillary permeability following major liver resection in the rat. *J Surg Res* 1995; 58:351-358
209. Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN, Cho CH. Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G586-G594
210. Warner A, Bencosme A, Healy D, Verme C. Prognostic role of antioxidant enzymes in sepsis: preliminary assessment. *Clin Chem* 1995; 41:867-871
211. Wasserberg N, Pileggi A, Salgar SK, Ruiz P, Ricordi C, Inveradi L, Tsakis AK. Hemeoxygenase-1 upregulation protects against intestinal ischemia/reperfusion injury: a laboratory based study. *Int J Surg* 2007; 5:216-224
212. Weixiong J, Aneman A, Nilsson U, Lundgren O. Quantification of tissue damage in the feline small intestine during ischemia-reperfusion: the importance of free radicals. *Acta Physiol Scand* 1994; 150:241-250
213. Welsh FKS, Ramsden CW, MacLennan K, Sheridan MB, Barclay GR, Guillou PJ, Reynolds JV. Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. *Ann Surg* 1998; 227:205-212
214. Wilkinson SP, Moodie H, Stamatakis JD, Kakkar VV, Williams R. Endotoxaemia and renal failure in cirrhosis and obstructive jaundice. *Br Med J* 1976; 2:1415-1418
215. Wille KH, Schnorr B. Über das Vorkommen hämodynamisch wirksamer Elemente im intestinalen Blutgefäßsystem. *Anat Histol Embryol* 2003; 32:94-97

216. Wunder C, Brock RW, McCarter SD, Bihari A, Harris K, Eichelbröner O, Potter RF. Inhibition of haem oxygenase activity increases leucocyte accumulation in the liver following limb ischaemia-reperfusion in mice. *J Physiol* 2002; 540:1013-1021
217. Wunder C, Potter RF. The heme oxygenase system: its role in liver inflammation. *Curr Drug Targ* 2003; 3:199-208
218. Xu D, Lu Q, Guillory D, Cruz N, Berg R, Deitch EA. Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis. *J Trauma* 1993; 34:676-683
219. Yang ZF, Tsui TY, HO DW, Tang TC, Fan ST. Heme oxygenase-1 potentiates the survival of small for size liver graft. *Liver Transplant* 2004; 10:784-793
220. Yoshida T, Kikuchi G. Features of the reaction of heme degradation catalyzed by the reconstituted microsomal heme oxygenase system. *J Biol Chem* 1978; 253:4230-4236
221. Zhang J, Piantadosi CA. Mitochondrial oxidative stress after carbon monoxide hypoxia in the rat brain. *J Clin Invest* 1992; 90:1193-1199
222. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004; 351:1645-1654

## 10 DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger, der mir stets bei der Umsetzung der Arbeit mit hilfreichen Diskussionen und konstruktiver Kritik zur Seite stand. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für die Korrektur des Manuskriptes sowie für die zur Verfügungstellung der Räumlichkeiten und Geräte.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. med. Stefan Scheingraber für die hervorragende Betreuung, die wertvollen Anregungen, sowie die tatkräftige Unterstützung bei der Planung und Auswertung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. Sven Messner, der mich in die Intravitalmikroskopie eingeführt hat und mir bei der Versuchsdurchführung geholfen hat. Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktoranden Kathrin Abel und David Bardens für das tolle Teamwork, die gegenseitige Hilfe und die gute Atmosphäre.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie. Insbesondere Frau Elisabeth Gluding möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung danken. Frau Janine Becker danke ich für die ausgezeichnete Aufarbeitung der Immunhistochemie und der histologischen Schnitte.

Mein Dank gilt auch meinem Lebensgefährten Paul Rabura, der mich tatkräftig bei den Abbildungen unterstützt hat und zu jeder Zeit ein liebevoller Begleiter und Freund war.

Zum Schluß möchte ich meiner Familie danken, da sie mich immer wieder motiviert hat und ich mich auf sie in jeder Lebenslage verlassen kann.

## 11 PUBLIKATIONEN

- 05/2006      123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie  
*„Hämoxxygenase-1 Blockade führt zu massiver Inhomogenität der regionalen intestinalen Perfusion nach Gallengangsligatur“*  
Scheingraber S, Messner S, Goger S, Matt S, Abel K, Schilling MK, Menger MD  
Chirurgisches Forum 2006, Band 35, 309-311
- 09/2006      61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten  
*„Der Bilirubinanstieg bei Verschlussikterus ist teilweise bedingt durch eine stressinduzierte Induktion der HO-1“*  
Scheingraber S, Menger MD, Messner S, Abel K, Goger S, Schilling MK
- 05/2007      124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie  
*„Hämoxxygenase-1 führt zu endogener Bilirubinproduktion und trägt zur Manifestation des Leberschadens bei.“*  
Abel K, Scheingraber S, Matt S, Messer S, Goger S, Schilling MK, Menger MD  
Chirurgisches Forum 2007, Band 36, 213-214
- „Vergleich dreier Metalloporphyrine bezüglich ihrer hämodynamischen Auswirkungen und Inhibition der Hämoxxygenase-Aktivität“*  
Messner S, Scheingraber S, Matt S, Abel K, Goger S, Schilling MK, Menger MD  
Chirurgisches Forum 2007, Band 36, 233-234
- 05/2009      *“Metalloporphyrins, used for HO-1 inhibition, themselves affect hepatic microcirculation, liver function, and hepatocellular integrity.”*  
Scheingraber S, Messner S, Matt S, Abel K, Goger S, Kötner K, Schilling MK, Menger MD  
Microcirculation 2009; 16:355-363

## 12 CURRICULUM VITAE

### PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

---

Simone Natalie Goger, geboren am 25.12.1978 in Freudenstadt, ledig

### STUDIUM

---

2001-2008 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes,  
Staatsexamen im Mai/Juni 2008

### PRAKTISCHES JAHR

---

1. Terial Chirurgie: (26.02.2007-17.06.2007) am Uniklinikum Homburg
2. Terial Anästhesiologie: (18.06.2007-07.10.2007) in Durban (Südafrika)
3. Terial Innere Medizin: (08.10.2007-27.01.2008) am Uniklinikum Homburg

### BERUFSTÄTIGKEIT

---

seit 2009	Assistenzärztin der Anästhesiologie (Isar Kliniken München)
2001-2007	während den Semesterferien Arzthelferin in der Allgemeinarztpraxis Dr. León-Goger

### BERUFSAUSBILDUNG

---

1996-1999	Berufsausbildung zur Arzthelferin
-----------	-----------------------------------

### AUSBILDUNG UND SCHULE

---

1999-2001	Abitur an der Berufsoberschule Memmingen
1995-1996	Allgäu-Gymnasium Kempten
1991-1995	Mittlere Reife an der Maria-Ward Realschule Kempten
1985-1991	Grund- und Teilhauptschule Wiggensbach/Allgäu