

Aus der Klinik für Experimentelle Chirurgie

Universitätsklinikum des Saarlandes Homburg/Saar

Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Michael D. Menger

**Einfluss der arteriellen Leberischämie auf die Morphologie der
Gallengänge in einem Modell zur intrahepatic ischemic-type
biliary lesion an der Ratte**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2014

vorgelegt von Ulrich Keppler

geboren am 12. April 1986 in Stuttgart

Tag der Promotion:

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Erstkorrektor: Priv.-Doz. Dr. med. Mohammed R. Moussavian

Zweitkorrektor:

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
1.1 Deutsche Fassung	1
1.2 Abstract.....	3
2 Einleitung	4
2.1 Lebertransplantation.....	4
2.1.1 Geschichte der Lebertransplantation	4
2.1.2 Operationszahlen	5
2.1.3 Indikationen und Kontraindikationen	5
2.1.4 Entscheidungskriterien zur Transplantation	6
2.2 Komplikationen nach Lebertransplantation.....	7
2.2.1 Allgemeine Komplikationen.....	7
2.2.2 Gallengangskomplikationen.....	8
2.2.3 Ischemic-type biliary lesions	8
2.3 Grundlagen der Anatomie und Gefäßversorgung der Leber	12
2.3.1 Mikrozirkulation der Leber: Einteilung nach Rappaport	12
2.3.2 Die Besonderheiten der Blutversorgung der Gallengänge	13
2.4 Überblick über die Literatur	14
3 Ziel der Studie	17
4 Material und Methoden	18
4.1 Versuchstiere	18
4.2 Modell	18
4.2.1 Anästhesie und Chirurgische Präparation.....	18
4.2.2 Probenentnahme	22
4.3 Untersuchungsmethoden	25
4.3.1 Western Blot.....	25
4.3.2 Histologische Analyse – Standardfärbung	27

4.3.3	Histologische Analyse - Immunhistologie.....	30
4.3.4	Serologische Parameter	32
4.3.5	Elektronenmikroskopie	32
4.3.6	Magnet- Resonanz-Tomographie	33
4.4	Versuchsprotokoll.....	34
4.4.1	Aufteilung der Tiere	34
4.4.2	Versuchsablauf.....	35
4.5	Datenerfassung und Statistik.....	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Ergebnisteil A – 3h I/R.....	37
5.1.1	Western Blot VEGF und Caspase 3.....	37
5.1.2	Standartfärbungen.....	38
5.1.3	PCNA	41
5.1.4	Serologische Parameter	43
5.1.5	Elektronenmikroskopie	44
5.1.6	MRT Untersuchungen.....	44
5.2	Ergebnisteil B – HA Ligatur.....	47
5.2.1	Western Blot VEGF und Caspase 3.....	47
5.2.2	Standartfärbungen.....	48
5.2.3	PCNA	53
5.2.4	Serologische Parameter und Gallefluss.....	55
5.3	Ergebnisteil C - Vergleich 3h I/R und HA-Ligatur	56
5.3.1	Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl	56
5.3.2	CAE.....	57
5.3.3	Immunhistochemie im Vergleich	58
5.3.4	Serologische Parameter im Vergleich.....	59
6	Diskussion.....	60
6.1	Diskussion des Modells.....	60

6.2	Diskussion der Ergebnisse	64
6.2.1	Diskussion Ergebnissteil A.....	64
6.2.2	Diskussion Ergebnissteil B.....	68
6.2.3	Diskussion Ergebnissteil C	71
6.3	Schlussfolgerung.....	72
7	Anhang	74
7.1	Abkürzungsverzeichnis	74
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	77
7.3	Tabellenverzeichnis.....	79
8	Literaturverzeichnis	80
9	Publikation und Dank	91
9.1	Publikation	91
9.2	Danksagung.....	92

1 Zusammenfassung

1.1 Deutsche Fassung

Hintergrund: Ischemic-type biliary lesions (ITBL) können als schwerwiegende Komplikation nach Lebertransplantation auftreten und zum Organversagen und damit zur Retransplantation führen. Risikofaktoren wie z.B. verlängerte kalte Ischämiezeit oder ABO Inkompatibilität sind bekannt, jedoch sind die auslösenden Faktoren noch unklar. In der Literatur sind nur wenige Modelle zur Gallengangsischämie beschrieben und im Speziellen gibt es nur ein Modell zur ITBL. Die Ursachen sind unerforscht und es gibt keine Untersuchungen zu histologischen oder morphologischen Veränderungen, welche im Rahmen von ischämischen Strikturen auftreten könnten. Wir untersuchten die Auswirkungen eines dreistündigen Abklemmens der Arteria hepatica communis, mit kombiniertem Stenting und Ligatur des peribiliären Plexus (PBP) und nachfolgender warmer Reperfusion auf die Gallengangsepithelien (3h I/R) an der Ratte. Als Vergleich diente eine Sham Gruppe (Sham) und eine Gruppe in welcher die Arteria hepatica communis über den kompletten Untersuchungszeitraum ligiert blieb (HAL).

Material und Methoden: Zur 3h I/R wurde die Arteria hepatica communis mittels Gefäßclip abgeklemmt, der Ductus hepaticus communis über eine Querinzision gestentet und der PBP doppelt ligiert. In einer weiteren Untersuchungsgruppe wurde auf Klemmung und Reperfusion verzichtet und die Leberarterie für den gesamten Untersuchungszeitraum ligiert und der PBP mittels Stenting verschlossen. Zur Kontrolle wurde in einer Sham Gruppe lediglich eine Stentimplantation des Gallengangs mit Ligatur des PBP vorgenommen. Serumparameter der Aspartat-Aminotransferase (GOT), Alanin-Aminotransferase (GPT), von direktem und totalem Bilirubin (DB/TB), der Gamma-Glutamyl- Transferase (γ -GT) und Laktatdehydrogenase (LDH) wurden gemessen. Gallenfluss- und Gallengangparameter wurden bestimmt und die Anzahl der Blutgefäße untersucht. Zudem wurden immunhistologische Untersuchungen zur Leukozyteninfiltration (CAE) und Zellproliferation (PCNA) angefertigt. In Hämatoxylin - Eosin Färbungen (HE) wurde die Vakuolisierung bestimmt und Western Blots von Caspase 3 und „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) dienten dem Nachweis von Zelltod und Gefäßwachstum. Außerdem wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Gallengangsepithelien und MRT Untersuchungen angefertigt um eventuelle Strikturen

nachzuweisen. Alle Parameter wurden an Tag 3, 7, 14 und 30 bestimmt.

Ergebnisse: Sowohl dreistündige Ischämie mit folgender Reperfusion als auch die dauerhafte Ligatur der Leberarterie führen zu Gallengangsproliferation. Im Rahmen der 3h I/R findet diese bereits am Tag sieben nach Ischämie statt und wird von einem Leberzellschaden begleitet, welcher durch Anstieg der GOT und GPT sowie andauernde Leukozyteninfiltration und passager verstärkte Apoptose gekennzeichnet ist. Auch die Ligatur der Leberarterie führt zu einem Proliferationsreiz, welcher sein Maximum jedoch erst an Tag 14 erreicht und über die komplette Leber verteilt ist. Die Entzündungsprozesse, angezeigt durch CAE positive Zellen sind hierbei weniger stark ausgeprägt. In beiden Gruppen führen diese Prozesse zu einer Neubildung von Gallengängen und einer Reduktion des Gallengang/Arterien- Verhältnisses 30 Tage nach Operation.

Fazit: Wir konnten erstmals zeigen, dass eine isolierte und passagere Ischämie der Gallengänge zu dauerhaften Veränderungen der Leberarchitektur durch Vermehrung der Gallengangsanzahl führt. Auf Grund des fehlenden Nachweises von intrahepatischen Strikturen muss davon ausgegangen werden, dass ein Modell der isolierten Gallengangsischämie eine ischemic-type biliary lesion nicht vollständig simulieren kann.

1.2 Abstract

Background: Ischemic-type biliary lesions (ITBL) is one of the most troublesome cause for liver retransplantation. There are only few models described in literature and particularly little data about morphological alterations. We studied the effects of 3 hours hepatic artery ischemia-reperfusion (3h I/R) and combined clamping of the peribiliary plexus (PBP) on bile duct epithelia. Additionally a hepatic artery ligation group (HAL) showed the effects of total arterial deprivation.

Material and methods: 3h I/R was performed by clipping of hepatic artery with micro vascular clips for 3 hours and stenting of the common bile duct with double ligation of PBP. In HAL a ligature instead of vascular clamping was done. A Sham group with no microvascular clamping served as control. Serum blood activities of aspartate aminotransferase (AST = GOT), alanine aminotransferase (ALT = GPT), direct and total bilirubin (DB/TB), lactate dehydrogenase (LDH) and gamma-glutamyl- transferase (γ -GT) were measured. Bile flow and bile duct parameters were analyzed and histological examinations of leukocyte infiltration (CAE) and cell proliferation (PCNA) were performed. Additionally western blots of vascular endothelial growth factor (VEGF) and Caspase 3 were made to investigate vascular growth expression and apoptotic cell death. Electron microscopy and MR imaging served as proof for intrahepatic strictures. All parameters were evaluated on day 3, 7, 14 and 30.

Results: 3h I/R lead to bile duct proliferation on day 7 which was associated with hepatocellular injury shown through increased GOT and GPT with leukocyte infiltration and apoptotic cell death. Those processes lead to increased bile duct amount and reduction of arteries/ bile duct ratio 30 days after operation. HAL lead to bile duct proliferation as well. In this group less inflammation could be observed and proliferation occurred within all zones of the liver.

Conclusion: In a model of 3h I/R permanent morphological alterations could be demonstrated. Because of lack of intrahepatic biliary strictures we were not able to completely establish a model of ITBL in the rat.

2 Einleitung

2.1 Lebertransplantation

Die Lebertransplantation stellt momentan die einzige kurative Therapie bei Patienten im Endstadium von Lebererkrankungen (end stage liver disease = ESLD) oder akutem Leberversagen dar. In den USA sind davon jährlich ca. 40.000 (ESDL) bzw. 2.000 (akutes Leberversagen) Patienten betroffen (Alqahtani 2012). Ein großes Problem stellt die Knappheit der Spenderorgane dar.

2.1.1 Geschichte der Lebertransplantation

Die erste Lebertransplantation am Menschen wurde im Jahre 1963 von Dr. Thomas Starzl (Starzl et al. 1963; Starzl et al. 1968) in Pittsburgh, Pennsylvania, USA durchgeführt. In den folgenden Jahren konnte bereits von Langzeitüberlebenden berichtet werden (Starzl et al. 1974). Die Einjahres-Überlebensrate lag dabei im Jahr 1970 bei 30%. In den folgenden Jahren konnte die Überlebensrate durch Verbesserung der immunsuppressiven Therapie (Einführung von Cyclosporin in den 80er Jahren), von Konservierungslösungen, von Operationstechniken und der Verbesserung des Komplikationsmanagements gesteigert werden, sodass die Lebertransplantation im Jahre 1983 vom „National Institute of Health“ der Vereinigten Staaten als nicht experimentelle Therapie anerkannt wurde.

In Europa erfolgte die erste Lebertransplantation im Jahre 1968, durch Sir Roy Calne in Cambridge (Calne 1986), in Deutschland im Jahre 1969 an dem Universitätsklinikum Bonn durch Alfred Gütgemann (Gütgemann 1969).

Inzwischen stehen neben der orthotopen Lebertransplantation (OLT) auch weitere Möglichkeiten, wie die Transplantation von Organen von „non-heart-beating-donors“, Split-Leber-Transplantationen und die Lebendspende (Raia et al. 1989) zur Verfügung.

2.1.2 Operationszahlen

Zurzeit werden in den USA 5.000-6.000 Lebertransplantationen (OLT) mit Überlebensraten von 87% (1 Jahr), 78% (3 Jahre) und 73% (5 Jahre) durchgeführt. Dies ist bei 305 Millionen Einwohnern und 5.531 Transplantationen im Jahr 2010 deutlich mehr als in Europa mit 600 Millionen Einwohnern und 6.489 Operationen (Dutkowski et al. 2010). 2013 wurden in Deutschland 884 Lebertransplantationen nach postmortalen Organspende und 83 Lebertransplantationen nach Lebendspende gemeldet (Deutsche Stiftung Organspende, www.dso.de, Oktober 2014 (Deutsche Stiftung Organtransplantation)). Im gleichen Jahr wurden allerdings 1.305 Menschen zur Lebertransplantation angemeldet. Dies verdeutlicht die Knappheit der Organe. Die dadurch bedingten langen Wartezeiten führen dazu, dass 5-10% der Patienten während dieser Zeit einen deutlichen Krankheitsprogress erfahren oder gar versterben (Alqahtani 2012).

2.1.3 Indikationen und Kontraindikationen

Der häufigste Grund für eine Listung zur Transplantation in Europa ist die Leberzirrhose (58%) vor den Leberkarzinomen (14%), den cholestatischen Lebererkrankungen (10%), dem akuten Leberversagen (8%), metabolischen Störungen (6%) und anderen wie z.B. dem Budd Chiari Syndrom oder parasitären Erkrankungen (Zeitraum 01/1988 - 12/2010, www.eltr.org, Stand Januar 2013). Aktuelle Zahlen aus dem Universitätsklinikum Heidelberg spiegeln diese Verteilung in einem Zeitraum von 01.01.2001 bis 31.08.2013 bei insgesamt 893 Lebertransplantationen wieder (Leberzellkarzinom 22%, virale Leberzirrhose 15%, alkoholische Leberzirrhose 21%, cholestatische Lebererkrankungen 11%, metabolische Lebererkrankungen 8%, kryptogene Zirrhose 6%, akutes Leberversagen 6%, angeborene biliäre Erkrankungen 4%, Autoimmunhepatitis 2%, andere 5%) (Schemmer 2013).

Bei den oben genannten Erkrankungen sind es oft die Komplikationen, wie z.B. portale Hypertension, hepatopulmonales und -renales Syndrom oder die hepatische Enzephalopathie (Rodríguez-Perálvarez 2011; Alqahtani 2012) welche den Patienten zusetzen.

Als absolute Kontraindikationen zur Transplantation gelten:

- Unkontrollierte Infektionen wie z.B. Cholangitis oder Peritonitis
- Schwere Komorbiditäten (Kardiopulmonale Erkrankungen, AIDS)
- Extrahepatische Tumorerkrankungen
- Fortgesetzter Substanzenabusus (v.a. Alkohol)
- Non-Compliance

Relative Kontraindikationen:

- Alter > 65 Jahre
- Übergewicht (BMI > 40 kg/m²)
- HIV Erkrankung

2.1.4 Entscheidungskriterien zur Transplantation

Brown und Lake beschrieben als Voraussetzung für eine optimale Versorgung die Kontrolle durch evidenzbasierte Messungen, Gleichheit und Gerechtigkeit, den maximalen Nutzen und die Transparenz (Brown und Lake 2005). Deshalb wurde von einem reinen Wartesystem auf ein System der Risikoabschätzung übergegangen, welches als Grundlage den im Jahr 2000 publizierten MELD-Score (model of end-stage liver disease) hat (Malinchoc et al. 2000). Dieser beinhaltet die Parameter Serumbilirubin, Serumkreatinin, INR, portale Hypertension mit TIPS (transjugulärer-portosystemischer-Shunt) und schätzt die Kurzzeitmortalität (Wiesner et al. 2003) und die Wartelistenmortalität (Kamath et al. 2001) ab. Leise stellte 2011 einen modifizierten Score vor, welcher das Serumnatrium berücksichtigt und die bekannten Parameter anders gewichtet (Leise et al. 2011).

Eine Prognose über das Outcome gibt der von Feng et al. publizierte „donor risk index“ (DRI) an, welcher Spender- und Empfängerkriterien wie Alter, Rasse, Größe, Todesursache, Split-Leber, non-heart-beating-donor, kalte Ischämiezeit und Spende (regional/überregional) berücksichtigt (Feng 2009).

2.2 Komplikationen nach Lebertransplantation

2.2.1 Allgemeine Komplikationen

Postoperativ kann es zu einer akuten Abstoßungsreaktion kommen. Mittel bis schwere Reaktionen treten bei bis zu 15% der Transplantierten auf (Demetris et al. 2002). Hiervon kann jedoch die Mehrheit durch Eskalation der immunsuppressiven Therapie mittels Kortison Stoßtherapie behandelt werden.

Die chronische Abstoßung ist deutlich weniger häufig und tritt in < 5% der Fälle auf (Jain et al. 2001). Fulminante Verläufe nach akuten oder chronischen Abstoßungsreaktionen sind selten und treten nur bei ca. 1% der Transplantierten auf.

Viele der beobachteten Komplikationen nach Lebertransplantation stehen mit der Langzeit Immunsuppression in Zusammenhang. Die verwendeten Medikamente (z.B. Cyclosporin, Calcineurininhibitoren oder Cortison) können zu Niereninsuffizienz, Hypertonie, Diabetes, Adipositas oder Dyslipidämie führen (Alqahtani 2012). Hierbei entwickeln bis zu 26% der Patienten einen so genannten „new onset diabetes mellitus“, bis zu 50% der Patienten Übergewicht (Watt und Charlton 2010).

Das Risiko eine Niereninsuffizienz zu entwickeln beträgt 24% nach Lebertransplantation und ist mit einer verminderten Überlebensrate verbunden (Sharma et al. 2009). Hierbei werden bis zu einem Viertel der betroffenen Patienten terminal niereninsuffizient und benötigen eine Nierentransplantation im Verlauf.

Zudem kommt es häufig zu Medikamenteninteraktionen, welche zu Spiegelerhöhung (z.B. bei Makrolid Antibiotika, Kalziumkanalinhitoren, oder dem Prokinetikum Metoclopramid) oder zu Spiegelabfall der Immunsuppressiva (z.B. bei Marcumar oder Rifampicin) führen können. Diese können die oben genannten Komplikationen verstärken.

Deshalb sind so genannte Antimetabolite wie Azathioprin oder MMF (Mycophenolat-Mofetil) in Anwendung, welche weniger Nebenwirkungen zeigen (Verdonk et al. 2007a).

Neue Medikamente, wie die m-TOR Inhibitoren Sirolimus und Everolimus, werden zurzeit getestet und man verspricht sich geringere Nephrotoxizität und anti-fibrotische und anti-neoplastische Eigenschaften. Dies ist wichtig, da Transplantierte ein 2-3 fach erhöhtes Risiko haben an einer Krebserkrankung zu erkranken (Herrero et al. 2005a; Alqahtani 2012). 5-16% der Patienten entwickeln eine Neoplasie (Vallejo et al. 2005) und 11% der Todesfälle nach Transplantation sind Krebs assoziiert (Jain et al. 2000). Am häufigsten

kommt es hierbei zu Hautkrebs (Herrero et al. 2005b).

Eine weitere bedrohliche Komplikation ist das unvermeidbare Wiederauftreten einer bereits vor Transplantation bestandenen Hepatitis C Virus Infektion (HCV). Dies ist assoziiert mit einem erniedrigten 7-10 Jahresüberleben von 60% gegenüber nicht infiziert transplantierten Patienten (75%) (Forman et al. 2002; Belli et al. 2007). 5-8% verlieren die Leber in den ersten 12-18 Monaten auf Grund von fibrosierender HCV und 30% der Betroffenen entwickeln eine Zirrhose innerhalb von 5 Jahren nach Transplantation (Narang et al. 2010).

2.2.2 Gallengangskomplikationen

Gallengangskomplikationen treten in 6-35% der Transplantationen auf (Lerut et al. 1987; Stratta et al. 1989; O'Connor et al. 1995; Verdonk et al. 2006; Akamatsu et al. 2011).

Aus diesem Grund wird die Gallenganasanastomose auch als „Achillesferse“ der Lebertransplantation bezeichnet (Krom und Sanchez-Urdazpal 1992; Sibulesky und Nguyen 2011). Die am meisten angelegte Anastomose ist die End- zu End-Choledochocholedochostomie. Bei kurzem Gallengang wird eine biliodigestive Anastomose in Form einer Hepaticojejunostomie angelegt (Tung und Kimmey 1999).

Die häufigste Komplikation ist die Gallengangsstenose (12%-16%) gefolgt von der Gallenleckage (5-8%) (Verdonk et al. 2006; Akamatsu et al. 2011; Wang et al. 2011). Diese kann einfach durch Stenteinlage in die Papilla Vaterii und einer damit verbundenen Druckentlastung therapiert werden (Saab et al. 2000; Morelli et al. 2001). Strikturen des Gallenganges können in Anastomose bezogen und nicht Anastomose bezogen eingeteilt werden. Anastomose bezogene Strikturen entstehen durch fibrotischen Umbau im Bereich der Naht. Sie können, im Falle einer End- zu- End Anastomose bei somit noch erhaltener Anatomie, durch ERCP und Ballondilatation behandelt werden (Verdonk et al. 2007a).

2.2.3 Ischemic-type biliary lesions

Nicht Anastomose bezogene Strikturen (NAS) treten in 15% der Fälle bei hirntoten Spendern (Tung und Kimmey 1999; Verdonk et al. 2007b; Sharma et al. 2008) und in 16% - 66% bei Patienten von Spendern, welche an einem primären Kreislaufstillstand verstarben, auf (Abt et al. 2003; Foley et al. 2005; Maheshwari et al. 2007; de Vera et al. 2009). Sie gelten als stark problembehaftet, da sie das gesamte Gallengangssystem

betreffen, an multiplen Lokalisationen auftreten können und oft therapierefraktär sind (Buis et al. 2006; Verdonk et al. 2006). Der genaue Mechanismus ist noch unklar und Gegenstand weiterer Forschung (Sanchez-Urdazpal et al. 1992; Buis et al. 2007).

Ursprünglich wurden NAS bei Patienten mit Thrombose der Leberarterie gesehen. Diese führte zu Ischämie des Gallengangssystems und folgend zu Nekrose und dem typischen Bild von Strikturen und Erweiterungen in der bildgebenden Diagnostik (Zajko et al. 1987). Da dieses Bild auch bei Patienten ohne thrombotisches Ereignis auftrat, wurde hierfür der Begriff ITBL (ischemic-type biliary lesions) eingeführt (Buis et al. 2006). Andere Autoren sprechen von diffuse biliary strictures, ischemic cholangitis oder intra hepatic biliary strictures (Nakamura et al. 2005; Nishida et al. 2006).

Ein multifaktorielles Geschehen wird angenommen, bekannte Risikofaktoren können in drei Hauptgruppen unterteilt werden (siehe Tab. 1). Wichtige Beispiele sind die ABO-Inkompatibilität (20% bis 80% assoziiert mit ITBL (Sanchez-Urdazpal et al. 1991; Rull et al. 2001)), chronische Abstoßung oder Infektionen. Die Schäden entstehen durch die verminderte Blutversorgung, welche durch Alteration des Gefäßendothels bedingt ist (Deltenre und Valla 2008). Die verminderte Blutversorgung führt dann zu Untergang von Gallengangsepithelien (Matsumoto et al. 1993).

Außerdem ist ITBL mit bereits vorbestehenden Autoimmunerkrankungen wie PSC (primär sklerosierende Cholangitis) (Campbell et al. 1994; Feller et al. 1996; Brandsaeter et al. 2005) und der Autoimmunhepatitis assoziiert (Buis et al. 2006). Auch maligne Erkrankungen wie das Lymphom, hepatozelluläre Karzinome oder cholangiozelluläre Karzinome können Auslöser sein (Campbell et al. 1994).

Ein weiterer Risikofaktor ist eine verlängerte kalte Ischämiezeit. So zeigten Sanchez-Urdazpal et al., dass die Rate an ischemic-type biliary lesions von 7% auf 52% ansteigt, wenn die kalte Ischämiezeit über 13 Stunden (h) beträgt.

Ischämischer Schaden	Immunologische Prozesse	Gallensalz-induzierter Schaden
Warme Ischämie im Spender	AB0 Inkompatibilität	Hydrophobe Gallensalze sind zytotoxisch
Verlängerte kalte Ischämie	Autoimmunerkrankungen	
Reperfusionsschaden	Zytomegalie Virus Infektion	
Warme Ischämie bei Transplantation	Chronische Abstoßung	
Gestörter Blutfluss im peribiliären Plexus		

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entwicklung einer ITBL

Die Klinik der ITBL ist mit Bauchschmerzen und Fieber eher unspezifisch. Bei manchen Patienten kommt es zu einem asymptomatischen Anstieg der γ -Gt, ALP (Alkalische Phosphatase) und des Bilirubins als erstes Zeichen, welche zur Durchführung einer Darstellung der Gallewege führen sollte. Sie tritt im Mittel innerhalb der ersten 6 Monate nach Transplantation auf (Sanchez-Urdazpal et al. 1993; Feller et al. 1996) und schreitet in 61% der Fälle fort (Verdonk et al. 2007b). Dies ist vor allem der Fall, wenn die Strikturen innerhalb des ersten Jahres entstehen und zusätzlich eine bakterielle Cholangitis besteht. Das Auftreten kann jedoch zwischen sieben Tagen nach Transplantation bis zu elf Jahren nach Transplantation variieren, wie in dem Review von Akamatsu et al. beschrieben, welches 14.359 Transplantationen berücksichtigt (Akamatsu et al. 2011).

Hierbei scheint die kalte- und warme- Ischämiezeit entscheidend zu sein. Sind sie länger treten die nicht Anastomose bezogenen Strikturen früher auf (Buis et al. 2007). Sind die Zeiten der Ischämie kürzer, kommt es im Mittel erst nach über einem Jahr zu Strikturen.

Der Goldstandard in der Darstellung der Gallewege ist die ERCP (endoskopische retrograde Cholangiopankreatikographie) und die PTCD (perkutane transhepatische Cholangiodrainage) (Holbert et al. 1995; Bowen et al. 1996; Keogan et al. 1999). Auch die MRCP (Magnet- Resonanz- Cholangiopankreatikographie) spielt durch ihr nicht-invasives Vorgehen eine immer wichtiger werdende Rolle (Boraschi et al. 2001; Ward et al. 2004; Boraschi et al. 2010). Hier können die typischen Strikturen und Erweiterungen der Gallengänge dargestellt werden. Eine Einteilung dieser wurde durch Theilmann et al.

vorge stellt (Theilmann et al. 1994) und bezieht sich auf die Lage: Typ I (extrahepatisch), Typ II (intrahepatisch) und Typ III (extra- und intrahepatisch). Hier konnte durch Buis et al. gezeigt werden, dass die Strikturen bei längerer Ischämiezeit öfters in der Peripherie lokalisiert sind und häufiger mit einer PSC assoziiert sind (Buis et al. 2007).

Ein weiteres wichtiges Kriterium stellt zusätzlich die Durchgängigkeit der Leberarterie dar. Typisch für ITBL sind die diffusen und oft auch bilateralen Strikturen, welche - auch in Hinblick auf den therapeutischen Ansatz - sehr problematisch sind (Nishida et al. 2006).

In gewonnenen Leberbiopsaten können nur Anzeichen auf eine bestehende ITBL festgestellt werden. Hierbei kann es zu Gallengangsproliferationen und Cholestase kommen (Campbell et al. 1994), bisher existieren jedoch keine Studien, welche Kriterien für eine histologische Klassifizierung aufzeigen. Die ITBL ist momentan somit eine klinische Diagnose.

Die Therapie der ITBL ist sehr individuell und hängt stark von der Schwere und der Lokalisation der Strikturen ab. Aufdehnung der Engstellen über endoskopische oder perkutane Verfahren und anschließende Anlage eines Stents können in bis zu 50% der Fälle zum Erfolg führen, bzw. die Zeit bis zu einer erneuten Transplantation verlängern (Li et al. 1992; Sanchez-Urdazpal et al. 1993; Rerknimitr et al. 2002; Gopal et al. 2003; Guichelaar et al. 2003; Ward et al. 2004). In vielen Fällen wird zusätzlich eine medikamentöse Therapie mit Ursodesoxycholsäure begonnen, um die Zusammensetzung der Galle und den Fluss zu optimieren (Gopal et al. 2003). Extrahepatische Strikturen können durch Operation und Anlage einer biliodigestiven Anastomose behoben werden (Schlitt et al. 1999), bei proximaleren Strikturen oder ausbleibendem Erfolg ist die Re-Transplantation jedoch fast unumgänglich.

Patienten mit ITBL werden häufiger rehospitalisiert, haben längere Liegezeiten und müssen öfters invasiven Untersuchungen unterzogen werden (Ludwig et al. 1992; Skaro et al. 2009). Zudem führt die ITBL mit ihren biliären Komplikationen zu einem verkürzten Transplantatüberleben und damit zur Retransplantation (Verdonk et al. 2007b; Zhu et al. 2008).

Präventiv sollte eine ausreichende Heparinisierung des Spenders gewährleistet sein, der Gallengang sollte auf Grund der anatomischen Besonderheit des peribiliären Plexus erst nach dem erfolgten Flush durchtrennt werden. Hierbei sollten die kalte- und warme-Ischämiezeit so kurz wie möglich gehalten werden und soweit möglich eine ABO Kompatibilität des Organs vorliegen (Nishida et al. 2006).

2.3 Grundlagen der Anatomie und Gefäßversorgung der Leber

Dieser Abschnitt soll die für diese Arbeit relevanten Punkte beleuchten.

2.3.1 Mikrozirkulation der Leber: Einteilung nach Rappaport

Der histologische Aufbau der Leber kann nach zwei verschiedenen Einteilungen erfolgen.

Zum einen in histologische Gesichtspunkte mit Leberläppchen und einer zentralen Vene. Leberbälkchen stehen um die Zentralvene angeordnet und Sinusoide führen von peripher nach zentral um in die Vene zu drainieren. Die Membran der Sinusoide ist mit einem diskontinuierlichen Endothel ausgekleidet, welches einen Stoffaustausch über den so genannten Disseiraum zu den Hepatozyten erlaubt. In entgegengesetzter Richtung wird die Galle über Kapillaren zu den Rändern der Leberläppchen transportiert, den so genannten Portalfeldern mit der darin befindlichen Glisson- Trias aus Vena interlobularis (Pfortaderast), Arteria interlobularis (Ast der Leberarterie) und Gallengang (Ductus biliferus).

Eine Einteilung nach funktionellen Gesichtspunkten wurde 1973 von A. M. Rappaport vorgestellt. Hier wird die Einteilung in Leberazini vorgenommen. Zentrum stellt hier die Glissonsche- Trias mit Arterie, Vene und Gallengang dar. Benachbarte Läppchen werden von dem im Zentrum stehenden Arterien- und Pfortaderast versorgt. Somit besteht vom Zentrum mit Azinus zur Lebervene ein Sauerstoffgradient. Die proximalen Strukturen sind anfälliger für toxische Einflüsse, welche von der Arterie oder Pfortader eingeschwemmt werden, die distalen Strukturen sind anfälliger für Sauerstoffmangel, Anoxie, Nährstoffmangel oder Blutstau. Rappaport stellte 1973 eine Einteilung in Zone I (Azinus) bis III auf (siehe Abb.1) (Rappaport 1958; Rappaport 1973; Nakanuma et al. 1997; Kan und Madoff 2008; Aller et al. 2012). In Zone I findet die Glykogen- und Proteinproduktion statt, außerdem kann hier bei Zellschaden die größte Zytogenese bei Regeneration beobachtet werden. Die terminalen Arterien, welche sich in der Glisson- Trias befinden drainieren in feine Kapillaren, welche den so genannten peribiliären Plexus (PBP) formen. Der Aufbau dieser Kapillaren zeigt, dass sie einen präkapillären Sphinkter besitzen und weiterhin dünnes, nicht fenestriertes Endothel mit einer Basalmembran. Sie münden sowohl in die Sinusoide als auch in die terminalen Pfortaderäste (Rappaport et al. 1958; Rhodin 1967).



Abbildung 1: Zoneneinteilung nach Rappaport

2.3.2 Die Besonderheiten der Blutversorgung der Gallengänge

Die Blutversorgung der Gallengänge ist vielschichtig. 60% der Blutversorgung der extrahepatischen Gallengänge erfolgt über Arterien außerhalb der Leber wie die Aa. pancreaticoduodenalis, retroportal gelegene Arterien und A. gastroduodenalis. 38% über Arterien distal der Gallengänge wie rechte und linke Leberarterie und A. cystica (bei der Ratte nicht vorhanden). Die restlichen 2% entspringen der A. hepatica propria (Northover und Terblanche 1979; Chen et al. 1999; Nishida et al. 2006).

Die Gallengänge selbst werden über den peribiliären Plexus versorgt (Nakanuma et al. 1997; Stapleton et al. 1998). Der peribiliäre Plexus des Ductus hepaticus communis (DHC) wird hauptsächlich über zwei Abgänge der A. gastroduodenalis versorgt, steht aber in direkter Verbindung mit dem intrahepatischen peribiliären Plexus, welcher über die A. hepatica dexter und sinister versorgt wird. Somit besteht über dieses System eine wichtige Kollaterale, welche im Falle eines Verschlusses der A. hepatica die Blutversorgung gewährleisten kann (Vellar 1999; Kawarada et al. 2000).

Itai et al. beschreiben in „blood flow and liver imaging“ die einzigartige Eigenschaft der Leber eine duale Blutversorgung über Pfortader und Arterie zu besitzen (Itai und Matsui 1997). 80% der Blutversorgung der Hepatozyten erfolgt durch die Pfortader, 20% über Arterien. Hierbei spielt der eben erwähnte PBP eine wichtige Rolle. Die Arterien ziehen spiralförmig um die Pfortaderäste und münden dann in die Pfortaderabschnitte um zusammen in die Sinusoide zu drainieren. Hierfür stehen vier verschiedene arterioportale Kurzschlüsse zur Verfügung. Eine dieser Verbindungen ist über den PBP gewährleistet (Murakami et al. 1974; Kan und Madoff 2008).

Weitere Aufgaben des PBP sind sekretorische und absorptive Funktionen zur Unterstützung der biliären Epithelzellen. Interessant ist hierbei, dass die Gallenblasenmukosa einen ähnlichen Aufbau wie der PBP hat. Bei der Ratte, welche keine Gallenblase besitzt, ist die Funktion des PBP somit von besonderer Bedeutung (Murakami et al. 1974; Caggiati et al. 1992; Gaudio et al. 1993; Gaudio et al. 1996).

Verlust des PBP, z.B. im Rahmen einer Chemoembolisation oder assoziiert mit PSC kann zu Fibrosierung der Gallengänge und des periductalen Gewebes führen (Kobayashi et al. 1993; Kobayashi et al. 1994).

2.4 Überblick über die Literatur

Tierexperimentelle Studien, welche auf Modellen an der Ratte beruhen, sind in der Literatur sehr häufig zu finden, das Nagetier stellt deshalb in vielerlei Hinsicht ein gutes Versuchstier da. Auch in der experimentellen Erforschung der Leber gibt es viele bereits beschriebene Modelle an der Ratte (Aller et al. 2012). Schränkt man die Suche jedoch auf die arterielle Perfusion der Leber ein, so finden sich sehr wenige Modelle und nur eines welches ein Modell zur ITBL beschreibt.

Sheng et al. beschreiben in ihrem Modell aus dem Jahr 2009 die Auswirkungen von ein bis dreistündigem Klemmen der A. hepatica communis und des Ductus hepaticus communis (DHC) auf die Gallengänge. Sie benutzen hierzu ein Kaninchenmodell in einem 30 tägigen Beobachtungszeitraum (Sheng et al. 2009). Ziel des Versuches war die Etablierung eines Modells zur ITBL. Durch die Klemmung mit Ischämie und nachfolgender Reperfusion, sollte die Lebertransplantation simuliert werden. Hierbei beschrieben die Autoren ischämische Strikturen nach Klemmung der Arterie und des Gallenganges, einhergehend mit Anstieg der Transaminasen und des Bilirubins. Zudem konnte ein Schaden an Gallengangsepithelzellen nachgewiesen werden, welcher sich proportional

zur Klemmzeit verhielt. Durch Klemmung der Leberarterie und des Gallenganges sollte somit ein ITBL ähnliches Schadensbild entstehen. Als optimale Dauer der Klemmung um messbare Schäden zu erhalten, jedoch keine Mortalität bei den Versuchstieren zu erzeugen, wurden zwei Stunden festgelegt.

Neben dem Modell von Sheng zur ITBL gibt es weitere Modelle, welche sich mit Ischämie, ausgelöst durch Ligatur der Leberarterie oder des Gallenganges beschäftigen.

Die Auswirkungen der Ligatur der Leberarterie wurden von Soares et al. beschrieben. Die Arbeitsgruppe konnte eine Reduktion des relativen Volumens der Gallengänge ohne Veränderung der Transaminasen oder des Bilirubins nach sieben Tagen zeigen. In Anwesenheit von Cholestase, induziert durch Gallengangsligatur, zeigte sich ein Anstieg der Transaminasen kombiniert mit Zellnekrosen (Soares et al. 1993).

Eine ganze Reihe von Autoren beschäftigte sich mit der Relevanz der arteriellen Anastomose bei Rattenlebertransplantation mit teilweise sehr gegensätzlichen Ergebnissen. Zhao et al. zeigten, dass eine fehlende Leberarterie nach Transplantation zu Gallengangsproliferation, Zunahme des Bindegewebes und Abnahme des Lebergewebes führt. Zudem kommt es zu Schäden der Gallengänge mit Maximum vier Wochen nach Transplantation mit folgender Leberfibrose (Zhao et al. 1993; Zhao et al. 1995). Imamura et al. konnten ebenfalls Schäden der Gallengänge in einem Modell der Rattenlebertransplantation ohne Anschluss der Leberarterie nachweisen. Bei einem Teil der Tiere führte dies zu transienter Zunahme der Gallengänge, Gallengangsschäden und Leberfibrose, bei einem anderen jedoch sekundär zu biliärer Zirrhose (Imamura et al. 1997). Beide Autoren empfehlen auf Grund ihrer Resultate den Anschluss der Leberarterien. Im Gegensatz hierzu konnten Kamada et al. keine Unterschiede hinsichtlich des Überlebens oder der Lebermorphologie nach Lebertransplantation an der Ratte mit oder ohne Anschluss der Arterie feststellen (Kamada et al. 1992). Diese Ergebnisse bestätigen Svensson et al., welche zudem keine Unterschiede im Verlauf der biochemischen Marker feststellen konnten (Svensson et al. 1991).

Die Auswirkungen der arteriellen Ligatur auf Gallengangskomplikationen im Rahmen der Transplantation werden durch die Arbeiten von Beaussier et al. und Li et al. beleuchtet (Beaussier et al. 2005; Li et al. 2011b). Li et al. durchtrennten sowohl Gallengang als auch Arterie und verglichen das Auftreten von Komplikationen zwischen Tieren mit und ohne Wiederherstellung der arteriellen Perfusion. Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Zahl an dilatierten Gallengängen, Sludge oder Abszessen in der Gruppe ohne arterielle Rekonstruktion. Histologisch konnte in dieser Gruppe ebenfalls eine erhöhte Zahl an

Monozyten im Bereich Rappaport Zone I gesehen werden. Beaussier et al. konnten in einem ähnlichen Modell die auf eine arterielle Deprivation folgenden Prozesse darstellen. Bei einigen Tieren erfolgte nur die Ligatur der Leberarterie, bei anderen wurde zusätzlich der Gallengang über einem Stent ligiert. Tiere ohne arterielle Durchblutung der Leber entwickelten biochemische Anzeichen von Cholestase und die Cholangiozyten zeigten bereits nach vier Stunden Zellschäden. Als Reaktion erfolgte die Ausschüttung von VEGF, welches zu einer Gallengangsproliferation innerhalb der ersten Woche führte. Durch diese Umbauprozesse konnte der Gallefluss aufrechterhalten werden und die Leber vor einer biliären Zirrhose geschützt werden.

Sucht man nach Modellen, welche Risikofaktoren für ITBL betrachten, findet man vor allem Modelle zur Cholestase oder partieller Obstruktion des Gallenganges (DHC) und deren Auswirkungen auf das Lebergewebe, (Sekas 1990; Rodríguez-Garay et al. 1996; Prado et al. 2003; Toki et al. 2011) den Gallengängen (Rodríguez-Garay et al. 1999; Zhao et al. 2008; Li et al. 2011a) und die Folgen der warmen Ischämie auf den biliären Schaden (Zhu et al. 2012).

Zusammenfassend gibt es außer dem von Sheng et al. beschriebenen Modell keine weiteren Modelle zur ITBL in der Literatur. Bisher wurden keine morphologischen Kriterien definiert und obwohl es einige Versuche zur Ligatur und Klemmung der Leberarterie gibt, existieren keine Beobachtungen über die Auswirkungen auf die unterschiedlichen Zonen nach Rappaport.

3 Ziel der Studie

Ziel der Studie ist es:

- die Auswirkung einer isolierten Ischämie der Gallengänge und nachfolgender warmen Reperfusion durch Klemmung der Leberarterie in Kombination mit Ligatur des peribiliären Plexus auf Gallengänge und Leberparenchym zu beobachten
- die Auswirkungen der Ligatur der Leberarterie in Kombination mit Ligatur des peribiliären Plexus auf Gallengänge und Leberparenchym zu beobachten
- morphologische Änderungen nach Klemmung bzw. Ligatur zu definieren
- und schließlich zu prüfen, ob ein Modell zur ischemic-type intrahepatic biliary lesions an der Ratte etabliert werden kann.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Alle Versuche wurden an sechs bis neun Wochen alten weiblichen Sprague Dawley Ratten mit einem Gewicht von 180g bis 300g vorgenommen. Die Ratten sind Weiterzuchten der Experimentellen Chirurgie Homburg Saar und stammen ursprünglich von Charles River (Charls River Laboratories Research Models and Services Germany GmbH, Sandhofer Weg 7 D-97633 Sulzfeld).

Die Tiere wurden bis zum Versuchsbeginn in Großkäfigen mit bis zu fünf gleichgeschlechtlichen Tieren unter klimatisierten Bedingungen gehalten und hatten jederzeit Zugang zu Nahrung und Wasser. Nach der Operation wurden sie paarweise gesetzt.

Die Versuche standen unter den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes und wurden von der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes Frau Dr. med. vet. Monica Frings betreut.

4.2 Modell

4.2.1 Anästhesie und Chirurgische Präparation

4.2.1.1 Narkose und Operation Gruppe C und E

Die Tiere wurden nach dem Wiegen in eine Isofluran Kurznaarkose (Isofluran Baxter 250ml, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) versetzt. Daraufhin wurde ihnen die Pento-Barbital Narkose (Nacoren® 0,1ml/100g im Verhältnis Nacoren® : NaCl 1:2) intraperitoneal injiziert.

Nachdem das Tier nach ca. einer Minute in tiefer Narkose war, wurde das Operationsgebiet rasiert und desinfiziert (Softasept® N Hautdesinfektionsmittel B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Das Tier wurde auf einer beheizbaren Arbeitsplatte mittels Klebeband fixiert (siehe Abb. 4 A). Die Augen wurden zum Schutz vor Austrocknung mit Bephanthen Augen- und Nasensalbe (Nasensalbe 10g, Wirkstoff: Dexpanthenol, Bayer, Leverkusen, Deutschland) bestrichen.

Nach der medianen Laparotomie vom Sternum bis ca. 3cm kaudal, wurden die

Wundränder mittels Klemme auseinandergehalten (Abb. 2A, 4B). Kleinere Blutungen wurden mittels Bipolator (Bipolator 50, F.L. Fischer MET GmbH, Freiburg, Deutschland) verödet. Daraufhin konnte das Operationsgebiet vorbereitet werden. Dazu wurde die Leber vorsichtig mit angefeuchteten Tupfern nach kranial gelagert und mittels feuchter Kompresse an Ort und Stelle gehalten (Abb. 2B). Der Darm wurde nach laterokaudal mobilisiert, sodass freie Sicht auf die V. portae mit Ductus hepaticus communis bestand (Abb. 2C).

Im ersten Schritt wurde der Gallengang aufgesucht und inzidiert (Abb. 2D). Durch die kleine Öffnung wurde ein Polyethylen-Schlauch (Portex™ Fine Bore Polythene Tubing 0,58mm ID, 0,96mm OD, Smiths medical int. Ltd, Kent, Vereinigtes Königreich) Richtung Leber eingeführt, das andere Ende dann in den distalen Gallengang geschoben, sodass die Inzision geschient wurde (Abb. 3A). Der Stent wurde dann mittels zweier Ligaturen (Ligatur Schwarz, 6/0 USP 0,7metric, Resorba Wundversorgung GmbH und Co. KG, Nürnberg, Deutschland) fixiert (Abb. 3B). Somit wurde der extrabiliäre peribiliäre Plexus ausgeklemmt, der Gallenabfluss jedoch gewährleistet. Im nächsten Schritt wurde die A. hepatica communis aufgesucht. Um zur Arterie zu gelangen wurde das dort befindliche Bindegewebe vorsichtig durchtrennt und die Arterie mit einer Pinzette vom Bindegewebe der Vena portae distal der Auftrennung in A. gastroduodenalis und A. hepatica communis abgelöst. In der Kontrollgruppe C (3 Stunden Klemmung) wurde die Arterie mittels Gefäßclip geschlossen. In Gruppe E (Ligatur) wurde die Arterie umstochen und doppelt ligiert (USP 10-0 Nylon, 30cm) (Abb. 3C und D).

Während der Klemmzeit von drei Stunden, bzw. in den ersten drei Stunden nach Ligatur, wurden die Tiere auf Heizplatten gelagert (Abb. 4A). Die Bauchmuskelschicht wurde mit 4-0 Prolene Ligatur (4-0 Ethicon Prolene, Polypropylen, Johnson-Johnson Intl, Norderstedt, Deutschland), die Hautschicht mittels Skin Stapler (Appose™ Single Use Skin Stapler, Covidien Surgical, Dublin, Irland) verschlossen. Die Temperaturkontrolle erfolgte mittels Rektalsonde zusammen mit der Kontrolle der Narkosetiefe alle 20 Minuten (Abb. 5A)

Nach Ende der drei Stunden (h) wurde der Bauch wieder eröffnet und der Gefäßclip entfernt. Mit einer 26G Kanüle (BD Microlance® 3, BD Drogheda, Irland) wurde nun die Blutentnahme über die V.cava inferior auf Höhe der V. renalis dextra durchgeführt und die Punktionsstelle mittels sanften Drucks mit einem Tupfer verschlossen. Bei einigen Tieren erfolgte ebenfalls eine Blutentnahme direkt nach dem initialen Eröffnen des Bauches zur

Nullpunktbestimmung.

Nachdem der Bauchschnitt zweischichtig vernäht (4-0 Ethicon Prolene, Polypropylen, Johnson-Johnson Intl, Norderstedt, Deutschland) war, wurden die Tiere in einen separierten Käfig zum Aufwachen gelegt. Eine Infrarotlampe schützte vor Auskühlung. Die postoperative Analgesie wurde mittels Opioid i.m. gewährleistet.

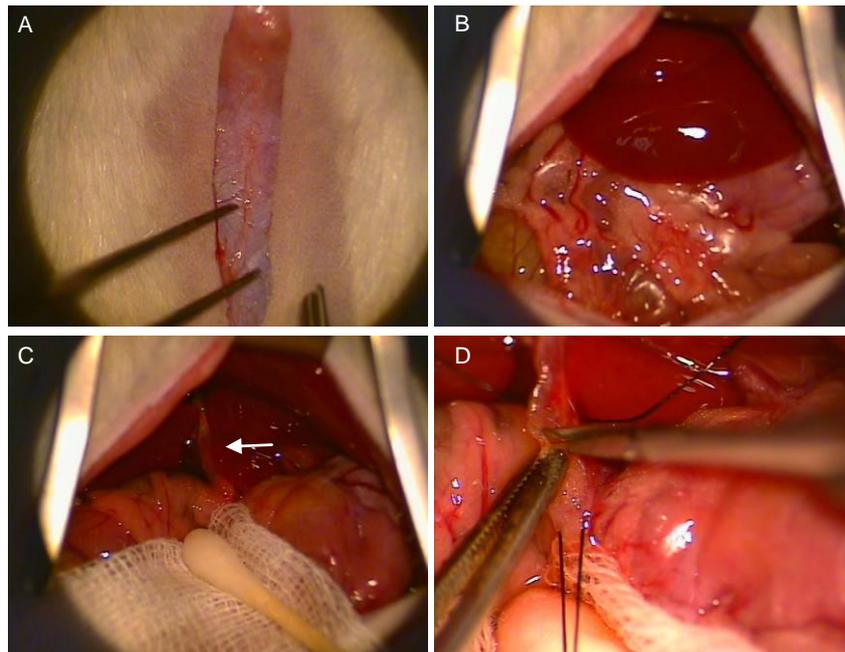


Abbildung 2: Operation mikroskopisch

A: mediane Laparotomie **B:** Übersicht im Situs **C:** Darstellung des Gallenganges (weißer Pfeil) **D:** Inzision des Gallenganges

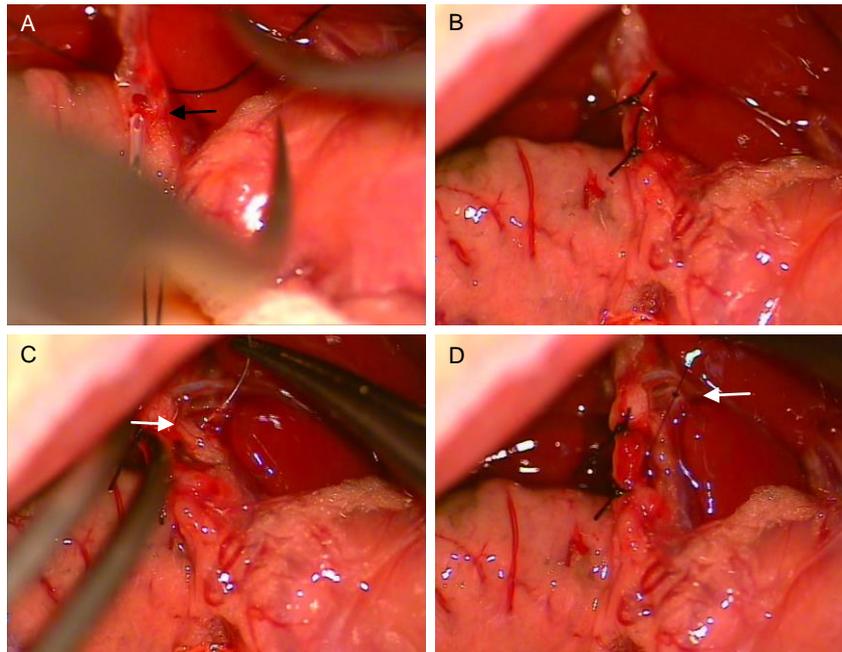


Abbildung 3: Operation mikroskopisch

A: Einführen des Stents in den Gallengang (schwarzer Pfeil)
B: Doppelte Ligatur über dem Stent **C:** Umstechung der A. hepatica com.
(weißer Pfeil) **D:** Ergebnis (weißer Pfeil zeigt Ligatur der A. hepatica com.)

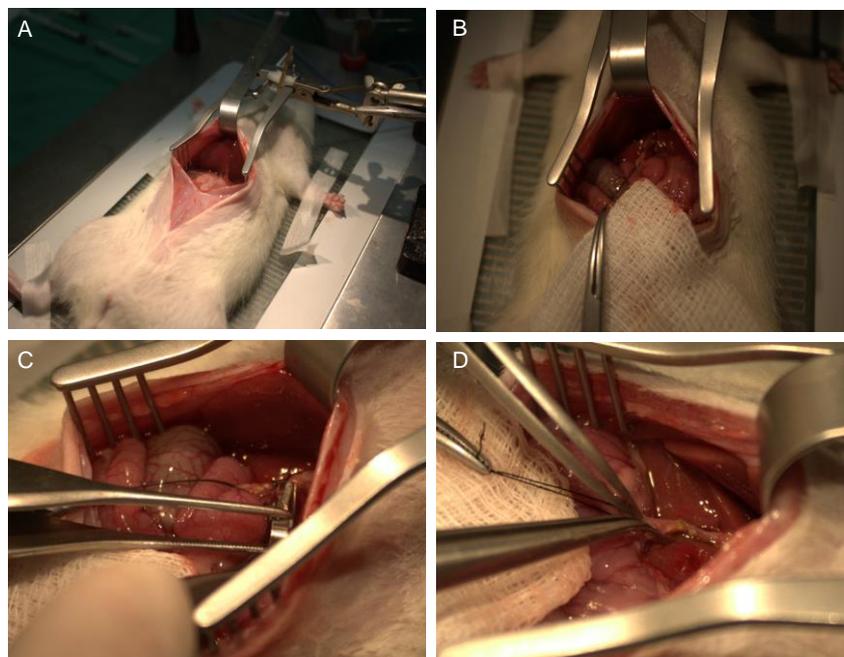


Abbildung 4: Operation makroskopisch

A: Übersichtsaufnahme Operationstisch und Situs **B:** Angeschlungener Gallengang **C:** Klemmung der A. hepatica com. **D:** Einführen des Stents in den Gallengang

4.2.1.2 Narkose und Operation der Sham Gruppe

Die Vor- und Nachbereitungen der Sham Gruppe liefen exakt gleich ab. Es wurde ebenfalls eine Schienung des Gallengangs mit einem Polyethylen-Schlauch vorgenommen. Lediglich auf die Klemmung / Ligatur der A. hepatica communis wurde verzichtet.

4.2.1.3 Narkose und Operation Gruppe A und B

Der Ablauf der Narkose und Operation verhielt sich im Wesentlichen wie unter 4.2.1.1 beschrieben mit folgenden Unterschieden: im Vorversuch betrug die Klemmzeit an der A. hepatica communis zwei Stunden, analog zu den Versuchen von Sheng und Kollegen (Sheng et al. 2009). Wie von dieser Arbeitsgruppe beschrieben wurde in der Gruppe A und B der Gallengang mit einem Metallclip für zwei Stunden geklemmt (Ergebnisse in der Arbeit nicht dargestellt).

4.2.1.4 Narkose für die MRT Untersuchung

In Gruppe A und B wurde zusätzlich eine MRT Untersuchung durchgeführt. Hierbei wurden die Tiere jeweils vor Operation und am Zeitpunkt der Probeentnahme im Kleintier-MRT untersucht. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer Plastikbox, in die ein 5% Isofluran-Sauerstoffgemisch geblasen wurde, bis das Tier nach wenigen Minuten in tiefer Narkose lag. Über eine Speziialschiene konnte das Tier in das MRT gefahren werden, wo es unter einer rattenspezifischen Beatmungsmaske (Sauerstoff vermischt mit 2% Isofluran) in Narkose lag. Über ein Atemflussmessgerät konnte die Narkosetiefe jederzeit beurteilt und angepasst werden. Nach Messung der verschiedenen Sequenzen, was ca. eine Stunde pro Tier dauerte, wurde das Tier in Narkose zum Operationssaal transportiert, in welchem, je nach Zeitpunkt die Operationen oder Probeentnahmen erfolgten.

4.2.2 Probenentnahme

4.2.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte streng nach Versuchsprotokoll (vgl. Absatz 4.4): zum Zeitpunkt der Operation (die Hälfte der Tiere vor Op, die andere Hälfte nach 3h), nach 24h, nach einer, zwei, drei Wochen und am Tag 30. Bei den Tieren, bei denen die Histologie-Entnahme am Tag drei stattfand, wurde ebenfalls Blut entnommen.

Am Tag der Operation und am Tag der Histologiegewinnung wurde intraoperativ über die Vena cava inferior auf Höhe der rechten Nierenvene mittels Punktion mit einer 27G $\frac{3}{4}$ Kanüle jeweils 0,5ml Blut entnommen (Abb. 6D). Die restlichen Blutentnahmen erfolgten, wie oben beschrieben, in Isofluran Kurznaarkose aus dem retrobulbären Plexus (Abb. 5B-D). Dazu wurde durch sanften Druck am Hals des Tieres der venöse Rückstrom gestaut. Dadurch drückt sich der Bulbus nach außen und man kann den retrobulbären Plexus vorsichtig vom inneren Augenrand aus, mit einer Glaspipette, punktieren. Sowohl Kanüle als auch Glaspipette wurden zuvor mit Heparin gespült (Heparin-Na Braun 25000 I.E./5ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Zum Schutz vor Verletzungen wurde die Seite wöchentlich gewechselt und zur Pflege mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe bestrichen. Die Intaktheit des Auges wurde an den darauffolgenden Tagen kontrolliert. Das entnommene Vollblut wurde in ein Serumröhrchen (Serum Z1.3, Sarstedt Ag und Co, Nümbrecht, Deutschland) gefüllt und dann für drei Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Zentrifuge Hettich, Universal 30RF, Deutschland). Der Überstand (Plasma) wurde vorsichtig abpipettiert und in Eppendorfgefäßen (Multi®-Safe-Seal®Tube farblos, PP Füllvol./Nennvol. 1,5/1,7ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bei -80°C eingefroren. Das Vollblut verblieb im Serumröhrchen und wurde ebenfalls weggefroren.

4.2.2.2 Gallenflussmessung

Die Gallenflussmessung erfolgte vor der Blutentnahme am Tag der Histologieentnahme. Nach der medianen Laparotomie wurde der Mittellappen (Aller et al. 2012) mobilisiert und eventuelle Verklebungen entfernt.

Der Gallengang wurde aufgesucht und mit einer Mikroschere an der Oberseite distal des sich im Gallengang befindlichen Polyethylenstents eröffnet. Augenblicklich stellte sich Galle im Bereich der Inzision dar. Durch die Öffnung wurde der Gallengang mit einem Polyethylen-Schlauch (Portex™ Fine Bore Polythene Tubing 0,58mm ID, 0,96mm OD, Smiths medical int. Ltd, Kent, Vereinigtes Königreich) katheterisiert. (Abb. 6A-C)

Die nun abfließende Galle wurde in einem vorher abgewogenen Eppendorfgefäß für zehn Minuten aufgefangen und das Nettogewicht bestimmt.

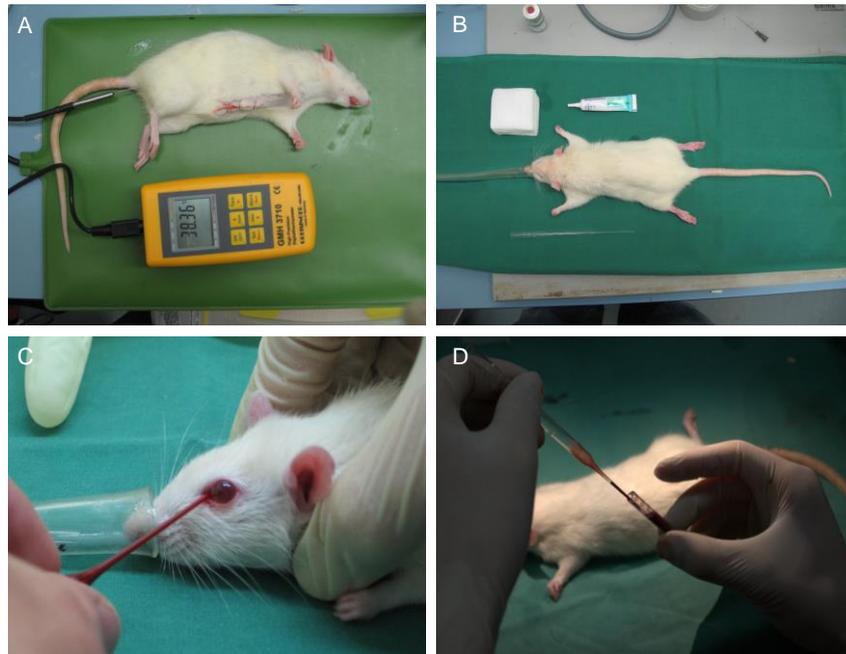


Abbildung 5: Blutentnahme

A: Postoperatives Temperaturmonitoring **B:** Vorbereitung zur Blutentnahme, Tier mit 2%igem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch über Nasenapplikator narkotisiert
C: Punktion des retrobulbären Plexus mittels Glaspipette **D:** Vorbereitung zur Zentrifugation

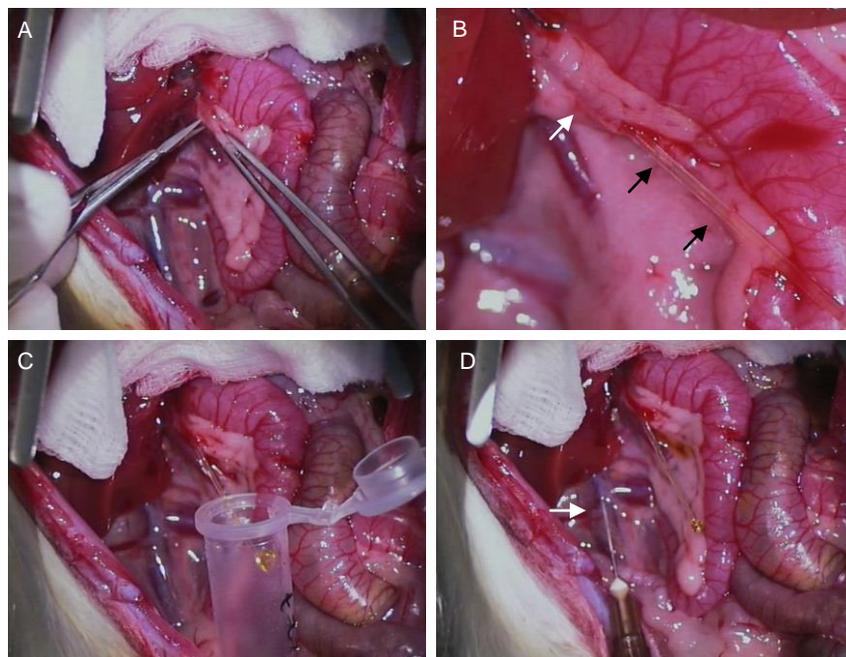


Abbildung 6: Gewinnung der Proben

A: Inzision des Gallenganges **B:** Polyethylen-Schlauch (schwarze Pfeile) im Gallengang (weißer Pfeil) **C:** Messung des Gallenflusses **D:** Punktion der infrahepatischen V. cava inf. (weißer Pfeil)

4.2.2.3 Gewebeasservierung

Die Gewebeasservierung erfolgte im Anschluss an die Blutentnahme und Gallenflussmessung, am Tag der Histologieentnahme. Dazu wurden kleine Verklebungen, die sich aufgrund der ersten Operation gebildet hatten vorsichtig entfernt.

Nachdem die suprahepatische V. cava inferior mit einer Schere durchtrennt war, wurde die Leber unter vorsichtigem Zug mobilisiert und die V. portae hepatis, A. hepatica communis und der DHC sowie die infrahepatische V. cava inferior durchtrennt.

Die Leber wurde nun zur Probengewinnung auf einer Alufolie in kleine Stücke geschnitten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass keine Leberlappen, welche in der Operation an Tag Null mobilisiert worden waren, verwendet wurden.

Ein Teil der Proben wurde für die histologischen Untersuchungen in phosphatgepuffertem 4%-igem Formalin (Roth, Karlsruhe, Deutschland) für 48h fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Ein weiterer Teil wurde in Probenbeuteln (Rotilano®-Probenbeutel 120*170mm, Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland) verpackt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C im Gefrierschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Außerdem wurden Proben in einem Einbettmedium (Tissue Freezing Medium®, Jung, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet und nach Schockgefrierung ebenfalls bei -80°C gelagert (Moline und Glenner 1964).

4.3 Untersuchungsmethoden

4.3.1 Western Blot

Von den kryokonservierten Nativproben wurden 100 bis 200mg schwere Gewebestücke unter Zusatz eines Proteinaseinhibitor-Gemischs (1:50 Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und PMSF (1:100 Phenylmethylsulfonylfluorid, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) zusammen mit einem Low-Salt-Lysepuffer bestehend aus 10mM TRIS, pH 7,5, 10mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,5% Triton X 100 0,02% NaN₃ homogenisiert (Ultra Turrax T25, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland).

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten, bei der die Proben auf Eis gelagert wurden, wurde für 30 Minuten bei 4°C mit 16.000g zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau,

Deutschland) und der Überstand (natives Protein) abpipetiert. Die dadurch gewonnenen Aliquots konnten nun zur Proteinbestimmung verwendet werden.

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde die spektrophotometrische Methode nach Lowry (Lowry et al. 1951) verwandt. Durch Verdünnung mit destilliertem Wasser konnte die Proteinkonzentration der Extrakte auf den gleichen Proteingehalt eingestellt werden. Unter Zugabe von 2x „Sample Buffer“ nach Laemmli (Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) wurden die Extrakte für fünf Minuten in kochendem Wasser denaturiert und anschließend in die Geltaschen transferiert (Konzentration 60µg/Bande).

Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 10%) elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zuerst bei einer Spannung von 100V für 15 Minuten im Sammelgel, dann bei 140V für eine Stunde im Trenngel. Als Molekulargewichtsstandard diente der Rainbow highrange Marker (Amersham Biosciences, Piscataway, USA).

Die Equibrilierung der Gele für das folgende Membranblotting erfolgte nach Beendigung der Elektrophorese in einem Transferpufferbad. Der Transfer auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2µm, Polyvinylidenfluorid, Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, Herts, Vereinigtes Königreich) erfolgte für eine Dauer von zwei Stunden in einer Mini-Trans-Blot-Kammer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) bei einer Spannung von 50V unter Zugabe von Eis und ständigem Rühren.

Um eine Bindung des Primärantikörpers an unspezifische Bindungsstellen zu verhindern, wurden die Membranen mit einer fünfprozentigen Lösung aus Milchpulver (Blotting Grade Blocker non-fat dry milk, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) in TBS-T (Tris Buffered Saline Tween (Tween®20 Polyoxyethylenesorbitan monolaurats Sigma -Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland)) für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen mit TBS-T wurden die Primärantikörper aufgetragen und für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (siehe Tabelle 2).

Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Membranen mit den entsprechenden, in Tabelle 2 aufgelisteten, IgG- Peroxidase markierten Sekundärantikörpern für 90 Minuten inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit TBS-T dann schließlich der Chemielumineszenzmethode (ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, USA)

unterzogen. Zuerst wurden die Membranen für eine Minute in einem ECL (enhanced chemiluminescence) Reagenz inkubiert, danach in Autoklavierfolie verpackt und zur Exposition eines Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, USA) in einer Röntgenkassette positioniert. Zur Entwicklung wurde Zahnfilm Reagenzien (Zahnfilm, Adefo GmbH, Nürnberg, Deutschland) verwendet.

Monoklonaler β -Aktin-Antikörper (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) wurde als Kontrollbande verwendet. So konnte die in den Western Blots ermittelte desitometrische Dichte rechnerisch über die β -Aktin-Konzentration angepasst werden. Die Röntgenfilme wurden mit Hilfe eines Gel-Dokumentationssystems (Gel Doc, Amersham Biosciences, Piscataway, USA) und eines Quantifizierungsprogrammes (Quantity One- Geldoc, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) analysiert (vgl Slotta 2009 Seite 47 - 48).

Primär-Ak	Urspr.	Verd.	Hersteller	Sekundär- Ak	Verd.	Hersteller
β -Aktin	mouse	1:5000	Sigma	sheep-anti-mouse-IgG Peroxidase	1:5000	Amersham
Caspase 3	Rabbit	1:800	Cell Signaling	donkey-anti-rabbit-IgG-Peroxidase	1:5000	Amersham
VEGF	rabbit	1:100	Santa Cruze	donkey-anti-rabbit-IgG-Peroxidase	1:5000	Amersham

Tabelle 2: Western Blot: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper

4.3.2 Histologische Analyse – Standardfärbung

Aus den in Paraffinwachs eingebetteten Proben wurden 3 μ m dicke Schnitte angefertigt, welche auf Objektträgern fixiert wurden. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Proben endparaffiniert und dann jeweils ein Objektträger pro Tier mit AS-D Chlor-Acetesterase (CAE) und ein Objektträger mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und eingedeckt.

Alle Färbungen und Western Blots wurden mit Unterstützung des Laborteams und nach den Protokollen der experimentellen Chirurgie erstellt.

4.3.2.1 Hämatoxylin- Eosin Färbung

Mit den HE Färbungen wurde der im Rahmen der Ischämie entstandene Gewebeschaden untersucht, welcher anhand der Vakuolisierung quantifiziert wurde. Die Messung erfolgte an einem Olympus BX60 Lichtmikroskop, dessen Bilder über eine angeschlossene Digital-Kamera (Zeiss AxioCam HRc, Carl-Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) auf einen PC übertragen wurden. Über das Programm AxioVision (Carl-Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) konnten die Bilder gespeichert und mit einem Maßstab versehen werden. Die Auswertung erfolgte anhand der Zonen nach Rappaport (Rappaport 1958).

Es wurden jeweils 10-20 Gesichtsfelder pro Zone (high power fields = HPF, x40 Objektiv) ausgezählt. Die unterschiedliche Gesichtsfeldanzahl ergab sich durch die verschiedenen Größen der Schnitte und damit dem Vorhandensein der entsprechenden Zone.

In jedem HPF wurde nach Bestimmung der Gesamtzellzahl, die Zahl der Zellen bestimmt, in denen eine Vakuolisierung sichtbar war. Die Anzahl der Zellen wurde in Prozent der Gesamtzellzahl angegeben (siehe Abb. 7).

Zudem wurden die Gallengänge im Speziellen untersucht, um einen eventuellen Einfluss des Modells auf die Gallengänge erfassen zu können. Folgende Parameter wurden hierbei bestimmt:

- Anzahl der Gallengänge
- Durchschnittlicher Flächeninhalt pro Gallengang
- Durchschnittlicher Flächeninhalt pro Glisson- Trias
- Anzahl der Arterien pro Gallengang
- Anzahl der Arterien pro Glisson- Trias

Die Auswertung erfolgte anhand der Bilder, welche zuvor über das AxioVision Programm aufgenommen wurden. Mit Hilfe der Software Cap-Image (Version 6.02, Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) konnten die Parameter bestimmt werden (Klyscz et al. 1997). Bei allen Parametern wurden zehn HPF's der Rappaport Zone I ausgewertet. Der durchschnittliche Flächeninhalt wurde über die Differenz der Außenfläche und Innenfläche gemessen (siehe Abb. 7).

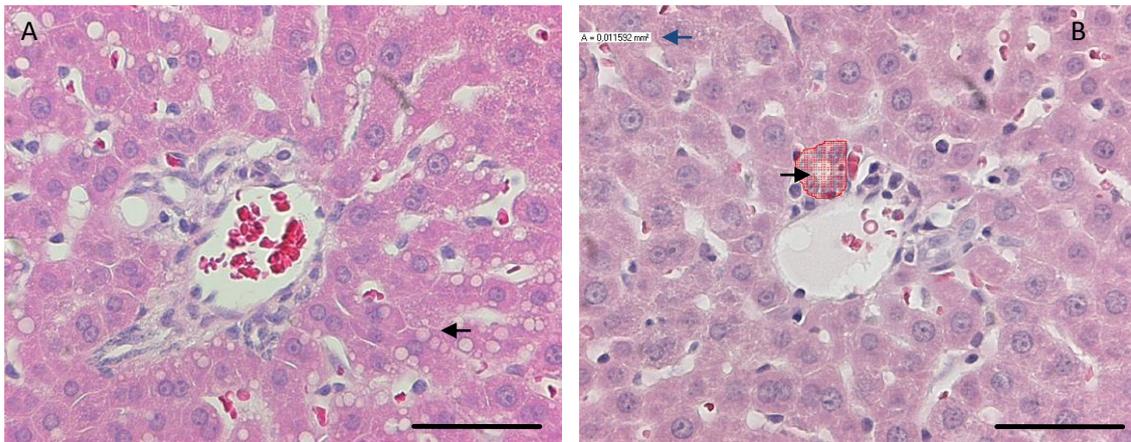


Abbildung 7: HE- Färbung exemplarisch

A: Auswertung der Vakuolisierung, hier Rappaport Zone I an Tag 3 Gruppe E, Vakuole exemplarisch mit schwarzem Pfeil gekennzeichnet. **B:** Bestimmung des Flächeninhaltes eines Gallenganges (blauer Pfeil) und Flächeninhalt (schwarzer Pfeil). Tag 3 Gruppe D. Schwarzer Balken entspricht 50µm.

Die einzelnen Parameter wurden wie folgt berechnet:

Durchschnittlicher Flächeninhalt pro Gallengang =	$\frac{\text{Summe der Flächeninhalte der Gallengänge pro Glisson- Trias in zehn HPF}}{\text{Anzahl der Gallengänge pro Glisson- Trias in zehn HPF}}$
Durchschnittlicher Flächeninhalt pro Glisson- Trias =	$\frac{\text{Summe der Flächeninhalte der Gallengänge pro Glisson- Trias in zehn HPF}}{10}$

Tabelle 3: Berechnung der Gallengangparameter

4.3.2.2 CAE Färbung

Anhand der CAE Färbung wurde die Anzahl der Leukozyten in den drei Zonen nach Rappaport untersucht. Pro Zone wurden jeweils 10-20 high power fields ausgewertet und die Anzahl der CAE- positiven Leukozyten notiert (siehe Abb. 8).

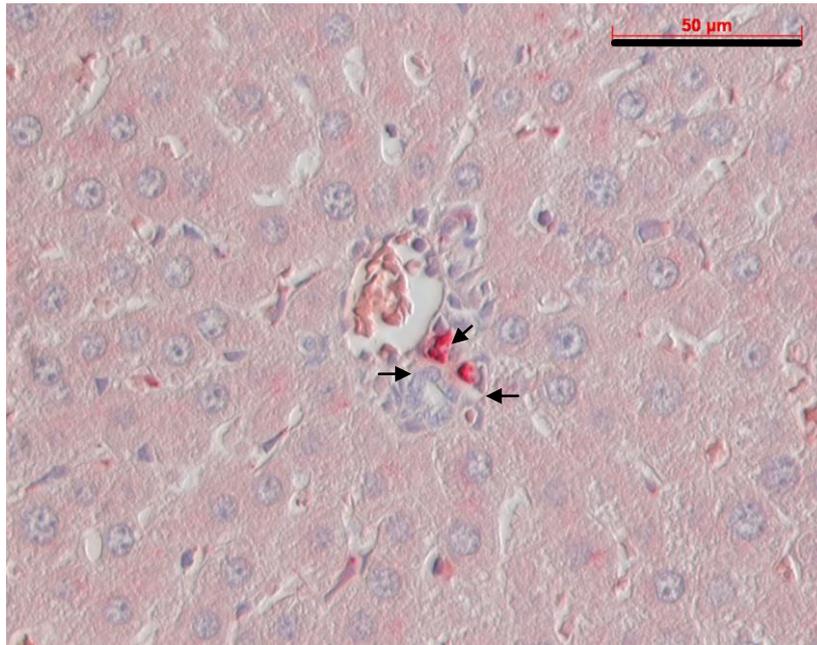


Abbildung 8: CAE- Färbung exemplarisch
CAE-Färbung. Der Schnitt zeigt eine Glissonsche- Trias in Rappaport
Zone I. Die drei Pfeile markieren in der CAE- Färbung rot angefärbte
Leukozyten, welche sich perivascular befinden.

4.3.3 Histologische Analyse - Immunhistologie

Für die immunhistologischen Färbungen wurden zur Bestimmung der proliferativen Aktivität der Leberzellen die PCNA- Färbung (Proliferating cell nuclear antigen) angefertigt.

4.3.3.1 Proliferating cell nuclear antigen Färbung

Für die Färbung wurde die indirekte Immunoperoxidasetechnik verwendet.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden die entparaffinierten Schnitte mit 3%-igem Wasserstoffperoxyd inkubiert, was die endogene Peroxidase außer Kraft setzen soll. Nach Spülung mit PBS (Phosphat buffered saline) wurde das Blockierungsreagenz aufgetragen, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen (1ml PBS und 2% Ziegennormalserum). Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Als Primärantikörper diente ein „mouse anti PCNA“ Antikörper (75μl 1:2000 Verdünnung, Dako Cytomation, Hamburg, Deutschland). Die 3μm dünnen Schnitte wurden mit dem

Antikörper über Nacht mit 1ml PBS (Oxoid, Hampshire, Vereinigtes Königreich) inkubiert. Die anschließende Inkubation erfolgte mit „Ziegen-anti-Maus-Antikörper“ (1:100 Verdünnung, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, USA) für 45 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Als Chromogen wurde 3,3`Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwandt. Folgend wurden die Schnitte mit Hämalaun n. Mayer (VWR, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Nach Spülung, aufsteigender Alkoholreihe und Xylolbad wurden die Schnitte eingedeckt.

Zur Auswertung wurden 20 HPF pro Rappaportzone gezählt. Hierbei wurden sowohl die Gesamtzellzahl als auch die PCNA-positiven Zellen bestimmt und als PCNA-positive Zellen pro HPF angegeben (siehe Abb. 9). Die Untersuchungen erfolgten ebenfalls am Lichtmikroskop. Als Negativkontrolle wurden Schnitte einem IgG Isotyp Antikörper (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, St. Louis, USA) ausgesetzt, um die Spezifität der Antikörperbindung zu bestimmen. Alle Kontrollen waren negativ.

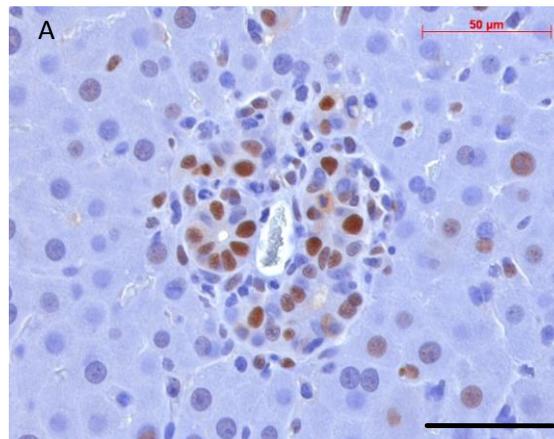


Abbildung 9: PCNA- Färbung

A: *PCNA- Färbung an einem Tier der Gruppe E an Tag 3. Braun angefärbt PCNA-positive Zellen. Schwarzer Balken entspricht 50μm.*

4.3.4 Serologische Parameter

Aus dem gewonnenen Plasma wurden verschiedene Enzymaktivitäten spektrophotometrisch bestimmt (Bergmeyer et al. 1978). Die Aktivitäten der Aspartat-Amino-Transferase (AST = GOT) und Alanin-Amino-Transferase (ALT = GPT) sowie der Laktatdehydrogenase (LDH) wurden bestimmt um eine eventuelle Schädigung der hepatozellulären Integrität festzustellen. Außerdem wurden die Plasmaaktivitäten der alkalischen Phosphatase (AP), der Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT = γ -GT), des direkten Bilirubins = konjugiertes Bilirubin (DB) und des totalen Bilirubins (TB) als Cholestaseparameter bestimmt. Die Untersuchungen wurden durch das Labor der experimentellen Nephrologie durchgeführt.

4.3.5 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden im Institut für Anatomie, Zellbiologie und Entwicklungsbiologie in Auftrag gegeben.

Exemplarisch wurden Proben von zwei Tieren direkt nach dreistündiger Klemmung der *A. hepatica communis* entnommen.

Die Proben wurden in Ito-Karnovsky-Fixans fixiert und vor der Weiterverarbeitung mit 0,1M Cacodylatpuffer gewaschen. Zur Einbettung wurden die Proben in Alkohol entwässert und für die Kunstharzinfiltration zwei mal zehn Minuten in Propylenoxid inkubiert. Die Kunstharzinfiltration erfolgte über zwei Nächte hinweg. Als erster Schritt geschah die Infiltration mit einem Propylenoxid/Epoxidharz-Gemisch (1:1) und darauf folgend eine Infiltration mit Epon C. Nachdem die Proben in Gelatinekapseln mit frischem, entgastem Epon 812-Gemisch eingebettet waren erfolgte die Polymerisation des Kunstharzes bei 60°C für 24 Stunden.

Es wurden Ultradünnschnitte (100nm) mit einem Ultracut UCT (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) mit Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) angefertigt. Nachdem die Schnitte auf Kupfernetze übertragen waren, wurde Uranylacetat und Bleicitrat zur Kontrastierung benutzt und sie wurden luftgetrocknet.

Die Aufnahme der Bilder erfolgte an einem Tecnai BiotwinTM Transmissions-Elektronen-Mikroskop (FEI Company, Eindhoven, Niederlande).

Die Auswertung der Bilder erfolgte durch einen Facharzt für Pathologie (Institut für Allgemeine- und Spezielle- Pathologie, Universitätsklinikum Homburg).

4.3.6 Magnet- Resonanz-Tomographie

Die Tiere der Gruppe A und B (Gruppeneinteilung vgl. Tab. 5) wurden in einem MRT untersucht. Ziel war es, Gallengangsstrikturen festzustellen. Die MRT Untersuchungen erfolgten im Institut für Klinisch- Experimentelle Chirurgie Homburg/Saar. Die Narkoseeinleitung erfolgte wie in 4.2.1.4 beschrieben.

Als MRT- Gerät wurde ein Bruker Biospec Avance III (Bruker Biospin Corporation, Billerica, USA) mit 9,4 Tesla verwendet. Der Durchmesser der inneren Bohrung betrug 200mm und es wurde eine Rattenganzkörperspule (2x Senden, 16x Empfangen) verwendet. Wichtungen sind in Tabelle 4 aufgelistet. Zur Nachbearbeitung wurde das Programm Paravision 5.1 (Bruker Biospin Corporation, Billerica, USA) benutzt. Es wurden Schnitte in allen drei Ebenen erstellt und die Durchmesser des Ductus hepaticus communis vor Operation und nach 30 Tagen gemessen. Außerdem wurden 3D Rekonstruktionen des Gallengangssystems angefertigt.

Sequenz	Schichtdicke	Auflösung (µm)	Field of view	Auflösung (Pixel)
T1-gewichtet	10 * 1mm Abstand: 1mm	156 *156	5cm * 5cm	320 * 320
T2-gewichtet	10 * 1mm Abstand: 1mm	156 * 156	5cm * 5cm	320 * 320

Tabelle 4: MRT Sequenzen

4.4 Versuchsprotokoll

4.4.1 Aufteilung der Tiere

Name	Bezeichnung	Gruppe	Anzahl	Klemmzeit in h
Gruppe I	2h I/R	A	10	2
Gruppe II	2h I/R	B	8	2
Gruppe III	3h I/R	C	28	3
Gruppe IV	HA- Ligation	E	17	Ligatur
Sham Gruppe	Sham	D	24	0

Tabelle 5: Aufteilung der Versuchstiere

Die Gruppen A und B dienten zur Abstimmung des Versuchs. Aufgrund der Ergebnisse konnten wir die optimalen Zeitpunkte für die Histologiegewinnung an den Tagen 3, 7, 14, und 30 festlegen und die Operationsmethode verfeinern. Insgesamt traten sieben Komplikationen auf. Sie umfassten fünf Verletzungen von Gefäßen intraoperativ und zwei Entzündungen der nach Punktion des retrobulbären Plexus. Die Tiere wurden aus dem Versuch genommen.

Tabelle 6 zeigt die Anzahl der in der jeweiligen Gruppe eingeschlossenen Tiere zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten.

Gruppe	24h	3 Tage	7 Tage	14 Tage	30 Tage
Gruppe I	0	0	0	0	8
Gruppe II	2	2	2	2	0
Gruppe III	0	8	5	6	6
Gruppe IV	0	5	3	3	5
Sham Gruppe	0	4	5	5	8

Tabelle 6: Anzahl der in den Versuch eingeschlossenen Tiere

4.4.2 Versuchsablauf

Ziel der Studie war es, die Auswirkung einer Ischämie auf die Gallengänge zu untersuchen.

Hierzu wurden die Tiere randomisiert und in die in Tab. 5 und Tab. 6 aufgelisteten Gruppen eingeteilt. Als Zeitpunkt 0h wurde der Tag der Operation gesetzt. Die Blutentnahme erfolgte nach dem in Abb. 10 dargestellten Schema.

An den jeweiligen Entnahmetagen wurde das Rattengewicht kontrolliert und notiert.

An dem für sie vorgesehenen Tötungstag wurde wie in 4.2.2.3. beschrieben vorgegangen.

Die Proben wurden in die vorbereiteten Asservierungsmedien überführt.

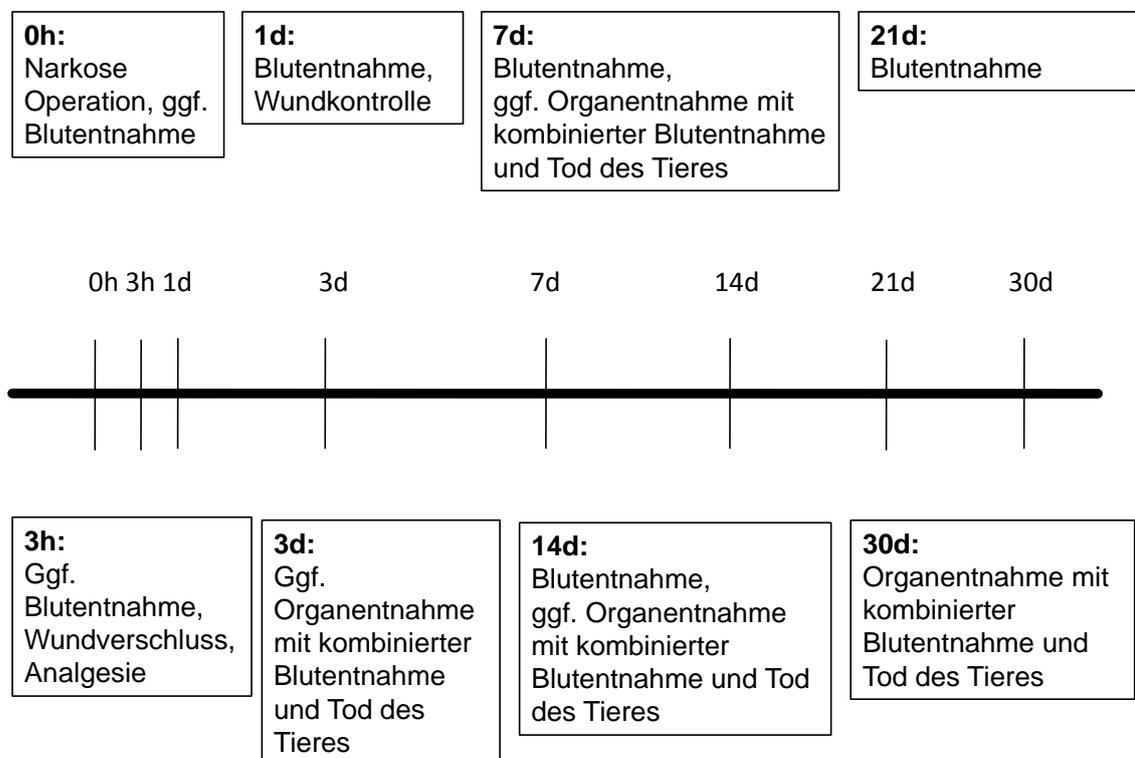


Abbildung 10: Zeitstrahl

4.5 Datenerfassung und Statistik

Alle während der Operation zu erfassenden Daten (Gewicht, OP Zeiten, Gallenfluss, Narkoseart) wurden direkt in ein Operationsprotokoll eingetragen und später in eine Excel Tabelle (Microsoft® Excel 2007, Microsoft Cooperation, USA) übertragen.

Den Blutwerten waren Probennummern zugeordnet. Nach Messung der Parameter wurden die einzelnen Werte den Tieren zugeordnet und ebenfalls in einer Excel Tabelle erfasst.

Die Auswertung der Histologie erfolgte am Computer, die Daten wurden direkt in Tabellen eingetragen und die Bilder auf der Festplatte gespeichert und erfolgten verblindet.

Die in den Western Blots bestimmten densitometrischen Dichten wurden auch über das Tabellenkalkulationsprogramm erfasst.

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme SigmaStat und SigmaPlot (Version 11.2, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) verwendet.

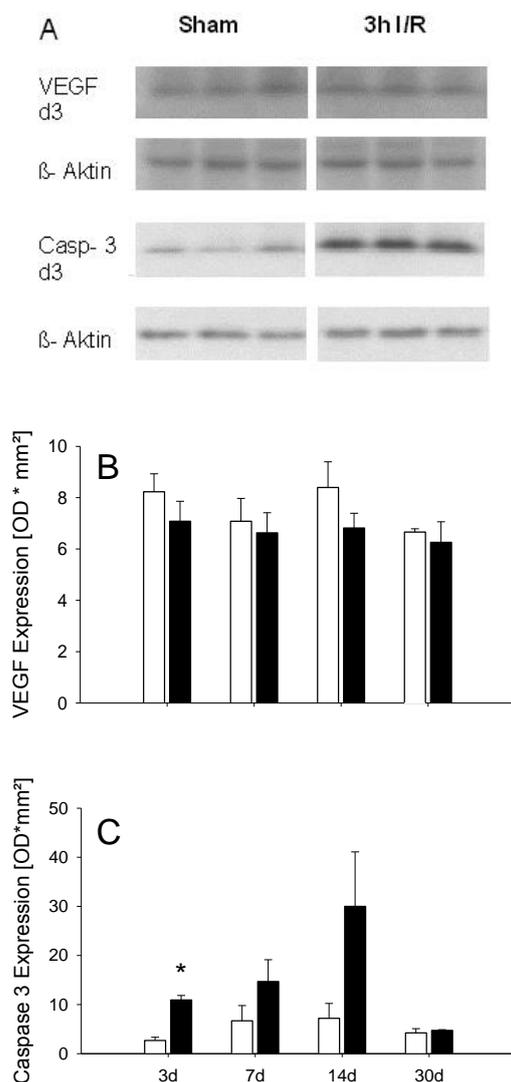
Alle Werte wurden als Mittelwerte angegeben und die Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) wurde berechnet.

Nach dem Test der Normalitäts- und Homogenitäts-Hypothese der Varianz der Gruppen wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen mit ein Student's t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Bei fehlenden Voraussetzungen für diesen wurde ein Rangsummentest für unverbundene Stichproben (Mann Whitney U- Test) durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnissteil A – 3h I/R

5.1.1 Western Blot VEGF und Caspase 3



Die Western Blot Resultate zeigen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der VEGF Expression zu den untersuchten Zeitpunkten (Abb. 11B).

Hinsichtlich des Zelltodes, gemessen an der Caspase 3 Expression, zeigt sich eine signifikante Erhöhung drei Tage nach Klemmung (Abb. 11C).

Im weiteren Verlauf besteht eine Tendenz zu vermehrter Caspaseexpression in der 3h I/R Gruppe, welche jedoch zu keinem weiteren Zeitpunkt signifikant ist und sich an Tag 30 angleicht.

Abb. 11A zeigt die entsprechenden Banden von Caspase 3 und VEGF an Tag drei mit den dazugehörigen Kontrollen.

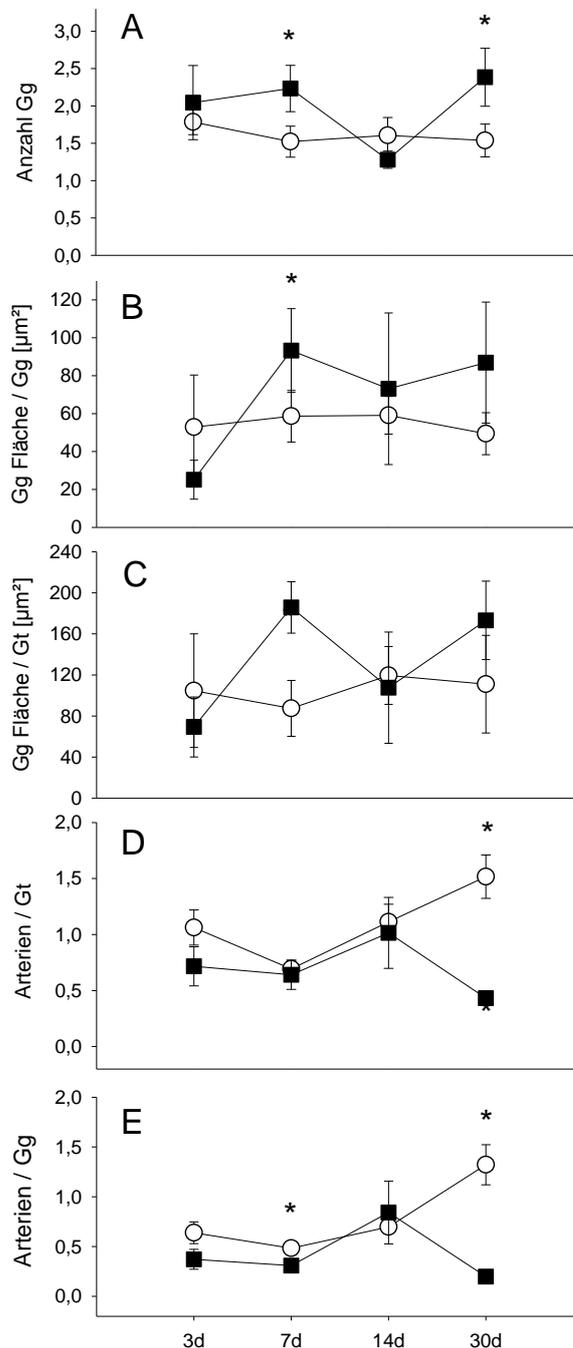
Abbildung 11: Western Blot Ergebnisse 3h I/R

○ Sham Gruppe ■ 3h I/R beide mit SEM

* $p < 0,05$ Sham vs. 3hI/R.

5.1.2 Standardfärbungen

5.1.2.1 Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl

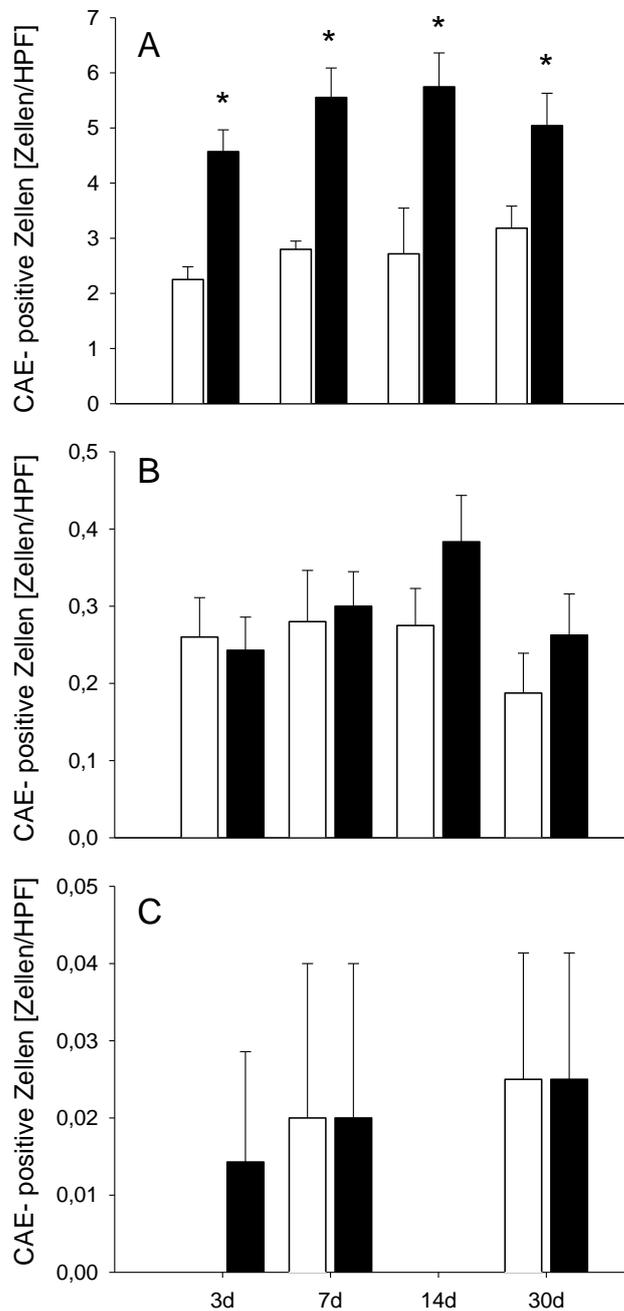


Im Verlauf des Versuches kommt es zu einer Zunahme der Anzahl der Gallengänge (Gg) in der 3h I/R Gruppe mit einem Maximum an Tag 30. An Tag 14 zeigt sich, am ehesten durch einen Ausreißer bedingt, ein Abfall (Abb. 12A). Die Gallengangsflächen verhalten sich hierbei analog, mit signifikant erhöhtem Lumen pro Gallengang an Tag drei in der 3h I/R Gruppe (Abb. 12B und C).

Die Anzahl der Arterien nimmt entgegengesetzt zu den Gallengängen im Verlauf der Beobachtungsperiode ab. Sowohl die Anzahl der Arterien pro Glissonscher- Trias (Gt), als auch die Anzahl der Arterien pro Gallengang. Nach 30 Tagen zeigt sich der Nadir mit 0,19 Arterien pro Gallengang hoch signifikant (Abb. 12D und E).

Abbildung 12: Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl in 3h I/R
 O Sham Gruppe ■ 3h I/R beide mit SEM. * $p < 0,05$ Sham vs. 3hI/R.

5.1.2.2 CAE



Inflammation, gemessen in Form von Leukozyteninvasion in das Gewebe, spielt sich vor allem in Rappaport Zone I ab. Hier kommt es vor allem an Tag sieben und 14 zu einer Verdopplung der Leukozyten nach drei Stunden Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu Sham. An allen Messpunkten sind die Unterschiede signifikant (Abb. 13A). In Rappaport Zone II (Abb. 13B) und III (Abb. 13C) zeigt sich nur eine geringe Anzahl an Leukozyten, welche im Vergleich zur Sham Gruppe nicht signifikant abweicht. Abb. 14 zeigt repräsentative Schnitte.

Abbildung 13: CAE Ergebnisse 3h I/R O Sham Gruppe

■ 3h I/R beide mit SEM. * $p < 0,05$ Sham vs. 3h I/R.

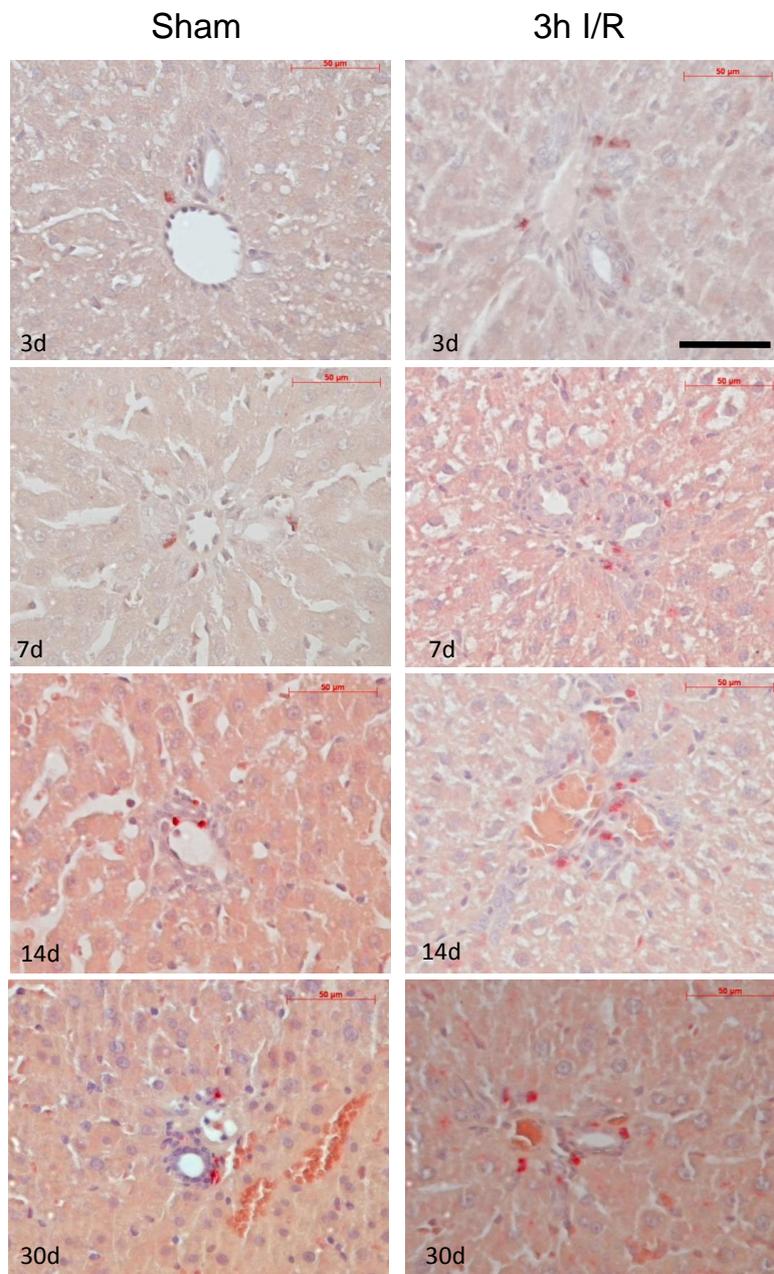


Abbildung 14: CAE-positive Zellen Histologie in RPP I
(Balken entspricht 50 µm)

5.1.3 PCNA

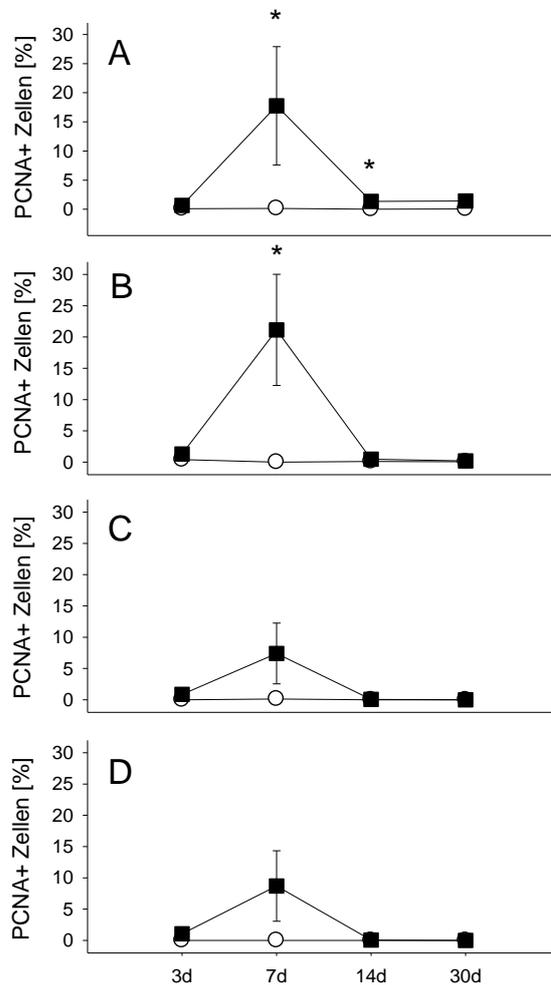


Abbildung 15: PCNA-positive Zellen 3h I/R

O Sham Gruppe ■ 3h I/R beide mit SEM.

* $p < 0,05$ Sham vs. 3hI/R.

PCNA- positive Zellen, welche Proliferation und damit Zellregeneration anzeigen finden sich an Tag sieben homogen erhöht in allen Rappaport Zonen. Hierbei zeigt sich eine signifikant erhöhte Proliferation sowohl im Bereich der Epithelzellen in Rappaport Zone I (Abb. 15A), als auch in den Hepatozyten (Abb. 15B).

Im Bereich von Zone II (Abb. 15C) und III (Abb. 15D) zeigt sich dieser Trend ebenfalls, allerdings ohne signifikante Erhöhung.

Bis Tag 30 gleichen sich die Werte in allen Zonen wieder an die der Sham Gruppe an.

Abb. 16 zeigt repräsentative Schnitte.

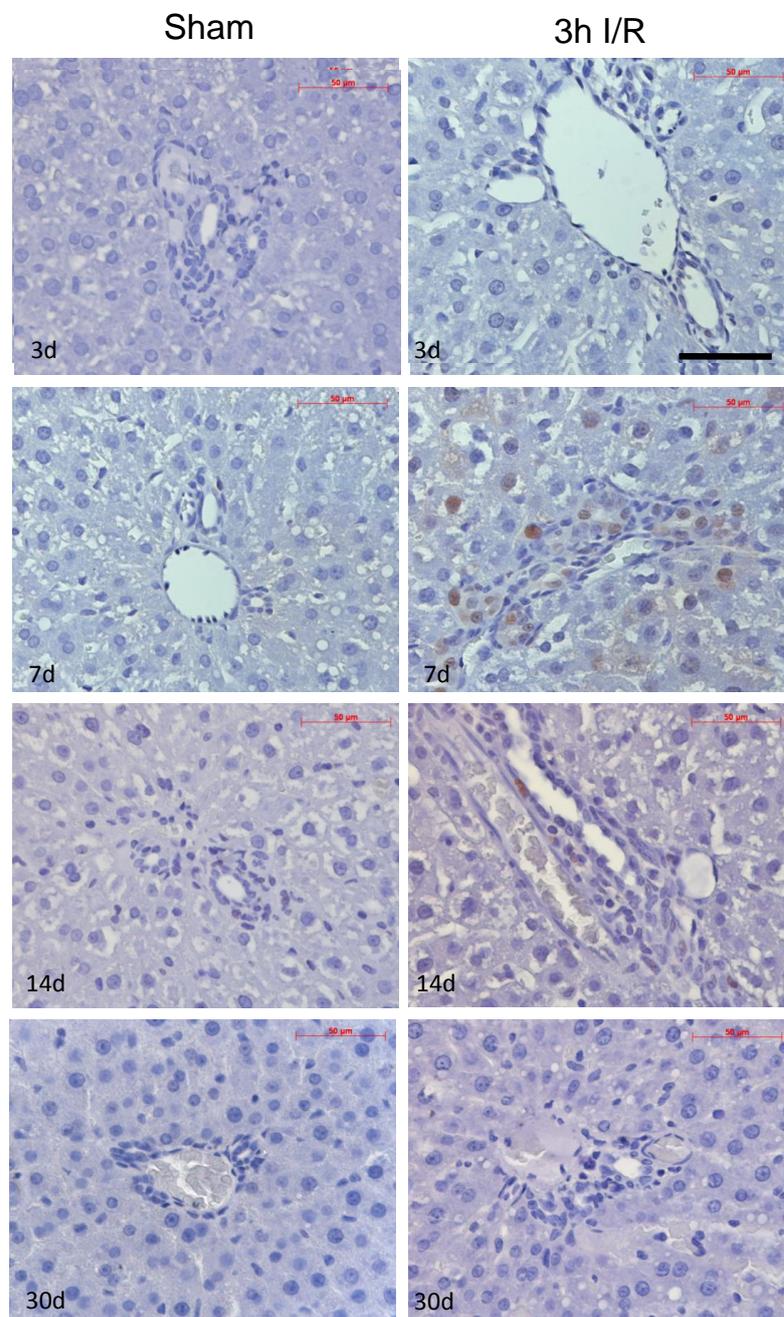
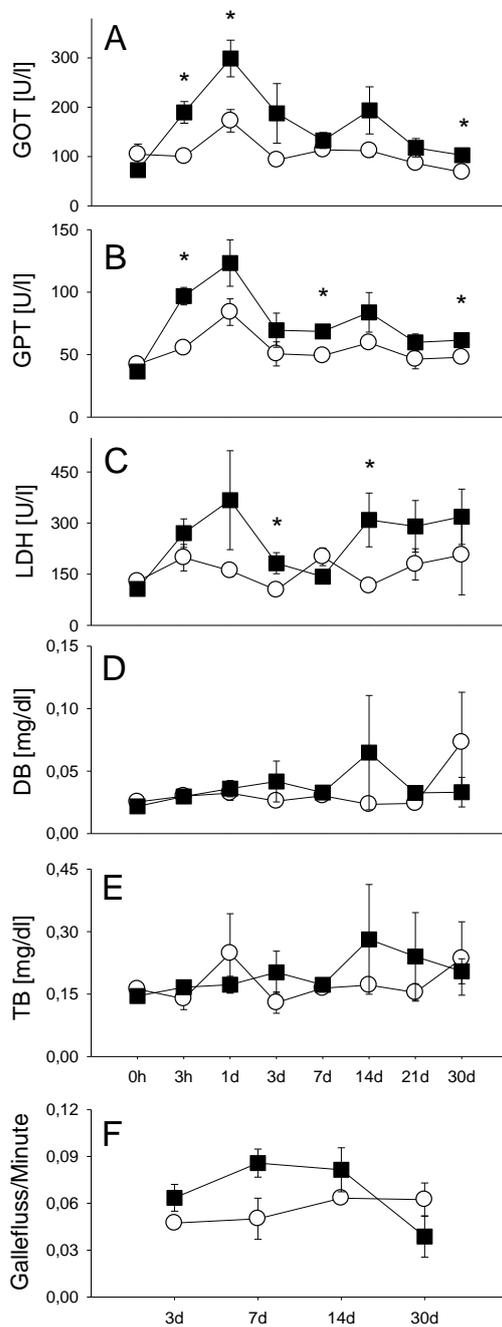


Abbildung 16: PCNA positive Zellen Histologie 3h I/R
Balken entspricht 50 µm

5.1.4 Serologische Parameter



Die Transaminasen zeigen eine signifikante Erhöhung bereits nach drei Stunden Klemmung und erreichen innerhalb der nächsten 24h ihr Maximum. Im Verlauf kommt es zu einem Abfall von GOT und GPT bis zu Tag 30, jedoch besteht weiterhin ein signifikanter Unterschied (Abb. 17A und B).

LDH als unspezifischer Marker für Ischämie zeigt sich in der 3h I/R Gruppe tendenziell erhöht mit einem signifikanten Unterschied an Tag 7 und 21 (Abb. 17C).

Die Werte von direktem (DB) und totalem (TB) Bilirubin zeigen im Vergleich zur Sham Gruppe keinen Unterschied im beobachteten Intervall (Abb. 17D und E).

Im Gallefluss/Minute (gemessen in mg/min/g Rattengewicht) zeigt sich eine nicht signifikante Erhöhung in den ersten 14 Tagen nach Klemmung. An Tag 30 haben sich beide Gruppen wieder angeglichen (Abb. 17F).

Abbildung 17: Serumparameter und Gallefluss

O Sham Gruppe ■ 3h I/R beide mit SEM.

* $p < 0,05$ Sham vs. 3h I/R.

5.1.5 Elektronenmikroskopie

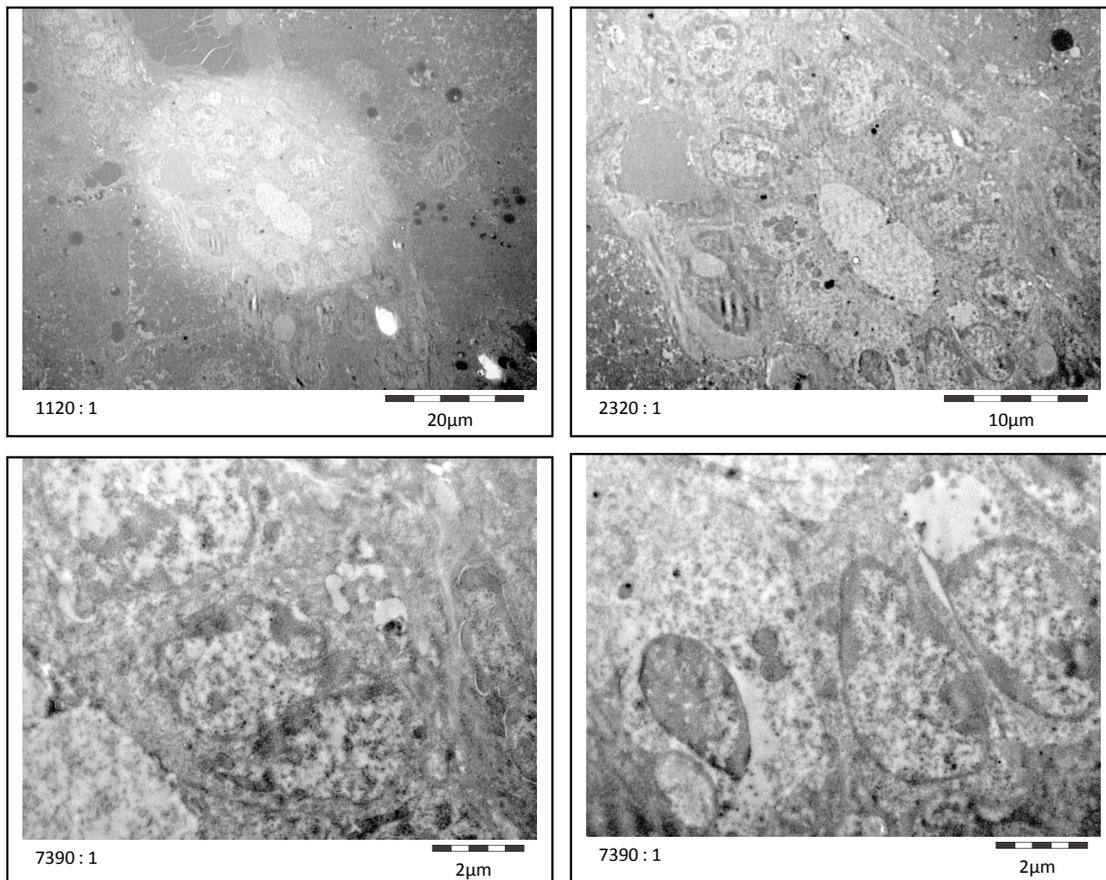


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Untersuchung 3h I/R

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden durch einen Facharzt für Pathologie befundet. Dieser konnte keine Schäden im Bereich der Gallengangsepithelien nach drei Stunden Klemmung und Reperfusion feststellen. Auch in der weiteren lichtmikroskopischen Durchschau konnten keine Schäden festgestellt werden. Repräsentative Aufnahmen zeigt Abb. 18.

5.1.6 MRT Untersuchungen

Die hier dargestellten MRT Befunde zeigen Tiere der Gruppe A mit zwei Stunden Ischämie- Reperfusion. Exemplarisch sind transversale Schnitte und eine MRCP-Rekonstruktion dargestellt. In der Durchsicht, unterstützt von einem Facharzt für Radiologie, konnten an den sichtbaren Gallengängen keine Strikturen nach 30 Tagen nachgewiesen werden. Allerdings ist die Auflösung des MRT's zu gering um Gallengänge

kleinerer Ordnung darzustellen, weshalb auf die Durchführung der MRT Diagnostik im weiteren Versuch verzichtet wurde. Im Folgenden sind Aufnahmen eines Tieres zu sehen. Abbildung 19 zeigt transversale Schnitte T2 gewichtet vor einer zweistündigen Klemmung. Abbildung 20 zeigt ebenfalls transversale Schnitte in T2 Wichtung 30 Tage nach einer zweistündigen Klemmung. So konnten die Gallengänge direkt miteinander verglichen werden.

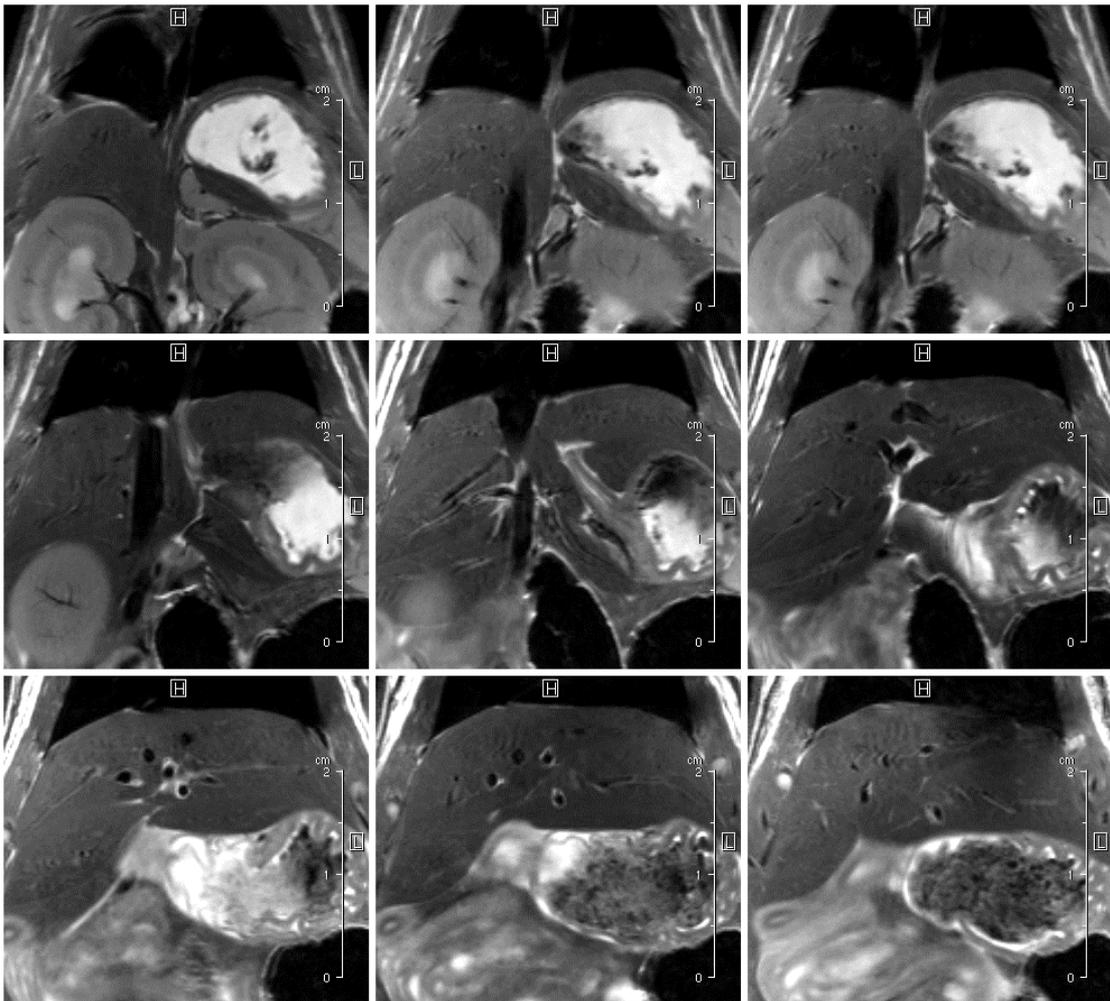


Abbildung 19: MRT transversal vor Klemmung

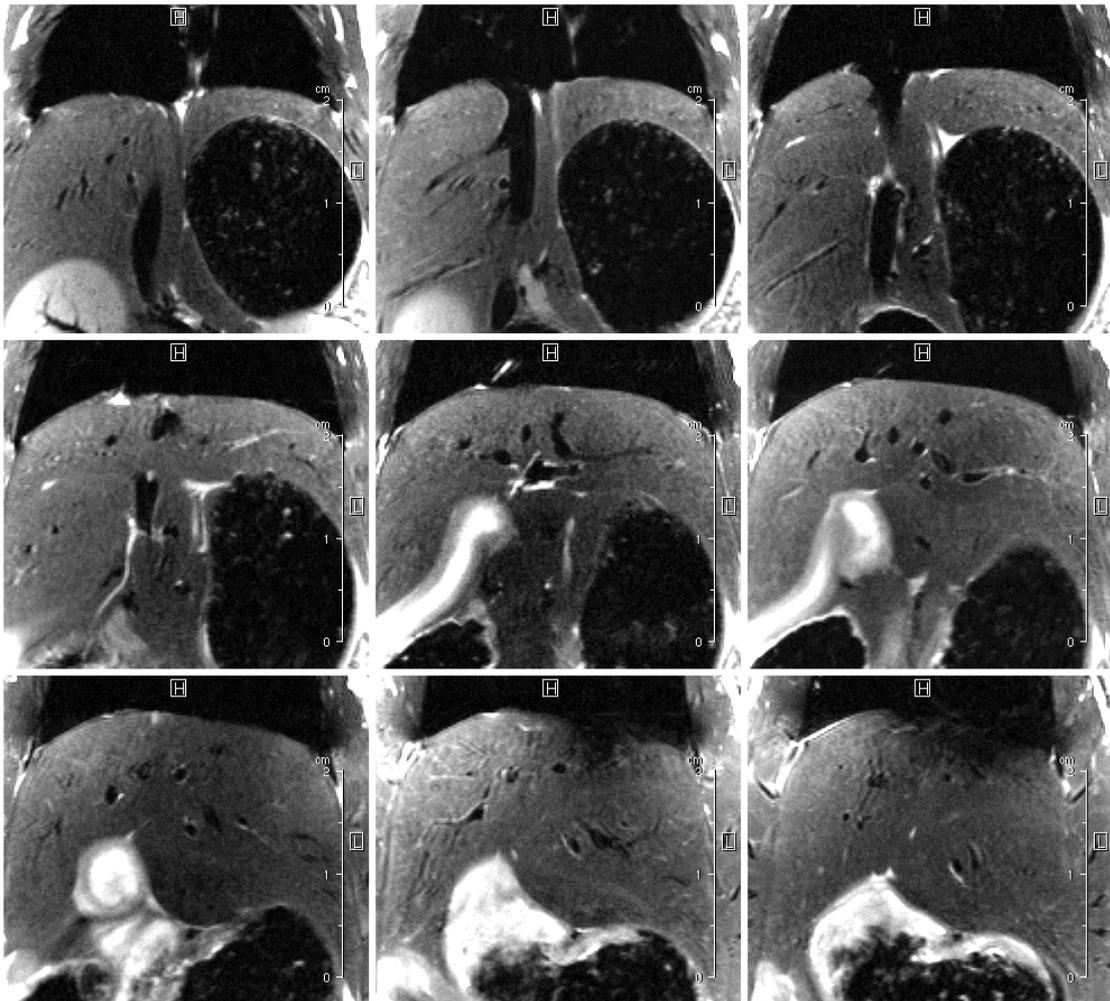
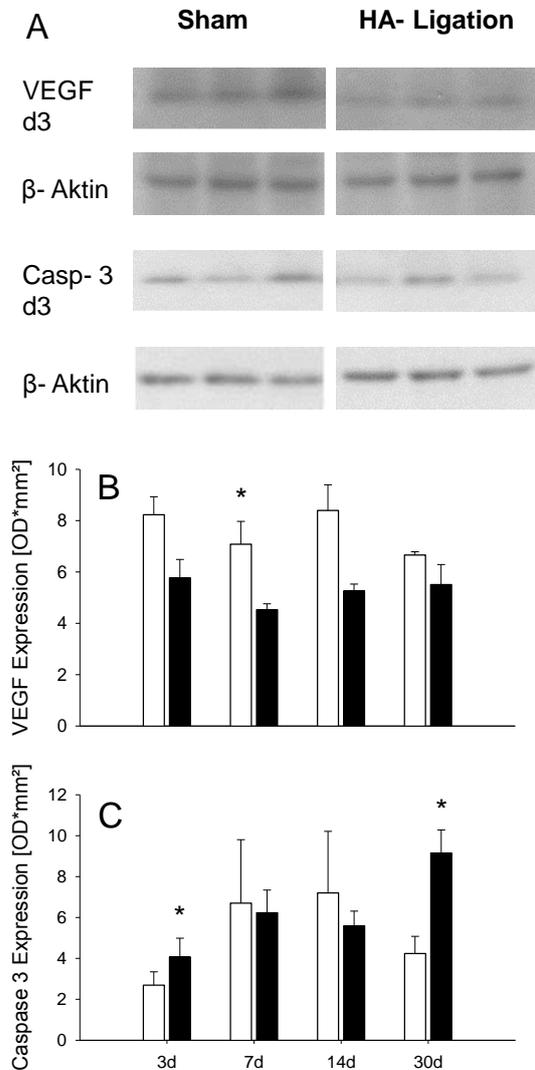


Abbildung 20: MRT transversal nach zweistündiger Klemmung an Tag 30

5.2 Ergebnissteil B – HA Ligatur

5.2.1 Western Blot VEGF und Caspase 3



Die VEGF Expression zeigt sich in der Sham Gruppe zu allen Untersuchungszeitpunkten gegenüber Gruppe E (Ligatur der Leberarterie) erhöht. An Tag sieben ist dieser Unterschied signifikant (Abb. 21B).

Nach drei und 30 Tagen zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression von Caspase 3 in der Ligaturgruppe. Zu den anderen Untersuchungszeitpunkten besteht kein Unterschied bezüglich der Apoptose in den beiden Gruppen (Abb. 21C).

Abb. 21A zeigt die entsprechenden Banden von Caspase 3 und VEGF an Tag drei mit den dazugehörigen Kontrollen.

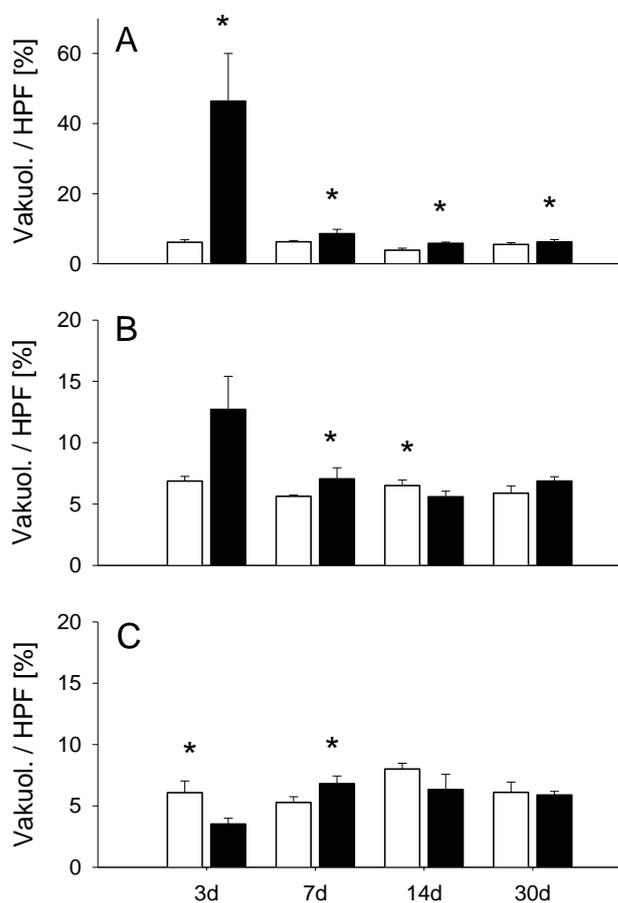
Abbildung 21: Western Blot Ergebnisse

○ Sham Gruppe ■ HA Ligatur beide mit SEM.

* $p < 0,05$ Sham vs. HA Ligatur.

5.2.2 Standardfärbungen

5.2.2.1 Vakuolisierung



Die Auswertung der Vakuolisierung (Vakuol.) pro HPF zeigt eine signifikante Erhöhung in Rappaport Zone I (Abb. 22A) zu allen vier Untersuchungszeitpunkten. In den Zonen II (Abb. 22B) und III (Abb. 22C) zeigt sich hierbei ein weniger homogenes Bild des Zellschadens in Form von Vakuolisierung unter 25%.

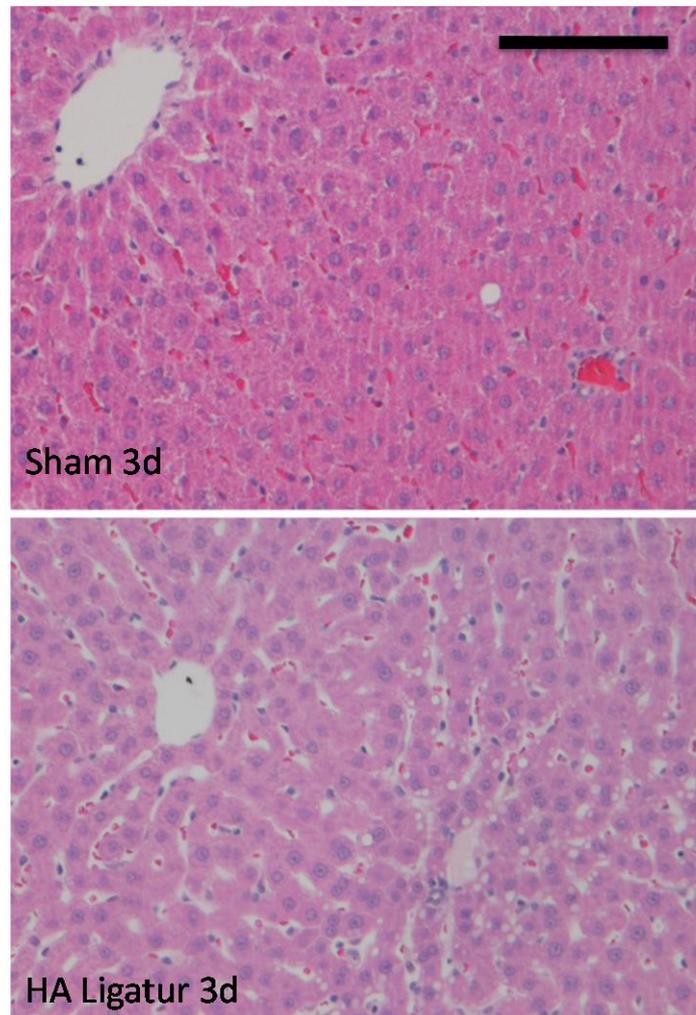
Einzig an Tag 3 in Rappaport Zone I zeigt sich ein schwerer Zellschaden mit durchschnittlich 46% vakuolisierten Zellen.

Entsprechende Schnitte zeigt Abb. 23.

Abbildung 22: Vakuolisierung

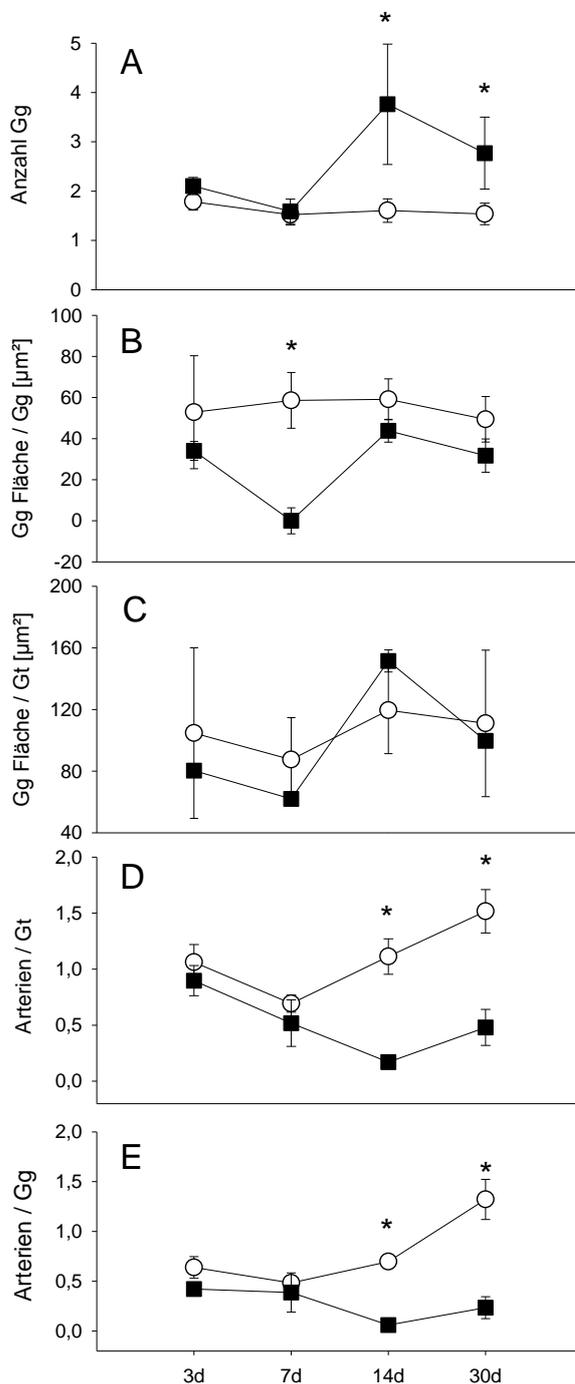
○ Sham Gruppe ■ HA Ligatur beide mit SEM.

* $p < 0,05$ Sham vs. HA Ligatur.



*Abbildung 23: Vakuolisierung
Histologie an Tag 3 (Balken entspricht 100 μ m)*

5.2.2.2 Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl



Durch eine dauerhafte Ligatur der Leberarterie nimmt die Anzahl der Gallengänge im Verlauf des Versuches an Tag 14 und 30 signifikant gegenüber der Sham Gruppe zu (Abb. 24A).

Diese Zunahme korreliert jedoch nicht mit der Fläche der einzelnen Gallengänge oder der Gesamtfläche pro Glissonscher- Trias. Die Durchmesser der Gallengänge sind im Vergleich zur Sham Gruppe kleiner (Abb. 24B), durch die Zunahme zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Gesamtfläche pro Glisson- Trias (Abb. 24C).

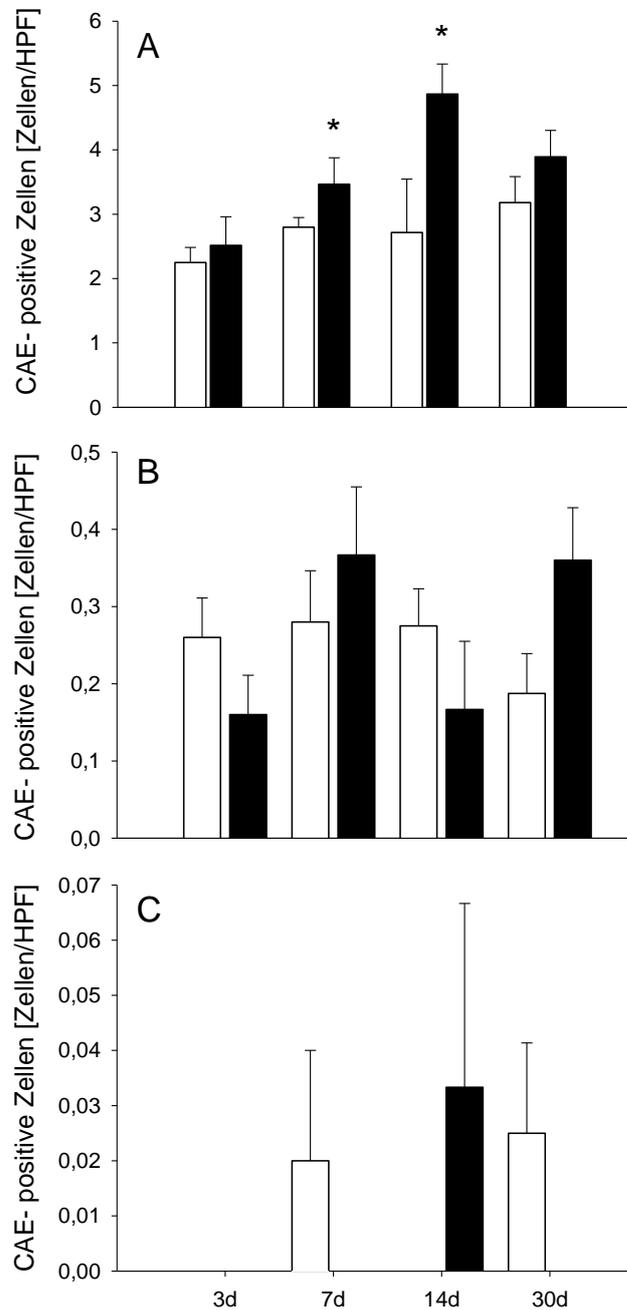
Wie schon bei der Klemmung beobachtet, nimmt die Anzahl der Arterien nach Ligatur ab und zeigt sich an Tag 14 und 30 signifikant gegenüber Sham erniedrigt (Abb. 24D und E).

Abbildung 24: Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl

O Sham Gruppe ■ HA Ligatur beide mit SEM.

* $p < 0,05$ Sham vs. HA Ligatur.

5.2.2.3 CAE



Die meisten CAE- positiven Zellen finden sich in Rappaport Zone I. Hier finden sich nach Ligatur vermehrt Leukozyten im Vergleich zu Sham. An den Tagen sieben und 14 ist der Unterschied signifikant und äußert sich am Tag 14 sogar mit einer Verdopplung gegenüber der Sham Gruppe (Abb. 25A).

In Rappaport Zone II (Abb. 25B) und Zone III (Abb. 25C) finden sich nur wenige CAE- positive Zellen und es besteht kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Zur Veranschaulichung dient Abb. 26.

Abbildung 25: CAE- positive Zellen

○ Sham Gruppe ■ HA Ligatur beide mit SEM.

* $p < 0,05$ Sham vs. HA Ligatur.

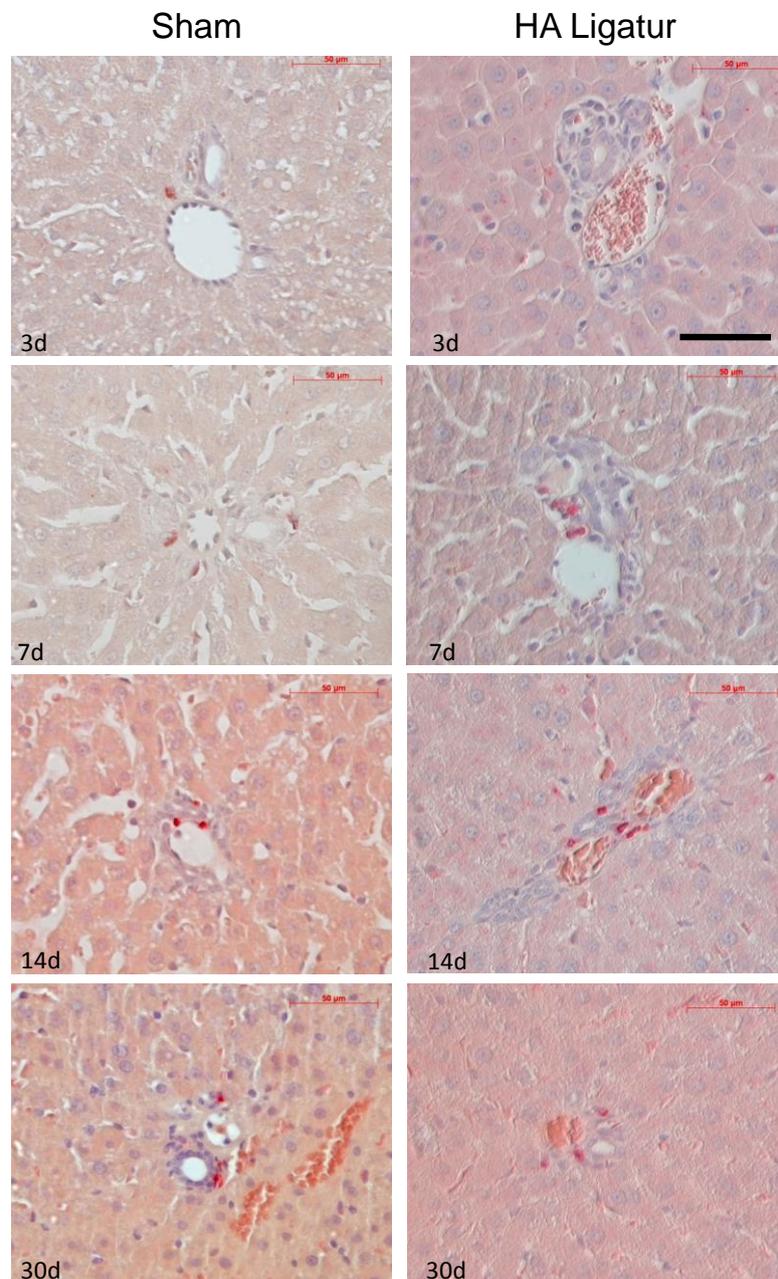


Abbildung 26: CAE- positive Zellen Histologie in RPP I
(Balken entspricht 50μm)

5.2.3 PCNA

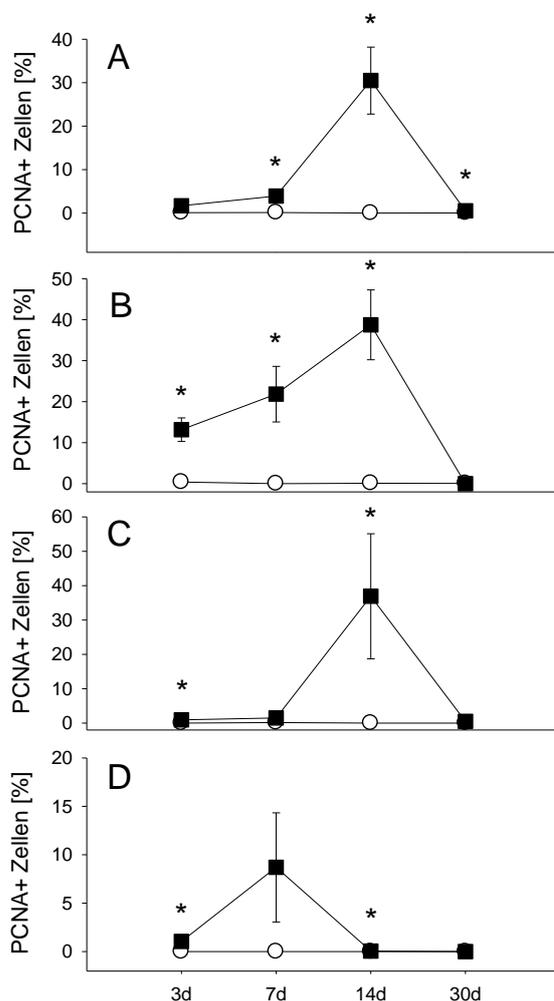


Abbildung 27: PCNA Färbung

O Sham Gruppe ■ HA Ligatur beide mit SEM.

* $p < 0,05$ Sham vs. HA Ligatur.

Betrachtet man die Anzahl der PCNA-positiven Zellen, zeigt sich ein Maximum der Proliferation am Tag 14 nach Ligatur. Signifikante Unterschiede zeigen sich in Rappaport Zone I im Bereich der Epithelzellen (Abb. 27A) sowie in Rappaport Zone I im Bereich der Hepatozyten (Abb. 27B). Hierbei scheinen die Hepatozyten vulnerabler auf den Perfusionsverlust zu reagieren.

Auch in Rappaport Zone II (Abb. 27C) und III (Abb. 27D) zeigt sich ein Maximum an Regeneration an Tag 14 in Zone II bzw. Tag sieben in Zone III.

Abb. 28 zeigt die dazugehörigen Schnitte.

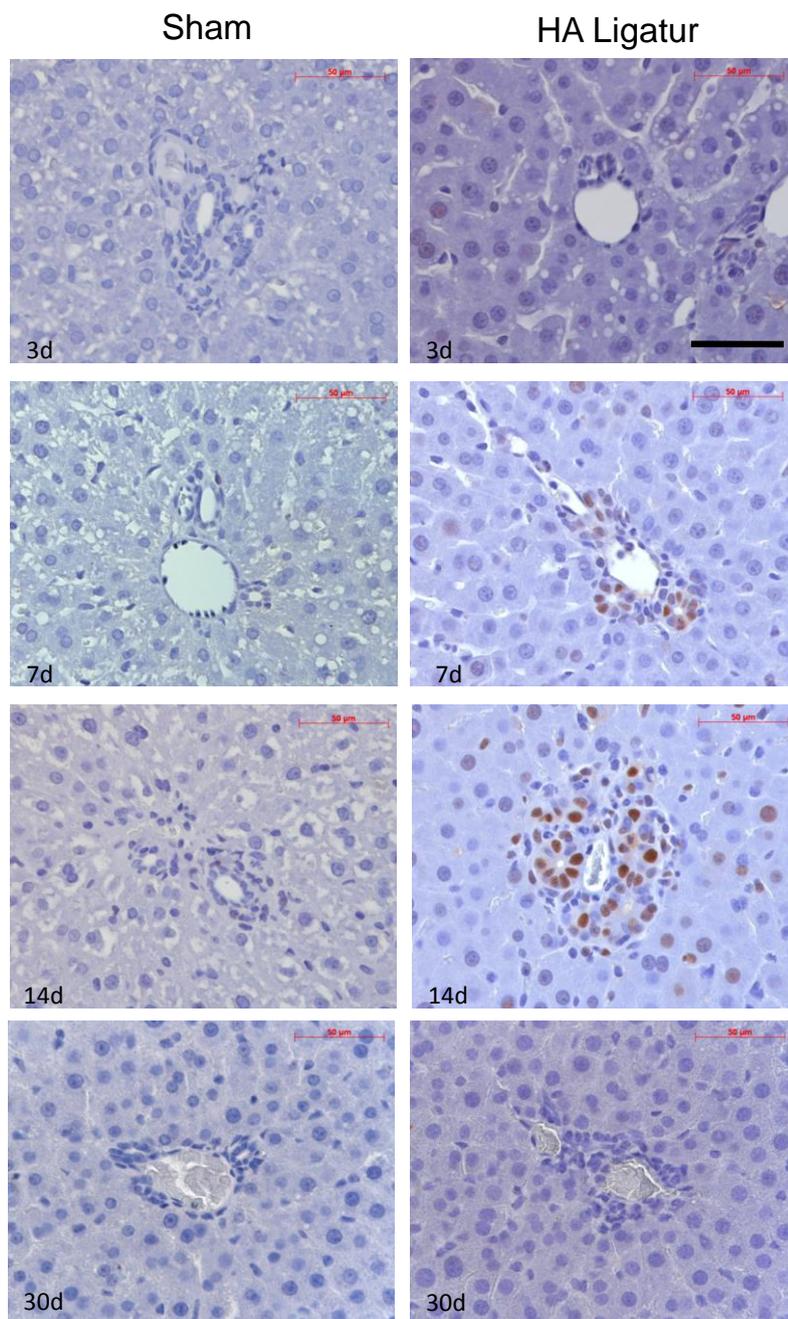
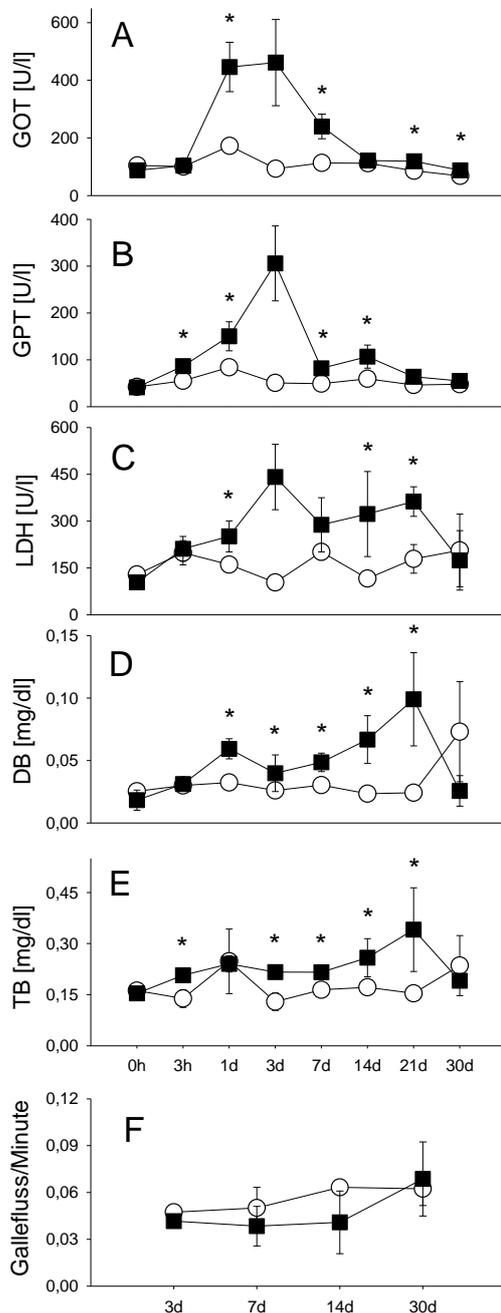


Abbildung 28: PCNA Histologie in RPP1
(Balken entspricht 50 µm)

5.2.4 Serologische Parameter und Gallefluss



Die serologischen Untersuchungen zeigen einen signifikanten Anstieg der Lebertransaminasen bereits nach drei Stunden nach Ligatur mit Maximum nach drei Tagen. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Absinken der Parameter bis zu Tag 30 (Abb. 29A, B).

LDH, als allgemeiner Marker für Ischämie bleibt bis zu Tag 21 signifikant erhöht und sinkt dann zum Ende des Beobachtungszeitraumes auf Sham-Niveau (Abb. 29C).

Direktes Bilirubin (DB) und totales Bilirubin (TB) sind ebenfalls über einen langen Zeitraum der Untersuchung signifikant erhöht. Das Maximum befindet sich an Tag 21. Bis zu Tag 30 fallen die Werte jedoch wieder auf das Niveau der Sham Gruppe ab (Abb. 29D und E).

Im Gallefluss zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Verlauf (Gallefluss in mg/min/g Rattengewicht) Abb. 29F.

Abbildung 29: Serologische Parameter und Gallenfluss

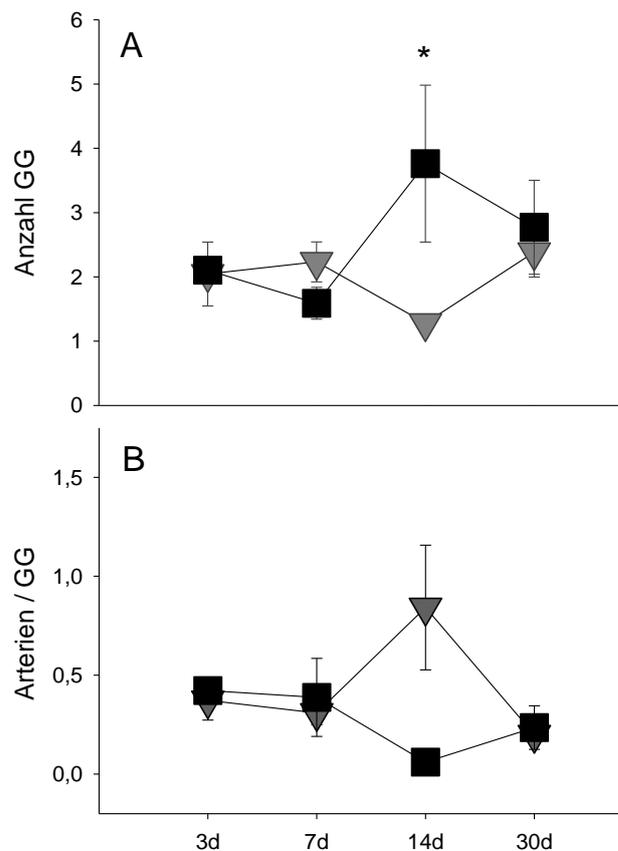
O Sham Gruppe ■ HA Ligatur beide mit SEM.

* $p < 0,05$ Sham vs. HA Ligatur.

5.3 Ergebnissteil C - Vergleich 3h I/R und HA-Ligatur

In diesem Abschnitt werden die wichtigsten Parameter dargestellt.

5.3.1 Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl



Der direkte Vergleich der Anzahl der Gallengänge (Abb. 30A) zeigt in beiden Gruppen einen Anstieg im Verlauf der Beobachtungsperiode. In der Ligaturgruppe zeigt sich das Maximum der Gallengänge bereits am Tag 14 mit einem signifikanten Unterschied an Tag 14.

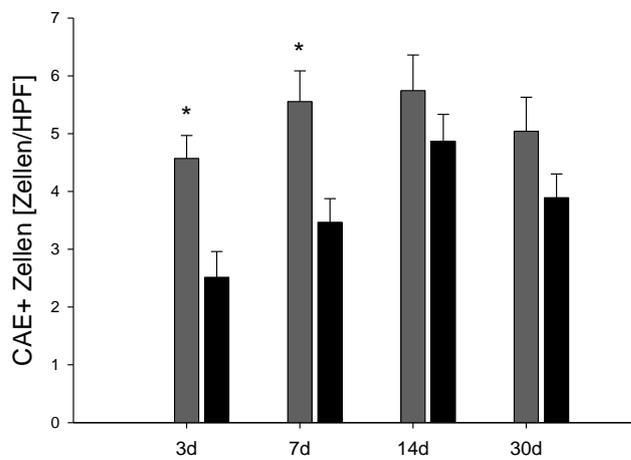
Hinsichtlich der Arterien pro Gallengang zeigen beide Gruppen einen Rückgang bis Tag 30. Hier kann in der Ligaturgruppe ein starker Abfall zwischen Tag sieben und 14 beobachtet werden (Abb. 30B).

Abbildung 30: Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl im Vergleich

▼ 3h I/R Gruppe ■ HA Ligatur alle mit SEM.

* $p < 0,05$ 3hI/R vs. HA Ligatur.

5.3.2 CAE



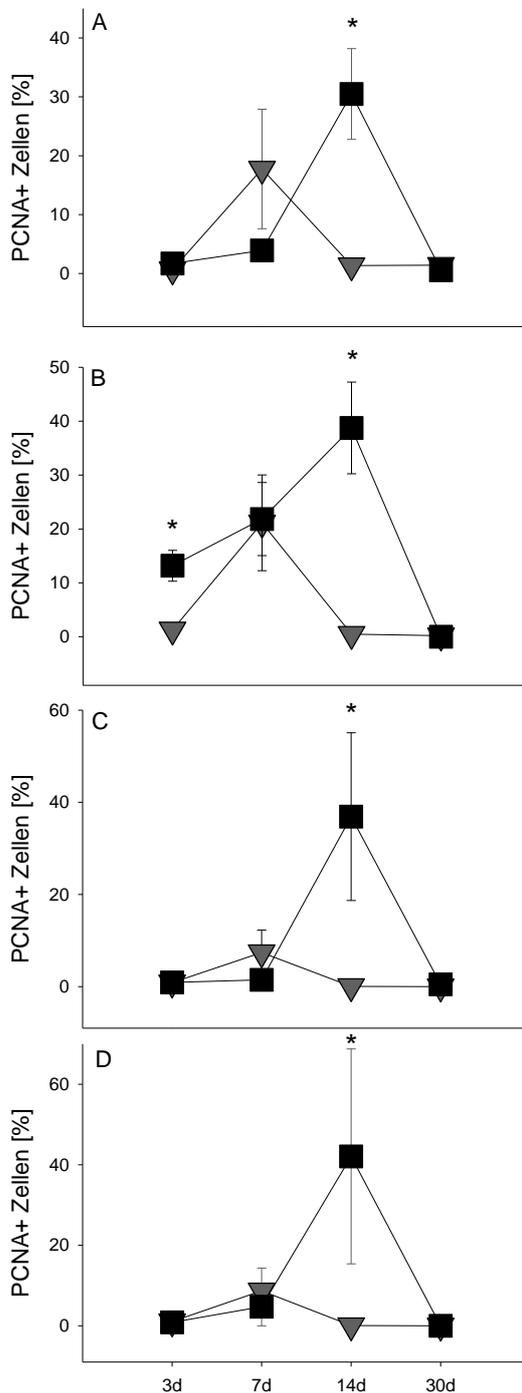
Der direkte Vergleich der Gruppen 3h I/R und HA Ligatur zeigt eine signifikante Erhöhung der Leukozytenzahl nach dreistündiger Klemmung in Rappaport Zone I an Tag drei und sieben im Vergleich zur Ligatur. An Tag 14 und 30 setzt sich dieser Trend, wenn auch nicht signifikant, fort (Abb. 31).

Abbildung 31: CAE Ergebnisse im Vergleich

■ 3h I/R Gruppe ■ HA Ligatur alle mit SEM.

* $p < 0,05$ 3h I/R vs. HA Ligatur.

5.3.3 Immunhistochemie im Vergleich



Der Vergleich der Proliferation und damit Zellregeneration zeigt einen Anstieg der PCNA- positiven Zellen in der HA Ligatur Gruppe von Tag 3 bis Tag 14 im Bereich der Epithelzellen in Rappaport Zone I. In der 3h I/R Gruppe zeigt sich dieser Anstieg weniger stark und hat sein Maximum an Tag sieben (Abb. 32B). Hierbei besteht eine signifikante Erhöhung in der HA Ligatur Gruppe gegenüber der 3h I/R Gruppe an Tag 14.

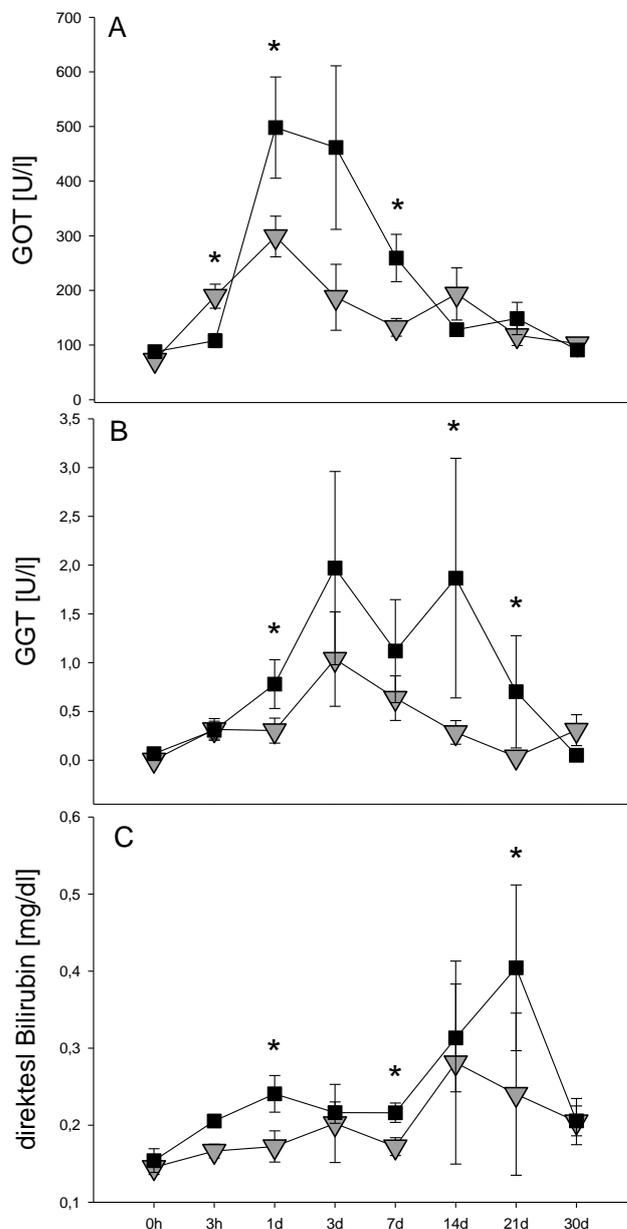
Dies zeigt sich gleichförmig auch im Bereich der Epithelzellen in Rappaport Zone I (Abb. 32A) und in Rappaport Zone II (Abb. 32C) und III (Abb. 32D). An Tag 30 hat sich die Anzahl an PCNA- positiven Zellen beiden Gruppen wieder angeglichen.

Abbildung 32: PCNA- positive Zellen im Vergleich

▼ 3h I/R Gruppe ■ HA Ligatur alle mit SEM

* $p < 0,05$ 3h I/R vs. HA Ligatur.

5.3.4 Serologische Parameter im Vergleich



In beiden Gruppen zeigt sich ein Anstieg der GOT, der γ -GT und des Bilirubins im Verlauf des Versuches mit Rückgang auf Ausgangsniveau nach 30 Tagen. Hierbei scheinen die Transaminasen nach dreistündiger Klemmung und Reperfusion früher anzusteigen, was sich an dem signifikanten Unterschied nach drei Stunden zeigt (Abb. 33A). Das Maximum der Transaminasen nach Ligatur liegt zwischen Tag eins und 14 mit einem weitaus größeren Anstieg als in der 3h I/R Gruppe. Es fällt auf, dass die Werte große Streubreiten aufweisen, weshalb dieser Unterschied nur an einigen Tagen signifikant ist (Abb. 33A).

Die Cholestase anzeigenden Parameter GGT und direktes Bilirubin zeigen einen ähnlichen Verlauf, bleiben jedoch deutlich länger, bis Tag 21, erhöht um dann abzufallen. Der Anstieg nach Ligatur verhält sich zeitlich gesehen gleich zu dem der 3h I/R zeigt jedoch deutlich erhöhte Werte mit signifikanten Unterschieden zu 3h I/R (Abb. 33B und C).

Abbildung 33: Serologische Parameter im Vergleich

▼ 3h I/R Gruppe ■ HA Ligatur alle mit SEM. * $p < 0,05$ 3h I/R vs. HA Ligatur.

6 Diskussion

Das wesentliche Ergebnis der vorliegenden Studie ist der Nachweis morphologischer Veränderungen auf die Strukturen der Glissonschen- Trias bei arterieller Klemmung bzw. Ligatur der Leberarterie der Ratte. Wir konnten eine signifikante Zunahme der Gallengangsanzahl nach 30 Tagen bei einer signifikanten Abnahme der Arterienanzahl pro Gallengang nachweisen. Durch Prozesse, ausgelöst durch Ischämie und stärker noch durch einen Ischämie-Reperfusionsschaden, kommt es zu Zelltod, vor allem in Zone I nach Rappaport. Nachfolgend setzen Reparaturmechanismen des Körpers ein und zeigen eine signifikante Leukozyteninfiltration sowohl in der Klemm- als auch in der Ligaturgruppe, begleitet von einem Regenerationsreiz. Passager kommt es hierbei zu einer Transaminasenerhöhung und Erhöhung des Bilirubins. Durch bestimmte Prozesse, welche im Anschluss erörtert werden sollen, kommt es zur Regeneration bei veränderter Lebermorphologie. Trotz diesen Veränderungen konnten keine direkten Schäden der Gallengänge oder gar Strikturen nachgewiesen werden. Ein Modell zur ITBL an der Ratte, mit den dafür typischen Strukturen, konnte somit nicht vollständig simuliert werden.

6.1 Diskussion des Modells

In dieser Studie wurde bewusst ein Rattenmodell gewählt. Durch die weite Verbreitung von tierexperimentellen Modellen an der Ratte kann man auf eine Vielzahl an Daten zurückgreifen (Aller et al. 2012). Die Ratte ist zudem extrem widerstandsfähig und kann bauchchirurgische Eingriffe ohne größere Komplikationen überstehen. So sind zum Beispiel Leberinfektionen der Ratte nach Laparotomien unbekannt (von Haller 1978). Hierdurch wird gewährleistet, dass die Beobachtungen nicht durch Co-Faktoren beeinflusst werden.

Ziel der Studie war es, die morphologischen Veränderungen einer Klemmung bzw. Ligatur der Leberarterie aufzuzeigen und zu prüfen, ob ein Modell zur ITBL an der Ratte durchführbar ist. Als Grundvoraussetzung hierfür ist die Abhängigkeit der Gallengänge von der Leberarterie zu nennen. Die Gallengänge werden über sie und über der PBP versorgt. Der intrahepatische biliäre Plexus wird direkt durch die Leberarterie versorgt, kommuniziert jedoch mit dem extrabiliären Plexus, welcher hauptsächlich durch Äste der A. gastroduodenalis versorgt wird (Vellar 1999; Kawarada et al. 2000; Kan und Madoff

2008). Schneidet man also die arterielle Blutzufuhr der Leber durch Klemmung bzw. Ligatur der A. hepatica communis ab und klemmt den PBP auf Höhe des Leberhilus ab, kann gewährleistet werden, dass die Leber von der arteriellen Blutversorgung abgeschnitten ist. Wird lediglich die Leberarterie ligiert, zeigen sich keine Auswirkungen auf Gallengänge oder Leberparenchym (Soares et al. 1993; Zhao et al. 1993; Burczynski et al. 1996). Wichtig hierbei ist der Fakt, dass Hepatozyten weiterhin genug nährstoffreiches Blut erhalten, da rund 80% ihrer Versorgung über die Pfortaderversorgung gewährleistet ist (Kan und Madoff 2008). Sheng et al. wählten für ihr ITBL Modell Kaninchen, da sie beschreiben, dass bei den Tieren keine arterio-portalen Anastomosen bestehen würden. Dem aber widersprechen die Ergebnisse von Gaudio et al., die zeigten, dass der intra- und extrahepatische Plexus im Rahmen eines Pfortaderhochdruckes eine entscheidende Rolle in der Kollateralenbildung über Strömungsumkehr darstellen kann und sich der Blutfluss umkehren kann. Dies ist sowohl bei der Ratte als auch beim Kaninchen bekannt (Gaudio et al. 1993; Kan 1996). Li et al. zeigten, dass es in Experimenten mit arterio-portalen Shunts zur Strömungsumkehr kommen kann und die Gallengänge der Ratte so mit arteriellem Blut versorgt werden können (Li et al. 2008). Dies scheint jedoch ausschließlich durch das höhere Strömungsvolumen bedingt zu sein und zeigt sich nicht in einem Modell ohne arterio-portalen Shunt (Guo et al. 2011).

Dass der arterielle Wiederanschluss nach Rattenlebertransplantation von Relevanz ist, haben verschiedene Studien gezeigt. Zhao et al. zeigten, dass es bei fehlender Rekonstruktion der Leberarterie zu Gallengangsproliferationen und einer Verminderung des Hepatozytenvolumens kommt (Zhao et al. 1993). Zudem führt das Fehlen der Leberarterie, trotz spontaner Rearterialisierung, zu Gallengangsschädigung und folgend zu Leberfibrose nach sechs Monaten (Zhao et al. 1995). Li et al. zeigten, dass es auch nach Gallengangsrekonstruktion ohne Transplantation mit folgender Ligatur der Leberarterie zu vermehrtem Auftreten von Komplikationen wie intra- und extrahepatischer Cholestase, vermehrter Sludgebildung und Leberabszessen kommt (32,5% vs. 0% in der Kontrollgruppe) (Li et al. 2011b). Dies steht zunächst im Gegensatz zu den Beobachtungen von Kamada et al. und Svensson et al., welche keine Unterschiede in der Leberhistologie oder Serologie zwischen transplantierten Tieren mit oder ohne Leberarterie zeigen konnten (Svensson et al. 1991; Kamada et al. 1992). Imamura et al. erklären diese Diskrepanz vor allem mit den verschiedenen Beobachtungszeiträumen sowie Untersuchungsparametern. Sie konnten in einem dreimonatigen Versuch zeigen,

dass sich innerhalb der Gruppe ohne arterielle Anastomose zwei Untergruppen nach Transplantation formten. Die eine Gruppe der Tiere wuchs normal, die andere Gruppe zeigte Anzeichen der Cholestase, nahm an Gewicht ab, bildete Aszites und ein Teil der Tiere verstarb. In beiden Gruppen kam es während der Beobachtungsperiode zu Gallengangsproliferation und Fibrose, welche bei einem Teil der Tiere zu einer sekundären biliären Zirrhose führte. Hierbei konnte kein auslösender Faktor identifiziert werden, jedoch können diese Beobachtungen die unterschiedlichen Verläufe erklären. Somit scheint der Wiederanschluss der Arterie nach Transplantation von entscheidender Bedeutung zu sein. Wir wählten für unser Modell der ITBL deshalb eine Kontrollgruppe mit totaler arterieller Deprivation.

Das einzige uns bekannte Tiermodell zur ITBL wurde von Sheng et al. etabliert (Sheng et al. 2009). In unserem Modell wichen wir von der Idee ab, sowohl Gallengang als auch Leberarterie mit einem Gefäßclip zu verschließen. Unsere Vorversuche mit zweistündiger Klemmzeit zeigten, dass es in etwa der Hälfte der Fälle zu Verklebungen des Gallenganges an der Klemmstelle mit nachfolgender Cholestase kam. Die Gallengänge der Tiere waren hierbei teilweise bis auf 1cm im Durchmesser vergrößert und das Tier ikterisch, sodass es frühzeitig aus dem Versuch genommen werden musste. Cholestase alleine kann in einem gesunden Tier zu Leberschäden führen. So beschreiben Prado et al. in ihrem Modell mit Ligatur des Gallenganges Folgen wie Dilatation des Gallenganges, Proliferation der Gallengänge, Mikroabszesse und ischämisch bedingte Nekrosen (Prado et al. 2003). Selbst eine partielle Stenose des Ductus hepaticus communis führt zur Dilatation proximal dieser, mit nachfolgender Proliferation der Gallengänge, Inflammation, Fibrose und Zirrhose (Sekas 1990). Durch das Einbringen eines Stents mit doppelter Ligatur wird das Auftreten von Verklebungen des Gallenganges vermieden und somit Prozesse, welche durch Cholestase entstehen, ausgeschlossen. Beaussier et al. schließen durch ihren Versuch zur Gallengangsischämie sogar explizit aus, dass das Stenting des Gallenganges zu biochemischen oder histologischen Veränderungen führen kann (Beaussier et al. 2005). Diese Beobachtungen konnten wir auch in unserer Sham Gruppe nachvollziehen. Sheng et al. legten in ihrem Versuch die optimale Klemmzeit auf 2h fest, da bereits bei drei Stunden eine erhöhte Mortalität auftrat. Histologische Untersuchungen der Tiere zeigten ischämische Nekrosen, Gallengangsinsuffizienzen und abdominelle Infektionen, wie von Prado et al. 2003 im Rahmen der Cholestase beschrieben. Wir vermuten, dass es sich in den von Sheng et al. beobachteten Veränderungen um Folgen von Cholestase handeln könnte. Somit sehen wir einen Vorteil

in dem von uns beschriebenen Modell mit Stent.

Im Gegensatz zu anderen Gruppen entschieden wir uns gegen ein vollständiges Lösen aller Bandstrukturen um die Leber (Sheng et al. 2009; Guo et al. 2011). Durch das Lösen soll die Leber von eventuellen akzessorischen Gefäßverbindungen getrennt werden, wie z.B durch Abgänge der A. phrenica inferior (Itai und Matsui 1997). Jedoch kann es durch die Manipulation an der Leber zu Verletzungen, Druckschäden und nicht zuletzt zum Freisetzen von freien Radikalen und zur Gewebshypoxie kommen (Schemmer et al. 2000; Schemmer et al. 2001). Deshalb beschränkten wir uns auf das Lösen von ventral und lateral gelegenen Bandstrukturen. Die Leber wurde nicht vollständig gelöst und dorsale Strukturen blieben unangetastet.

Analog zu den Modellen von Beaussier et al., Guo et al., Li et al., Sheng et al. und Soares et al., welche Untersuchungszeiträume von 48 Stunden bis 30 Tagen untersuchten, wählten wir einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 30 Tagen. Aus der Literatur ist bekannt, dass sich zu diesem Zeitpunkt der Ausgangszustand der biochemischen Parameter wieder eingestellt hat (Beaussier et al. 2005; Sheng et al. 2009). Zhao et al. zeigen eine Ausbildung signifikanter Stenosen in einem Modell zur extrahepatischen biliären Stenose an Tag 21 (Zhao et al. 2008). Zudem ist durch Untersuchungszeitpunkte an den Tagen eins, drei, 7, 14, 21 gewährleistet, eventuelle Regenerationsprozesse und die Ausschüttung von Hypoxie induzierten Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF beobachten zu können (Zhou et al. 2010).

Durch unsere Gruppen A und B mit zweistündiger Klemmzeit und den Beobachtungen von Sheng et al., dass es bei einer Klemmzeit von mehr als 3 Stunden zu einem Rückgang der Überlebensrate von 100% auf 60% kommt, entschieden wir uns für eine dreistündige Klemmzeit. Nach dem Entfernen des Gefäßclips zeigte sich eine gute Pulsation der Arterie, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Clips keinerlei hämodynamisch relevante Stenosen hervorrufen.

Nach dem Entfernen des Clips und der Freisetzung der Reperfusion, kann der warme Ischämie- Reperfusionsschaden in den intrahepatischen Gallengängen gut simuliert werden (Sheng et al. 2009). Es ist bekannt, dass ein Ischämie-Reperfusionsschaden zu Entzündungsprozessen führt, welche mitunter durch Leukozyteninfiltration gekennzeichnet sind. Diese Prozesse werden durch das Freisetzen von Zytokinen wie Interleukin 1, Interleukin 6 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α), durch aktivierte Kupffer-

und T-Zellen getriggert. Aktivierte neutrophile Leukozyten infiltrieren dann die beschädigten Zellen durch eine lokal veränderte Mikrozirkulation, welche die Aktivierung, Adhäsion und Migration von weiteren Neutrophilen zur Folge hat. Diese wiederum führt zur lokalen Gewebszerstörung und dem Freisetzen von Proteasen und Sauerstoffradikalen mit apoptotischer Auswirkung (Jaeschke et al. 1991; Colletti et al. 1998; Fondevila et al. 2003).

Zusätzlich zur Klemmgruppe entschieden wir uns für eine Gruppe, in der die Leberarterie ligiert wurde und die Gallengänge somit von jeglicher Blutzufuhr abgeschnitten waren. Wie bereits erwähnt existieren in der Literatur mehrere Modelle zur Leberarterienligatur, somit kann auf eine Vielzahl von Ergebnissen zurückgegriffen werden. So konnten wir Ergebnisse von Beaussier et al., welche in einem Modell mit Ligatur der A. hepatica communis und Stenting des DHC gewonnen wurden, reproduzieren. Hierbei zeigte sich ein ähnlicher Verlauf der Serumparameter, sowie der Gallengangproliferation (Beaussier et al. 2005). Durch den analogen Aufbau der I/R und Klemmgruppe konnten wir einen direkten Vergleich der Auswirkungen von Ischämie und Ischämie-Reperfusionsschaden erbringen.

6.2 Diskussion der Ergebnisse

6.2.1 Diskussion Ergebnissteil A

Im Hinblick auf die serologischen Parameter zeigt sich in unserem Modell der dreistündigen Ischämie und nachfolgender Reperfusion eine passagere Erhöhung der Transaminasen. Diese findet vor allem innerhalb der ersten drei Tage nach Klemmung statt. Ab Tag sieben kommt es zu einem Rückgang der GOT und GPT, welche jedoch über Norm erhöht bleiben und bis zum Beobachtungsende nicht auf Ausgangsniveau absinken. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen von Sheng et al., welche ebenfalls den maximalen Anstieg der Transaminasen an Tag sieben beobachteten (Sheng et al. 2009). Im Rahmen der dreistündigen Klemmung kommt es durch eine Gewebhypoxie zu einem Adenosin-Triphosphat (ATP) Mangel und der Anhäufung von intrazellulärem Natrium. Es resultiert ein interstitielles Ödem (Kupiec-Weglinski und Busuttill 2005). Durch die für den Ischämie-Reperfusionsschaden am vulnerabelsten hepatischen Endothelzellen kommt es zur Expression von Oberflächenproteinen und Hauptgewebeverträglichkeitskomplexen (MHC), welche die Infiltration von neutrophilen

Granulozyten erleichtern (Jaeschke et al. 1991; Fondevila et al. 2003). Dies wird durch zirkulatorische CD-4 positive T-Lymphozyten verstärkt. Die von Fondevilla et al. beschriebene Infiltration von Neutrophilen können wir durch die von uns durchgeführte CAE Untersuchung direkt nachvollziehen. Im Bereich der Leberarterien, in Rappaport Zone I, zeigt sich zu allen Untersuchungszeitpunkten eine signifikant erhöhte Anzahl an CAE positiven Zellen (vgl. Abb. 13A). Durch die Produktion von Sauerstoffradikalen durch Kupferzellen und Neutrophilen kommt es dann sekundär zur Zellschädigung, welche bei uns unter anderem durch die erhöhte LDH Ausschüttung als unspezifischen Marker für Zelluntergang sichtbar wird (Jaeschke et al. 1991). Das Enzym zeigt einen analogen Verlauf zu den zwischen Tag eins und drei erhöhten Transaminasen, bleibt jedoch auch im weiteren Verlauf weiter gegenüber Sham erhöht (signifikant an Tag drei und 14, vgl. Abb. 17C). Im Rahmen des Zellschadens kommt es zur Apoptose, welche indirekt über Caspase 3 Expression nachgewiesen werden kann. Wir konnten durch unsere Western Blot Ergebnisse zeigen, dass es zu einer signifikant erhöhten Caspase 3 Expression an Tag drei nach Ischämie und Reperfusion kommt. Das Enzym bleibt bis Tag 14 im Vergleich zur Sham Gruppe überexprimiert und weist so auf vermehrte Apoptose hin.

Durch den Caspase 3 Nachweis im Western Blot kann die Apoptose keiner Zellart zugeordnet werden. Wir gehen jedoch davon aus, dass sie vor allem den Zelltod der Cholangiozyten im Rahmen der I/R widerspiegelt. Untersuchungen haben gezeigt, dass die intrahepatischen Cholangiozyten keine Hydrogenperoxidase oder Superoxiddismutase noch reduziertes Glutathion als Radikalfänger besitzen. Dies macht sie vulnerabler für I/R Schäden als z.B. die Hepatozyten (Noack et al. 1993; Wang et al. 1998; Elimadi et al. 2001; Zhou et al. 2010). Diese Theorie kann von zwei von uns getroffenen Beobachtungen unterstützt werden.

Wir konnten erstens einen signifikanten Unterschied der PCNA positiven Zellen im Vergleich zur Sham nach drei Stunden I/R beobachten (vgl. Abb. 15). PCNA als Marker für Proliferation ist in Gruppe C am Tag sieben signifikant erhöht. Dieser Zeitpunkt passt gut zu den oben genannten Ergebnissen der Serologie, sowie des Caspase 3 Western Blots. Es ist zudem bekannt, dass es nach Ischämie-Reperfusionsschaden zu Regenerationsprozessen kommt, welche 14 Tage nach Reperfusion abgeschlossen sind (Ikeda et al. 1992). Interessant ist hierbei, dass die Proliferation am stärksten in Rappaport Zone I stattfindet (vgl. Abb. 15). Dies unterstützt unsere Vermutung, dass der Schaden an den vulnerableren Gallengangsepithelzellen deutlich ausgeprägter ist und die in RPP I benachbarten Hepatozyten zusätzlich sekundär durch die Ausschüttung von

freien Sauerstoffradikalen geschädigt werden. Hepatozyten in RPP Zone II und III zeigen weniger Proliferation und damit kann vermutet werden, dass die dreistündige I/R deutlich weniger Einfluss auf die Zellen hat. Dies zeigt sich ebenfalls in dem raschen Abfall der Transaminasen, welcher auch von Sheng et al. beschrieben wurde (Sheng et al. 2009), bedingt durch die duale Blutversorgung der Hepatozyten durch Pfortader und Leberarterie. Es ist bekannt, dass Apoptose, welche durch I/R Schaden im Rahmen einer Transplantation entstanden ist, durch Hyperplasie der Cholangiozyten, ausgeglichen werden kann. Dies wird durch VEGF- Expression ausgelöst (Xu et al. 2004). Wir vermuten, dass die vermehrte PCNA Expression in unserem Experiment ebenfalls durch eine VEGF Stimulation erfolgt. In den Western Blot Untersuchungen konnten wir jedoch zu keinem Zeitpunkt eine erhöhte VEGF Expression nachweisen. Dies lässt sich durch die von Zhou et al. gemachten Beobachtungen erklären (Zhou et al. 2010). Die Gruppe konnte zeigen, dass es möglich ist Cholangiozyten durch hypoxische Präkonditionierung vor I/R Schaden im Rahmen einer Transplantation zu schützen. Durch die Präkonditionierung kam es zu VEGF Ausschüttung, welche zwölf Stunden nach Operation maximal war. Wir nehmen an, dass die Probengewinnung nach dem Peak erfolgte und wir deshalb keine vermehrte VEGF Expression nachweisen können. Andererseits muss auch diskutiert werden, ob es im Rahmen der Ischämie-Reperfusion bei bestehendem Pfortaderfluss zu keiner erhöhten Expression kommt. So zeigten Zhu et al., dass es im Rahmen einer Lebertransplantation an der Ratte nach Wiederanschluss der Leberarterie zu keinem signifikanten Unterschied im VEGF Plasma Spiegel kommt. Verlängerte sekundäre warme Ischämiezeit der Gallengänge (SWIT) um 20 Minuten (Zeit von Pfortaderanschluss bis zur Arterienanastomose) führte sogar zu einem signifikanten Abfall des Plasmaspiegels (Zhu et al. 2012).

Die andere Beobachtung, welche unsere Hypothese unterstützt, dass die dreistündige I/R zu einem Schaden an den Gallengangsepithelien führt sind die Veränderungen hinsichtlich der Lebermorphologie. Es ist bekannt, dass es im Rahmen von Rattenlebertransplantationen zu Gallengangsproliferation nach vier Wochen kommt (Imamura et al. 1997). Hierbei scheinen die Auswirkungen ähnlich derer einer Transplantation ohne arterielle Anastomose zu sein. So zeigten neben Imamura et al. auch Zhao et al., dass es nach einer Lebertransplantation mit Rearterialisierung zu keiner Veränderung der Leberarchitektur kommt, wohingegen eine nicht Rearterialisierung zu Leukozyteninfiltration und Gallengangsproliferation führt (Zhao et al. 1995). Wir können ebenfalls eine Zunahme der Gallengänge beobachten. Zum Ende der

Beobachtungsperiode nimmt die Anzahl der Gallengänge signifikant zu. Wir vermuten, dass es im Rahmen der Ischämie, ausgelöst durch die dreistündige I/R, zu VEGF Ausschüttung kommt, welche zu einem Proliferationsreiz der Gallengänge führt. Dies sehen wir als Zeichen, dass wir die Prozesse der warmen Ischämie, im Rahmen einer Lebertransplantation, gut simulieren können. Die Zunahme der Gallengänge scheint einer Cholestase entgegenzuwirken, was sich an unseren Ergebnissen für direktes und indirektes Bilirubin, welche nicht ansteigen, nachvollziehen lässt. Zudem ist der Gallefluss zu jedem Zeitpunkt vergleichbar mit der Sham Gruppe (vgl. Abb. 17). Anders als von Zhao et al. berichtet, können wir keine Zunahme der Arterien pro Glissonscher- Trias feststellen. Diese zeigte sich bei Tieren ohne Rearterialisierung. Unsere Ergebnisse zeigen eine leichte Reduktion der Gesamtarterienanzahl bei signifikanter Reduktion der Arterien pro Gt im Rahmen der Gallengangszunahme (vgl. Abb. 12).

Trotz normalem Bilirubin scheint die Klemmung dauerhafte Ischämie an den Gallengängen auszulösen. Auch an Tag 30 zeigt sich eine signifikant erhöhte Anzahl CAE- positiver Zellen in RPP I. Interessanter Weise zeigen die Epithelzellen jedoch keine Anzeichen für Nekrose, was durch Elektronenmikroskopie (vgl. Abb. 18) und HE- Färbung gezeigt werden konnte.

Durch unsere Ergebnisse konnten wir zeigen, dass es möglich ist durch eine dreistündige Klemmung mit warmer Ischämie und nachfolgender Reperfusion die Prozesse einer Lebertransplantation zu simulieren. Die Cholangiozyten, welche sensibler auf Sauerstoffradikale reagieren, scheinen hierdurch Schaden zu nehmen und kompensatorisch zu proliferieren. Anders als von Sheng et al. beobachtet, konnten wir keine Strikturen nachweisen (vgl. Abb. 19 und 20). Dies kann zum einen an der zu geringen Auflösung des MRT Gerätes liegen, andererseits kann es sein, dass die von Sheng beobachteten Prozesse anderen Pathomechanismen zu Grunde liegen. Gegensätzlich zu Sheng et al., welche einen signifikanten Anstieg des direkten und indirekten Bilirubins um das zwei bzw. fünffache nach 24 Stunden beobachteten, zeigte sich in unserem Model kein signifikanter Unterschied der Bilirubinwerte im Verlauf der dreißigtägigen Beobachtung. Zudem sehen wir keine nekrotischen Zellen oder abgeschilferte Epithelstrukturen in den Gallengängen. Wir vermuten, dass es sich hierbei um einen Schaden handelt, welcher durch Cholestase entstanden ist. Zhao et al zeigten, dass eine 90 minütige Klemmung des DHC zu Nekrose der Mukosa mit folgender Fibrose und ischämischer Stenose führte (Zhao et al. 2008). Zudem führt selbst eine teilweise Obstruktion des DHC zu Proliferation der Gallengänge mit Entzündungsreaktion, Fibrose

und Leberzirrhose (Sekas 1990). Die komplette Okklusion des DHC kann sogar zu ischämischen Nekrosen der Hepatozyten mit Mikroabszessen und eitriger Cholangitis führen (Prado et al. 2003). Im Rahmen des Modells von Sheng et al. zur ITBL am Kaninchen wurde in der drei Stunden Klemmgruppe eine 40%ige Mortalität festgestellt. Durch Autopsien zeigten sich ischämische Nekrosen, Gallegangsinsuffizienzen und abdominale Infektionen, welche dem Schadensbild einer Gallengangsobstruktion entsprechen (Sheng et al. 2009).

6.2.2 Diskussion Ergebnissteil B

Anders als von Soares et al. beschrieben, welche lediglich die Leberarterie, ohne den PBP ligierten, kommt es in unserem Ligaturmodell zu einem passageren Anstieg der gemessenen Blutparameter (Soares et al. 1993). Die Transaminasen zeigen sich bereits drei Stunden nach Ligatur erhöht und sinken erst nach sieben Tagen ab. Selbst an Tag 30 zeigt sich eine signifikante erhöhte GOT. Auch direktes und indirektes Bilirubin bleiben über einen Zeitraum von 21 Tagen signifikant gegenüber Sham erhöht. Dies bestätigt unsere Vermutung, die Blutversorgung der Gallengänge, durch Ausschaltung des PBP, relevant eingeschränkt zu haben. Unsere Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse von Beaussier et al., welche die Auswirkungen von isolierter Gallengangischämie untersuchten (Beaussier et al. 2005). Bei einer Gruppe wurde neben der von uns durchgeführten Ligatur und Stent des Gallenganges zusätzlich eine komplette Mobilisierung der Leber durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls signifikant erhöhte Transaminasen sowie erhöhtes Bilirubin bis sechs Wochen nach Eingriff.

Auf Grund der Ischämie kommt es durch den ATP Mangel zu den bereits in Ergebnisteil A diskutierten Prozessen. Auch nach Ligatur kommt es zu einer Leukozyteninfiltration. An den Tagen sieben und 14 können signifikant mehr CAE positive Zellen in Rappaport Zone I nachgewiesen werden. Dies geht einher mit einer vermehrten Expression von Caspase 3 mit signifikantem Unterschied am Tag drei (vgl. Abb. 21). Wir vermuten, dass wie in Teil A diskutiert, vor allem Cholangiozyten auf Grund ihrer erhöhten Vulnerabilität gegenüber Sauerstoffradikalen geschädigt werden (Zhou et al. 2010; Elimadi et al. 2001; Noack et al. 1993). Diese Hypothese wird durch die Auswertung der Vakuolisierung unterstützt, welche eine signifikant erhöhte Zahl an vakuolisierten Zellen im Bereich RPP I zeigen konnte (vgl. Abb. 22 und 23).

Beaussier et al. konnten in ihrem Modell zur Gallengangischämie zeigen, dass es durch

Hypoxie zur VEGF Expression der Cholangiozyten, mit einem Maximum 48 Stunden nach Operation, kommt. Im Speziellen konnten VEGF positive Epithelzellen sowie VEGF positive Arteriolen nachgewiesen werden (Beaussier et al. 2005). VEGF kann unter Hypoxie vermehrt zirkulatorisch nachgewiesen werden und seine Rezeptoren werden auf Endothelzellen vermehrt exprimiert (Christou et al. 1998). Cholangiozyten können VEGF und dessen Rezeptoren exprimieren, dadurch die Proliferation des PBP beeinflussen und somit die Blutversorgung der Gallengänge steigern (Gaudio et al. 2005). Gaudio et al. konnten in einem Modell mit Ligatur der A. hepatica communis und des Gallengangs zeigen, dass die Gabe von rekombinantem VEGF den PBP vor Ischämie schützt und somit einen Schaden der Cholangiozyten abhalten kann (Gaudio et al. 2006). Trotz des Anstieges der Cholestaseparameter und der Transaminasen, konnte in unserem Modell zur Ligatur der Leberarterie keine signifikante Erhöhung von VEGF nachgewiesen werden. Eventuell kann dies, wie bereits im Ergebnissteil A diskutiert, an dem Zeitpunkt der Messung nach drei Tagen liegen. Wir vermuten, dass die Ausschüttung dann bereits stattgefunden hat.

Bezüglich unserer Ergebnisse der PCNA Färbung, kann ein Anstieg zwischen Tag sieben und 14 in Rappaport Zone I beobachtet werden. Hierbei besteht ein signifikanter Unterschied an beiden Tagen sowohl im Bereich der Epithelzellen, als auch im Bereich der Hepatozyten. Interessant ist, dass in der Ligaturgruppe ebenfalls eine deutlich erhöhte PCNA Expression in Rappaport Zone II und III an den Tagen sieben und 14 festgestellt werden kann (vgl. Abb. 27). Die Hepatozyten scheinen auf die dauerhafte arterielle Ligatur anfällig zu reagieren, was sich auch an den bis Tag 21 erhöhten Transaminasen und dem unspezifischen Ischämie marker LDH zeigt. Es ist bekannt, dass Ischämie auch zu funktionellen Veränderungen in Cholangiozyten führt, welche daraufhin eine eingeschränkte Sekretion und Barrierefunktion aufweisen und somit zu Gallenleckage in das Leberparenchym oder zu Gallestau führen können (Doctor et al. 1999; Doctor et al. 2000).

Bezüglich der Gallengangsanzahl, sehen wir einen Anstieg von Tag sieben bis 14 mit signifikant mehr Gallengängen an den Tagen 14 und 30 im Vergleich zur Sham Gruppe. Hierbei scheint die Vermehrung kompensatorischer Art zu sein. Initial zeigt sich ein kleinerer Flächeninhalt pro Gallengang und Glissonscher- Trias. Durch die Proliferation der Gallengänge, kann dies bis Tag 30 wieder angeglichen werden (vgl. Abb. 24). Hierbei ist es wichtig, zu diskutieren woher die Veränderungen stammen. Es ist bekannt, dass

Cholestase einen Proliferationsreiz auf die Gallengänge hat (Rodríguez-Garay et al. 1996). Deshalb führen Ligatur des Gallengangs oder die Fütterung von α -Naphthylisothiocyanat, welche allesamt zu Leberzirrhose führen können, zu einer Gallengangsproliferation (Alpini et al. 1989). Interessanterweise bildet sich diese Art der Proliferation zurück, wenn der initiale Schaden entfernt wird und damit die Cholestase abnimmt (Gall und Bhathal 1990; Lesage et al. 2001). Die einzige uns bekannte Studie zu den Auswirkungen einer Ligatur der *A. hepatica communis* zeigt einen Anstieg der angeschnittenen Gallengänge pro Untersuchungsfeld im Verlauf der sechswöchigen Untersuchungsperiode (Beaussier et al. 2005). Hierdurch wurde gezeigt, dass alleine die Ischämie der Gallengänge zu einem Proliferationsreiz führen kann. Diese Gallengänge führen zu alternativen Galleableitungswegen und beugen der Cholestase so vor. Wir gehen davon aus, dass die beobachtete Proliferation der Gallengänge in unserem Modell der Ligatur ebenfalls durch eine Ischämie ausgelöst wurde. Durch das gewählte Modell mit Stenting können wir einen Anreiz durch eine primäre Cholestase ausschließen und dies durch mit dem in Ergebnissteil A diskutierten Ergebnisse belegen. Der Anstieg des Bilirubins kann durch den Untergang der Cholangiozyten und den nachfolgenden Regenerationsprozessen erklärt werden. Durch die Zunahme der Gallengangsanzahl, welche ihr Maximum an Tag 21 erreicht, kann dies aber frühzeitig abgefangen werden.

Interessant ist hierbei, dass wir im selben Zeitraum eine leichte Reduktion der Anzahl der Arterien pro Glisson- Trias feststellen können. Durch die Zunahme der Gallengänge kommt es hierbei zu einer signifikant erniedrigten Anzahl an Arterien pro Gallengang (vgl. Abb. 24). Versuche von Lebertransplantationen an der Ratte, ohne Wiederanschluss der Leberarterie, zeigten, dass es zu spontaner Rearterialisierung kommen kann (Imamura et al. 1997). Dies gilt auch bei Ligatur der Arterie (Wong et al. 2001), scheint jedoch einer Cholestase nicht alleine entgegenwirken zu können. Durch Gallengangsproliferation wird auch ein neuer PBP gebildet, welcher über eine solche Rearterialisierung gespeist werden könnte. Wir können diese spontane Rearterialisierung in unseren Versuchen nicht nachvollziehen. Wir vermuten, dass es auch in unserem Modell zu einer Rearterialisierung kommen würde, allerdings der Untersuchungszeitpunkt zu früh ist. So berichteten Zhao et al., dass es nach sechs Monaten zu einer Zunahme der Arterien auf 2,44 pro Glisson- Trias kommt (Zhao et al. 1995). Analog zu unseren Ergebnissen fanden Guo et al. eine Reduktion der Arteriolen nach Ligatur und nachfolgenden Verschluss von subintimal gelegenen Gefäßen nach einem Monat (Guo et al. 2011).

6.2.3 Diskussion Ergebnissteil C

Durch Gruppe C und E konnten wir die Validität unseres Modells bekräftigen. Die Verwendung eines Stents im Gallengang schließt eine Cholestase und die damit verbundenen Komplikationen aus. Durch die Bestätigung der Ergebnisse von Beaussier et al. und Zhao et al. in unserem Modell zur Ligatur der Leberarterie konnten wir zudem zeigen, dass wir durch nur teilweises Ablösen der Bandstrukturen der Leber eine ausreichende Einschränkung der arteriellen Perfusion erreichen konnten. Durch die im Ergebnissteil C gemachten Beobachtungen, kann nun erstmalig die Auswirkung warmer Ischämie gegenüber dreistündiger Ischämie mit Reperfusion verglichen werden.

Bei dem Verlauf der Glutamat- Oxalacetat- Transaminase zeigt sich, dass es nach dreistündiger Ischämie und Reperfusion zu einem sehr frühen Anstieg mit signifikanter Erhöhung nach drei Stunden im Vergleich zur Gruppe mit Ligatur kommt (vgl. Abb. 33A). Durch die im Rahmen der Reperfusion anfallenden Sauerstoffradikale werden wie bereits in den vorherigen Abschnitten diskutiert, inflammatorische Prozesse freigesetzt, welche zu Zellschaden führen können (Kupiec-Weglinski und Busuttill 2005). Im Gegensatz hierzu, steigen die Transaminasen innerhalb der Ligaturgruppe erst nach einem Tag deutlich an und bleiben dann bis Tag sieben signifikant gegenüber der I/R Gruppe erhöht. Dies ist der dualen Blutversorgung der Hepatozyten zuzurechnen, welche über 80% ihrer Blutversorgung über das Pfortadersystem erhalten (Itai und Matsui 1997). Hierüber und durch die fehlenden Noxen, welche im Rahmen der Reperfusion auftreten würden, kommt es erst später zu dem Anstieg der GOT. Wie zu erwarten führt eine totale Ausschaltung der arteriellen Perfusion anschließend zu Regenerationsprozessen, welche im Vergleich zur I/R Gruppe flächendeckend ausfallen, welches sich in dem Nachweis der PCNA positiven Zellen in der Ligaturgruppe über sämtliche Rappaportzonen zeigt.

Im Rahmen der I/R zeigen vor allem die Cholangiozyten auf Grund ihres Mangels an Radikalfängern eine Reaktion auf die anfallenden Sauerstoffradikale (Noack et al. 1993; Wang et al. 1998; Elimadi et al. 2001; Zhou et al. 2010). Hierdurch kommt es zu einem über den gesamten Untersuchungszeitraum erhöhten Nachweis an CAE positiven Zellen gegenüber der Ligaturgruppe in RPP I (vgl. Abb. 31). Warum diese Reaktion nach Ligatur schwächer ausfällt kann nur spekuliert werden.

Die Ligaturgruppe zeigt signifikant erhöhte Cholestaseparameter an den Tagen eins, sieben, 14 und 21. Dies kann durch die im Rahmen der Ligatur andauernde Ischämie erklärt werden. Wie von Doctor et al. beobachtet, kann hieraus eine eingeschränkte Sekretion und Barrierefunktion der Cholangiozyten auftreten (Doctor et al. 2000).

Im Rahmen der Ligatur kommt es dann, wie bereits von Beaussier und Zhou beschrieben, zur Proliferation der Gallengänge (Zhou et al. 2010; Beaussier et al. 2005). Anders als von den Kollegen beschrieben, können wir das Maximum bereits am Tag 14 feststellen, dies deckt sich auch mit den Ergebnissen der PCNA Färbung. Wir vermuten, dass das Organ auf Grund der fallenden Serumparameter GOT sowie GGT und dem Rückgang der Gallengangsanzahl bereits einen Zustand der Kompensation erreicht hat. Im Vergleich hierzu scheint die Anzahl der Gallengänge in der I/R Gruppe gegen Ende der 30 Tage noch anzusteigen (vgl. Abb. 30).

6.3 Schlussfolgerung

In unserem Modell zur isolierten Ischämie der Gallengänge mit nachfolgender warmer Reperfusion konnten wir erstmalig zeigen, dass es zu einer Proliferation der Gallengänge kommt, ohne dass hierbei Zellnekrosen entstehen. Im Gegensatz zu der bereits bekannten Proliferation nach vollständiger und dauerhafter Entfernung der arteriellen Blutversorgung, scheinen die Prozesse von einer länger andauernden Leukozyteninfiltration begleitet zu sein. Durch die im Versuch vorgenommene Stentimplantation des Gallengangs konnte eine Cholestase verhindert werden, was sich an den Serumparametern und den nicht vorhandenen Zellnekrosen zeigt.

Diese Beobachtungen sind neu und zeigen, dass auch eine isolierte Ischämie der Gallengänge zu umfangreichen Veränderungen in der Lebermorphologie führt.

Es liegt nahe, die Veränderungen einer „Ischemic-type intrahepatic biliary lesion“ zuzuordnen. Einer der Hauptrisikofaktoren hierfür ist, wie in der Einleitung beschrieben, die warme Ischämiezeit. Wir konnten im Gegensatz zu Sheng et al. keine Stenosen der intrahepatischen Gallengänge feststellen. Dies kann einerseits daran liegen, dass die Auflösung der MRT Bildgebung zu gering war, um die kleinsten Gallengänge darzustellen, andererseits konnten in den HE Schnitten ebenfalls keine Gangabbrüche oder Stenosen gesehen werden. Dass das Krankheitsbild komplex und noch nicht vollständig verstanden ist, zeigen zum Beispiel Fallberichte zum Auftreten einer ITBL im Rahmen einer Pfortaderthrombose bei erhaltenem arteriellem Fluss.

Wir glauben, dass Modelle wie unseres oder das von Sheng et al., gut dazu dienen, Prozesse und morphologische Veränderungen aufzuzeigen und zu verstehen. Ein Modell

zur ITBL bleibt allerdings nach wie vor schwierig zu simulieren. Letztendlich kann vermutlich nur ein Transplantationsmodell alle komplexen Inhalte, die zum Entstehen einer ITBL führen, klinisch fachgerecht und anschaulich widerspiegeln.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ALP Alkalische Phosphatase

ATP Adenosintriphosphat

CAE Chloracetatesterase

DB direktes Bilirubin= konjugiertes Bilirubin

DHC Ductus hepaticus communis

DRI donor risk index

ECD extended criteria donor

ECL enhanced chemiluminescence

EDTA ethylene diamine tetraacetic acid

ERCP endoskopisch retrograde Cholangiopankreatikographie

ESDL end stage liver disease

GGT Gamma-Glutamyl-Transferase = γ -GT

GOT Aspartat-Amino-Transferase = AST

GPT Alanin-Amino-Transferase = ALT

h Stunden

HA Arteria hepatica

HAL hepatic artery ligation

HE Hämatoxylin-Eosin

HPF high power field

INR international normalized ratio

I/R Ischämie- Reperfusion

ITBL ischemic-type biliary lesion

LDH Laktatdehydrogenase

MELD model of end stage liver disease

MMF Mycophenolat- Mofetil

MRCP Magnet- Resonanz- Cholangiopankreatikographie

NaCl Natrium-Chlorid

NAS nicht Anastomose bezogene Strikturen

OLT orthotropic liver transplantation

PBP Peribiliärer Plexus

PBS phosphat buffered saline

PCNA Proliferating Cell Nuclear Antigen

PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid

PSC primär sklerosierende Cholangitis

PTCD perkutane transhepatische Cholangiodrainage

PVDF Polyvinylidenfluorid

SWIT sekundäre warme Ischämiezeit

TB totales Bilirubin = gesamtes Bilirubin

TBS-T tris buffered saline tween

TIPS transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt

TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

VEGF vascular endothelial growth factor

7.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Zoneneinteilung nach Rappaport.....</i>	<i>13</i>
<i>Abbildung 2: Operation mikroskopisch.....</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 3: Operation mikroskopisch.....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 4: Operation makroskopisch.....</i>	<i>21</i>
<i>Abbildung 5: Blutentnahme.....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 6: Gewinnung der Proben</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 7: HE- Färbung exemplarisch.....</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 8: CAE- Färbung exemplarisch</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 9: PCNA- Färbung.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 10: Zeitstrahl</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 11: Western Blot Ergebnisse 3h I/R.....</i>	<i>37</i>
<i>Abbildung 12: Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl in 3h I/R.....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 13: CAE Ergebnisse 3h I/R O Sham Gruppe.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 14: CAE-positive Zellen Histologie in RPP I</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 15: PCNA-positive Zellen 3h I/R.....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 16: PCNA positive Zellen Histologie 3h I/R.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 17: Serumparameter und Gallefluss.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Untersuchung 3h I/R</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 19: MRT transversal vor Klemmung</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 20: MRT transversal nach zweistündiger Klemmung an Tag 30.....</i>	<i>46</i>

<i>Abbildung 21: Western Blot Ergebnisse.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 22: Vakuolisierung.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 23: Vakuolisierung.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 24: Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 25: CAE- positive Zellen.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 26: CAE- positive Zellen Histologie in RPP I.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 27: PCNA Färbung.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 28: PCNA Histologie in RPPI.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 29: Serologische Parameter und Gallenfluss.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 30: Gallengangsmorphologie und Arterienanzahl im Vergleich.....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 31: CAE Ergebnisse im Vergleich.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 32: PCNA- positive Zellen im Vergleich.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 33: Serologische Parameter im Vergleich.....</i>	<i>59</i>

7.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entwicklung einer ITBL.....</i>	<i>10</i>
<i>Tabelle 2: Western Blot: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 3: Berechnung der Gallengangparameter.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 4: MRT Sequenzen</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 5: Aufteilung der Versuchstiere.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 6: Anzahl der in den Versuch eingeschlossenen Tiere</i>	<i>34</i>

8 Literaturverzeichnis

1. Abt P, Crawford M, Desai N, Markmann J, Olthoff K, Shaked A (2003): Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: an increased incidence of biliary complications. *Transplantation* 75: 1659–1663
2. Akamatsu N, Sugawara Y, Hashimoto D (2011): Biliary reconstruction, its complications and management of biliary complications after adult liver transplantation: a systematic review of the incidence, risk factors and outcome. *Transpl Int* 24: 379–392
3. Aller M-A, Arias N, Prieto I, Agudo S, Gilsanz C, Lorente L, Arias J-L, Arias J (2012): A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J Hepatol* 4: 199–208
4. Alpini G, Lenzi R, Zhai WR, Slott PA, Liu MH, Sarkozi L, Tavoloni N (1989): Bile secretory function of intrahepatic biliary epithelium in the rat. *Am J Physiol* 257: 124–133
5. Alqahtani SA (2012): Update in liver transplantation. *Curr Opin Gastroenterol* 28: 230–238
6. Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, Lienhart A, Scoazec J-Y, Rosmorduc O, Housset C (2005): Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. *J Hepatol* 42: 257–265
7. Belli LS, Burroughs AK, Burra P, Alberti AB, Samonakis D, Cammà C, De Carlis L, Minola E, Quaglia A, Zavaglia C, et al. (2007): Liver transplantation for HCV cirrhosis: improved survival in recent years and increased severity of recurrent disease in female recipients: results of a long term retrospective study. *Liver Transpl* 13: 733–740
8. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW (1978): Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem* 24: 58–73
9. Boraschi P, Braccini G, Gigoni R, Sartoni G, Neri E, Filipponi F, Mosca F, Bartolozzi C (2001): Detection of biliary complications after orthotopic liver transplantation with MR cholangiography. *Magn Reson Imaging* 19: 1097–1105
10. Boraschi P, Donati F, Gigoni R, Volpi A, Salemi S, Filipponi F, Falaschi F (2010): MR cholangiography in orthotopic liver transplantation: sensitivity and specificity in detecting biliary complications. *Clin Transplant* 24: 82–87
11. Bowen A, Hungate RG, Kaye RD, Reyes J, Towbin RB (1996): Imaging in liver transplantation. *Radiol Clin North Am* 34: 757–778
12. Brandsaeter B, Schrupf E, Bentdal O, Brabrand K, Smith HJ, Abildgaard A, Clausen OP, Bjoro K (2005): Recurrent primary sclerosing cholangitis after liver transplantation: a magnetic resonance cholangiography study with analyses of predictive factors. *Liver Transpl* 11: 1361–1369

13. Brown RS Jr, Lake JR (2005): The survival impact of liver transplantation in the MELD era, and the future for organ allocation and distribution. *Am J Transplant* 5: 203–204
14. Buis CI, Hoekstra H, Verdonk RC, Porte RJ (2006): Causes and consequences of ischemic-type biliary lesions after liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 13: 517–524
15. Buis CI, Verdonk RC, Van der Jagt EJ, van der Hilst CS, Slooff MJH, Haagsma EB, Porte RJ (2007): Nonanastomotic biliary strictures after liver transplantation, part 1: Radiological features and risk factors for early vs. late presentation. *Liver Transpl* 13: 708–718
16. Burczynski FJ, Luxon BA, Weisiger RA (1996): Intrahepatic blood flow distribution in the perfused rat liver: effect of hepatic artery perfusion. *Am J Physiol* 271: 561–567
17. Caggiati A, Macchiarelli G, Nottola SA, Vizza E, Familiari G (1992): Scanning electron microscopy of the rabbit gallbladder mucosal microvasculature. *J Anat* 180 (Pt 2): 275–280
18. Calne R (1986): Liver transplantation in the adult. *World journal of surgery* 3: 422–31
19. Campbell WL, Sheng R, Zajko AB, Abu-Elmagd K, Demetris AJ (1994): Intrahepatic biliary strictures after liver transplantation. *Radiology* 191: 735–740
20. Chen WJ, Ying DJ, Liu ZJ, He ZP (1999): Analysis of the arterial supply of the extrahepatic bile ducts and its clinical significance. *Clin Anat* 12: 245–249
21. Christou H, Yoshida A, Arthur V, Morita T, Kourembanas S (1998): Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 768–776
22. Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM (1998): Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 10: 182–191
23. Deltenre P, Valla D-C (2008): Ischemic cholangiopathy. *Semin Liver Dis* 28: 235–246
24. Demetris AJ, Ruppert K, Dvorchik I, Jain A, Minervini M, Nalesnik MA, Randhawa P, Wu T, Zeevi A, Abu-Elmagd K, et al. (2002): Real-time monitoring of acute liver-allograft rejection using the Banff schema. *Transplantation* 74: 1290–1296
25. Deutsche Stiftung Organtransplantation: DSO: Lebertransplantation, <http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/lebertransplantation.html> [30.10.2014]]
26. Doctor RB, Dahl RH, Salter KD, Fitz JG (1999): Reorganization of cholangiocyte membrane domains represents an early event in rat liver ischemia. *Hepatology* 29: 1364–1374

27. Doctor RB, Dahl RH, Salter KD, Fouassier L, Chen J, Fitz JG (2000): ATP depletion in rat cholangiocytes leads to marked internalization of membrane proteins. *Hepatology* 31: 1045–1054
28. Dutkowski P, De Rougemont O, Müllhaupt B, Clavien P-A (2010): Current and future trends in liver transplantation in Europe. *Gastroenterology* 138: 802–809
29. Elimadi A, Sapena R, Settaf A, Le Louet H, Tillement J, Morin D (2001): Attenuation of liver normothermic ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial functions with S-15176, a potent trimetazidine derivative. *Biochem Pharmacol* 62: 509–516
30. Farid WRR, de Jonge J, Sliker JC, Zondervan PE, Thomeer MGJ, Metselaar HJ, de Bruin RWF, Kazemier G (2011): The importance of portal venous blood flow in ischemic-type biliary lesions after liver transplantation. *Am J Transplant* 11: 857–862
31. Feller RB, Waugh RC, Selby WS, Dolan PM, Sheil AG, McCaughan GW (1996): Biliary strictures after liver transplantation: clinical picture, correlates and outcomes. *J Gastroenterol Hepatol* 11: 21–25
32. Feng S (2009): Increased donor risk: who should bear the burden? *Liver Transpl* 15: 570–573
33. Foley DP, Fernandez LA, Levenson G, Chin LT, Krieger N, Cooper JT, Shames BD, Becker YT, Odorico JS, Knechtle SJ, et al. (2005): Donation after cardiac death: the University of Wisconsin experience with liver transplantation. *Ann Surg* 242: 724–731
34. Fondevila C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW (2003): Hepatic ischemia/reperfusion injury- a fresh look. *Exp Mol Pathol* 74: 86–93
35. Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR (2002): The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 122: 889–896
36. Gall JA, Bhathal PS (1990): Origin and involution of hyperplastic bile ductules following total biliary obstruction. *Liver* 10: 106–115
37. Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Marinozzi G (1993): Microcirculation of the extrahepatic biliary tree: a scanning electron microscopy study of corrosion casts. *J Anat* 182 (Pt 1): 37–44
38. Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D (1996): Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology* 111: 1118–1124
39. Gaudio E, Onori P, Franchitto A, Pannarale L, Alpini G, Alvaro D (2005): Hepatic microcirculation and cholangiocyte physiopathology. *Ital J Anat Embryol* 110: 71–75
40. Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marzioni M, Fava G, et al. (2006): Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol*

- Gastrointest Liver Physiol 291: 307–317
41. Gopal DV, Pfau PR, Lucey MR (2003): Endoscopic Management of Biliary Complications After Orthotopic Liver Transplantation. *Curr Treat Options Gastroenterol* 6: 509–515
 42. Guichelaar MMJ, Benson JT, Malinchoc M, Krom RAF, Wiesner RH, Charlton MR (2003): Risk factors for and clinical course of non-anastomotic biliary strictures after liver transplantation. *Am J Transplant* 3: 885–890
 43. Guo S-H, Li C-H, Chen Y-L, Song J-N, Zhang A-Q, Zhou C (2011): Effects of partial portal vein arterialization on the hilar bile duct in a rat model. *HBDP INT* 10: 533–538
 44. Gütgemann A (1969): A case of homologous liver transplantation. *Ger Med Mon* 11: 525–8
 45. Von Haller C (1978): Oxygen measurement and arteriography in the rat and guinea pig liver after artery ligation in the liver hilus. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 25: 35–39
 46. Herrero JI, Lorenzo M, Quiroga J, Sangro B, Pardo F, Rotellar F, Alvarez-Cienfuegos J, Prieto J (2005a): De Novo neoplasia after liver transplantation: an analysis of risk factors and influence on survival. *Liver Transpl* 11: 89–97
 47. Herrero JI, España A, Quiroga J, Sangro B, Pardo F, Álvarez-Cienfuegos J, Prieto J (2005b): Nonmelanoma skin cancer after liver transplantation. Study of risk factors. *Liver Transpl* 11: 1100–1106
 48. Holbert BL, Campbell WL, Skolnick ML (1995): Evaluation of the transplanted liver and postoperative complications. *Radiol Clin North Am* 33: 521–540
 49. Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Sugimachi K (1992): Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology (Baltimore, Md)* 454–461
 50. Imamura H, Rocheleau B, Côté J, Huet PM (1997): Long-term consequence of rat orthotopic liver transplantation with and without hepatic arterial reconstruction: a clinical, pathological, and hemodynamic study. *Hepatology* 26: 198–205
 51. Itai Y, Matsui O (1997): Blood flow and liver imaging. *Radiology* 202: 306–314
 52. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ (1991): Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic Res Commun* 15: 277–284
 53. Jain A, Reyes J, Kashyap R, Dodson SF, Demetris AJ, Ruppert K, Abu-Elmagd K, Marsh W, Madariaga J, Mazariegos G, et al. (2000): Long-term survival after liver transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center. *Ann Surg* 232: 490–500
 54. Jain A, Demetris AJ, Kashyap R, Blakomer K, Ruppert K, Khan A, Rohal S, Starzl

- TE, Fung JJ (2001): Does tacrolimus offer virtual freedom from chronic rejection after primary liver transplantation? Risk and prognostic factors in 1,048 liver transplantations with a mean follow-up of 6 years. *Liver Transpl* 7: 623–630
55. Kamada N, Sumimoto R, Kaneda K (1992): The value of hepatic artery reconstruction as a technique in rat liver transplantation. *Surgery* 111: 195–200
56. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR (2001): A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology* 33: 464–470
57. Kan Z (1996): Dynamic study of iodized oil in the liver and blood supply to hepatic tumors. An experimental investigation in several animal species. *Acta Radiol Suppl* 408: 1–25
58. Kan Z, Madoff DC (2008): Liver anatomy: microcirculation of the liver. *Semin Intervent Radiol* 25: 77–85
59. Kawarada Y, Das BC, Taoka H (2000): Anatomy of the hepatic hilar area: the plate system. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 7: 580–586
60. Keogan MT, McDermott VG, Price SK, Low VH, Baillie J (1999): The role of imaging in the diagnosis and management of biliary complications after liver transplantation. *AJR Am J Roentgenol* 173: 215–219
61. Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H (1997): Cap image -a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168–175
62. Kobayashi S, Nakanuma Y, Terada T, Matsui O (1993): Postmortem survey of bile duct necrosis and biloma in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization therapy: relevance to microvascular damages of peribiliary capillary plexus. *Am J Gastroenterol* 88: 1410–1415
63. Kobayashi S, Nakanuma Y, Matsui O (1994): Intrahepatic peribiliary vascular plexus in various hepatobiliary diseases: a histological survey. *Hum Pathol* 25: 940–946
64. Krom RA, Sanchez-Urdazpal L (1992): The biliary tree - the Achilles tendon of liver preservation? *Transplantation* 53: 1167
65. Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW (2005): Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 37: 1653–1656
66. Leise MD, Kim WR, Kremers WK, Larson JJ, Benson JT, Therneau TM (2011): A revised model for end-stage liver disease optimizes prediction of mortality among patients awaiting liver transplantation. *Gastroenterology* 140: 1952–1960
67. Lerut J, Gordon RD, Iwatsuki S, Starzl TE (1987): Surgical complications in human orthotopic liver transplantation. *Acta Chir Belg* 87: 193–204
68. Lesage G, Glaser S, Ueno Y, Alvaro D, Baiocchi L, Kanno N, Phinizy JL, Francis H, Alpini G (2001): Regression of cholangiocyte proliferation after cessation of ANIT

- feeding is coupled with increased apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: 182–190
69. Li D-Z, Jiang J, Miao Y (2011a): Cholangiocytes of cirrhotic rats are more tolerant to ischemia than normal rats: a role for abnormal hepatic arteriovenous communications? *J Surg Res* 169: 167–174
 70. Li G-L, Lin H-M, Long T-Z, Lv L-H, Yu J-D, Huang Y-H, Min J, Wan Y-L (2011b): High incidence of biliary complications in rat liver transplantation: can we avoid it? *World J Gastroenterol* 17: 3140–3144
 71. Li S, Stratta RJ, Langnas AN, Wood RP, Marujo W, Shaw BW Jr (1992): Diffuse biliary tract injury after orthotopic liver transplantation. *Am J Surg* 164: 536–540
 72. Li W-G, Chen Y-L, Chen J-X, Qu L, Xue B-D, Peng Z-H, Huang Z-Q (2008): Portal venous arterialization resulting in increased portal inflow and portal vein wall thickness in rats. *World J Gastroenterol* 14: 6681–6688
 73. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275
 74. Ludwig J, Batts KP, MacCarty RL (1992): Ischemic cholangitis in hepatic allografts. *Mayo Clin Proc* 67: 519–526
 75. Maheshwari A, Maley W, Li Z, Thuluvath PJ (2007): Biliary complications and outcomes of liver transplantation from donors after cardiac death. *Liver Transpl* 13: 1645–1653
 76. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC (2000): A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 31: 864–871
 77. Matsumoto Y, McCaughan GW, Painter DM, Bishop GA (1993): Evidence that portal tract microvascular destruction precedes bile duct loss in human liver allograft rejection. *Transplantation* 56: 69–75
 78. Moline SW, Glenner GG (1964): Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen. *J Histochem Cytochem* 12: 777–783
 79. Morelli J, Mulcahy HE, Willner IR, Baliga P, Chavin KD, Patel R, Payne M, Cotton PB, Hawes R, Reuben A, Cunningham JT (2001): Endoscopic treatment of post-liver transplantation biliary leaks with stent placement across the leak site. *Gastrointest Endosc* 54: 471–475
 80. Murakami T, Itoshima T, Shimada Y (1974): Peribiliary portal system in the monkey liver as evidenced by the injection replica scanning electron microscope method. *Arch Histol Jpn* 37: 245–260
 81. Nakamura N, Nishida S, Neff GR, Vaidya A, Levi DM, Kato T, Ruiz P, Tzakis AG, Madariaga JR (2005): Intrahepatic biliary strictures without hepatic artery thrombosis after liver transplantation: an analysis of 1,113 liver transplantations at a single center. *Transplantation* 79: 427–432

82. Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M (1997): Microstructure and development of the normal and pathologic biliary tract in humans, including blood supply. *Microsc Res Tech* 38: 552–570
83. Narang TK, Ahrens W, Russo MW (2010): Post-liver transplant cholestatic hepatitis C: a systematic review of clinical and pathological findings and application of consensus criteria. *Liver Transpl* 16: 1228–1235
84. Nishida S, Nakamura N, Kadono J, Komokata T, Sakata R, Madariaga JR, Tzakis AG (2006): Intrahepatic biliary strictures after liver transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 13: 511–516
85. Noack K, Bronk SF, Kato A, Gores GJ (1993): The greater vulnerability of bile duct cells to reoxygenation injury than to anoxia. Implications for the pathogenesis of biliary strictures after liver transplantation. *Transplantation* 56: 495–500
86. Northover JM, Terblanche J (1979): A new look at the arterial supply of the bile duct in man and its surgical implications. *Br J Surg* 66: 379–384
87. O'Connor TP, Lewis WD, Jenkins RL (1995): Biliary tract complications after liver transplantation. *Arch Surg* 130: 312–317
88. Prado IB, dos Santos MHH, Lopasso FP, Iriya K, Laudanna AA (2003): Cholestasis in a murine experimental model: lesions include hepatocyte ischemic necrosis. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 58: 27–32
89. Raia S, Nery JR, Mies S (1989): Liver transplantation from live donors. *Lancet* 2: 497
90. Rappaport A (1958): The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat Rec* 130: 673–689
91. Rappaport AM (1973): The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc Res* 6: 212–228
92. Rappaport AM, Kniseli MH, Ridout JH, Best CH (1958): Microcirculatory changes in the liver of choline-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 97: 522–524
93. Rerknimitr R, Sherman S, Fogel EL, Kalayci C, Lumeng L, Chalasani N, Kwo P, Lehman GA (2002): Biliary tract complications after orthotopic liver transplantation with choledochocholedochostomy anastomosis: endoscopic findings and results of therapy. *Gastrointest Endosc* 55: 224–231
94. Rhodin JA (1967): The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters. *J Ultrastruct Res* 18: 181–223
95. Rodriguez-Garay EA, Larocca C, Pisani G, del Luján Alvarez M, Rodriguez GP (1999): Adaptive hepatic changes in mild stenosis of the common bile duct in the rat. *Res Exp Med (Berl)* 198: 307–323
96. Rodríguez-Garay EA, Agüero RM, Pisani G, Trbojevich RA, Farroni A, Viglianco RA (1996): Rat model of mild stenosis of the common bile duct. *Res Exp Med (Berl)* 196: 105–116

97. Rodríguez-Perálvarez ML (2011): Current challenges and future trends in liver transplantation. *Digestive and Liver Disease Supplements Volume 5*: 2–5
98. Rull R, Garcia Valdecasas JC, Grande L, Fuster J, Lacy AM, González FX, Rimola A, Navasa M, Iglesias C, Visa J (2001): Intrahepatic biliary lesions after orthotopic liver transplantation. *Transpl Int* 14: 129–134
99. Saab S, Martin P, Soliman GY, Machicado GA, Roth BE, Kunder G, Han SH, Farmer DG, Ghobrial RM, Busuttill RW, Bedford RA (2000): Endoscopic management of biliary leaks after T-tube removal in liver transplant recipients: nasobiliary drainage versus biliary stenting. *Liver Transpl* 6: 627–632
100. Sanchez-Urdazpal L, Sterioff S, Janes C, Schwerman L, Rosen C, Krom RA (1991): Increased bile duct complications in ABO incompatible liver transplant recipients. *Transplant Proc* 23: 1440–1441
101. Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Wahlstrom HE, Moore SB, Wiesner RH, Krom RA (1992): Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 16: 49–53
102. Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Buckel EG, Steers JL, Wiesner RH, Krom RA (1993): Diagnostic features and clinical outcome of ischemic-type biliary complications after liver transplantation. *Hepatology* 17: 605–609
103. Schemmer P, Bradford BU, Bunzendahl H, Lemasters JJ, Thurman RG (2000): Gentle in situ liver manipulation during organ harvest increases oxygen consumption in liver. *Transplant Proc* 32: 112
104. Schemmer P, Enomoto N, Bradford BU, Bunzendahl H, Raleigh JA, Thurman RG (2001): Autonomic nervous system and gut-derived endotoxin: involvement in activation of Kupffer cells after in situ organ manipulation. *World J Surg* 25: 399–406
105. Schemmer, P (2013): VIS Veranstaltung Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie Universitätsklinikum Heidelberg "Transplantationsmedizin – zwischen Anspruch und Wirklichkeit". Vortrag VIS Veranstaltung 27.09.2013
106. Schlitt HJ, Meier PN, Nashan B, Oldhafer KJ, Boeker K, Flemming P, Raab R, Manns MP, Pichlmayr R (1999): Reconstructive surgery for ischemic-type lesions at the bile duct bifurcation after liver transplantation. *Ann Surg* 229: 137–145
107. Sekas G (1990): A technique for creating partial obstruction of the common bile duct in the rat. *Lab Anim* 24: 284–287
108. Sharma P, Welch K, Eikstadt R, Marrero JA, Fontana RJ, Lok AS (2009): Renal outcomes after liver transplantation in the model for end-stage liver disease era. *Liver Transpl* 15: 1142–1148
109. Sharma S, Gurakar A, Jabbour N (2008): Biliary strictures following liver transplantation: past, present and preventive strategies. *Liver Transpl* 14: 759–769
110. Sheng Q-S, Chen D-Z, Lang R, He Q, Yang Y-J, Qu Z-W, Zhao D-F, Zhang X-S (2009): Establishment of an animal model of ischemic type intrahepatic biliary lesion

in rabbits. *World J Gastroenterol* 15: 732–736

111. Sibulesky L, Nguyen JH (2011): Update on biliary strictures in liver transplants. *Transplant Proc* 43: 1760–1764
112. Skaro AI, Jay CL, Baker TB, Wang E, Pasricha S, Lyuksemburg V, Martin JA, Feinglass JM, Preczewski LB, Abecassis MM (2009): The impact of ischemic cholangiopathy in liver transplantation using donors after cardiac death: the untold story. *Surgery* 146: 543–553
113. Slotta J: Reduktion der Endotoxin-induzierten hepatischen Mikrozirkulationsstörung und Organdysfunktion durch Präkonditionierung mit CPG-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN). (2009) Doktorarbeit UKS
114. Soares AF, Castro e Silva Júnior O, Ceneviva R, Roselino JE, Zucoloto S (1993): Biochemical and morphological changes in the liver after hepatic artery ligation in the presence or absence of extrahepatic cholestasis. *Int J Exp Pathol* 74: 367–370
115. Stapleton GN, Hickman R, Terblanche J (1998): Blood supply of the right and left hepatic ducts. *Br J Surg* 85: 202–207
116. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR (1963): Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gynecol Obstet* 117: 659–676
117. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, Blanchard H, Martin AJ Jr, Porter KA (1968): Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 168: 392–415
118. Starzl TE, Ishikawa M, Putnam CW, Porter KA, Picache R, Husberg BS, Halgrimson CG, Schroter G (1974): Progress in and deterrents to orthotopic liver transplantation, with special reference to survival, resistance to hyperacute rejection, and biliary duct reconstruction. *Transplant Proc* 6: 129–139
119. Stratta RJ, Wood RP, Langnas AN, Hollins RR, Bruder KJ, Donovan JP, Burnett DA, Lieberman RP, Lund GB, Pillen TJ (1989): Diagnosis and treatment of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Surgery* 106: 675–683
120. Svensson G, Aldenborg F, Karlberg I (1991): Effect of rearterialization on short-term graft function in orthotopic rat liver transplantation. *Eur Surg Res* 23: 269–277
121. Theilmann L, Küppers B, Kadmon M, Roeren T, Notheisen H, Stiehl A, Otto G (1994): Biliary tract strictures after orthotopic liver transplantation: diagnosis and management. *Endoscopy* 26: 517–522
122. Toki F, Takahashi A, Suzuki M, Ootake S, Hirato J, Kuwano H (2011): Development of an experimental model of cholestasis induced by hypoxic/ischemic damage to the bile duct and liver tissues in infantile rats. *J Gastroenterol* 46: 639–647
123. Tung BY, Kimmey MB (1999): Biliary complications of orthotopic liver transplantation. *Dig Dis* 17: 133–144

124. Vallejo GH, Romero CJ, de Vicente JC (2005): Incidence and risk factors for cancer after liver transplantation. *Crit Rev Oncol Hematol* 56: 87–99
125. Vellar ID (1999): The blood supply of the biliary ductal system and its relevance to vasculobiliary injuries following cholecystectomy. *Aust N Z J Surg* 69: 816–820
126. De Vera ME, Lopez-Solis R, Dvorchik I, Campos S, Morris W, Demetris AJ, Fontes P, Marsh JW (2009): Liver transplantation using donation after cardiac death donors: long-term follow-up from a single center. *Am J Transplant* 9: 773–781
127. Verdonk RC, Buis CI, Porte RJ, Haagsma EB (2006): Biliary complications after liver transplantation: a review. *Scand J Gastroenterol Suppl* 89–101
128. Verdonk RC, van den Berg AP, Slooff MJH, Porte RJ, Haagsma EB (2007a): Liver transplantation: an update. *Neth J Med* 65: 372–380
129. Verdonk RC, Buis CI, van der Jagt EJ, Gouw ASH, Limburg AJ, Slooff MJH, Kleibeuker JH, Porte RJ, Haagsma EB (2007b): Nonanastomotic biliary strictures after liver transplantation, part 2: Management, outcome, and risk factors for disease progression. *Liver Transpl* 13: 725–732
130. Wang L, Florman S, Roayaie S, Basile J, Zhang ZY, Machac J, Boros P, Miller CM (1998): Differential in vivo recovery of sinusoidal endothelial cells, hepatocytes, and Kupffer cells after cold preservation and liver transplantation in rats. *Transplantation* 66: 573–578
131. Wang M-F, Jin Z-K, Chen D-Z, Li X-L, Zhao X, Fan H (2011): Risk factors of severe ischemic biliary complications after liver transplantation. *HBPD INT* 10: 374–379
132. Ward J, Sheridan MB, Guthrie JA, Davies MH, Millson CE, Lodge JPA, Pollard SG, Prasad KR, Toogood GJ, Robinson PJ (2004): Bile duct strictures after hepatobiliary surgery: assessment with MR cholangiography. *Radiology* 231: 101–108
133. Watt KDS, Charlton MR (2010): Metabolic syndrome and liver transplantation: a review and guide to management. *J Hepatol* 53: 199–206
134. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, et al. (2003): Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology* 124: 91–96
135. Wong J, Zhang Y, Lee SS (2001): Hemodynamic characterization of arterialized and nonarterialized liver transplants in the rat. *Can J Gastroenterol* 15: 435–440
136. Xu W-H, Ye Q-F, Xia S-S (2004): Apoptosis and proliferation of intrahepatic bile duct after ischemia-reperfusion injury. *HBPD INT* 3: 428–432
137. Zajko AB, Campbell WL, Logsdon GA, Bron KM, Tzakis A, Esquivel CO, Starzl TE (1987): Cholangiographic findings in hepatic artery occlusion after liver transplantation. *AJR Am J Roentgenol* 149: 485–489
138. Zhao D, Zimmermann A, Wheatley AM (1993): Morphometry of the liver after liver transplantation in the rat: significance of an intact arterial supply. *Hepatology* 17:

310–317

139. Zhao D, Zimmermann A, Kuznetsova LV, Wheatley AM (1995): Regression of bile duct damage and bile duct proliferation in the non-rearterialized transplanted rat liver is associated with spontaneous graft rearterialization. *Hepatology* 21: 1353–1360
140. Zhao DF, Chen DZ, Lv JS, Lang R, Jin ZK, Qing H (2008): Establishment of an animal model of biliary ischemic stenosis with clamping in mice. *Transplant Proc* 40: 1303–1305
141. Zhou B, Zhang P-J, Tian T, Jin C, Li Y, Feng M, Liu X-Y, Jie L, Tao L-D (2010): Role of vascular endothelial growth factor in protection of intrahepatic cholangiocytes mediated by hypoxic preconditioning after liver transplantation in rats. *Transplant Proc* 42: 2457–2462
142. Zhu X-H, Pan J-P, Wu Y-F, Ding Y-T (2012): Effects of warm ischemia time on biliary injury in rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 18: 6308–6314
143. Zhu Z-J, Rao W, Sun J-S, Cai J-Z, Deng Y-L, Zheng H, Zhang Y-M, Jiang W-T, Zhang J-J, Gao W, Shen Z-Y (2008): Liver retransplantation for ischemic-type biliary lesions after orthotopic liver transplantation: a clinical report of 66 cases. *HBPD INT* 7: 471–475

9 Publikation und Dank

9.1 Publikation

Keppler U, Moussavian MR, Jeanmonod P, Strowitzki MJ, Wagner M, Scheuer C, Menger MD, von Heesen M (2015): Morphological alterations in a rat model of hepatic arterial ischemia and reperfusion. (in Planung)

Von Heesen M, **Keppler U**, Menger MD, Moussavian MR (2014): Is an experimental model of ischemic type biliary lesion transferable in rats? (Abstract eingereicht beim Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 2015)

Strowitzki MJ, Moussavian MR, **Keppler U**, Schilling MK, Menger MD, von Heesen M (2014): Isoflurane does not protect from brain death-associated aggravation of cold hepatic ischemia-reperfusion injury. Ann Transpl (zur Publikation angenommen)

9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. M.R. Moussavian für die Überlassung dieses Themas und der Unterstützung während der Versuche und beim Schreiben dieser Arbeit.

Auch Herrn Professor Dr. med. M. D. Menger gilt mein besonderer Dank. Insbesondere für die Möglichkeit die Versuche am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchführen zu dürfen.

Meinem Betreuer Dr. med. M. von Heesen danke ich für die exzellente Betreuung und die Ausbildung am tierexperimentellen Modell. Durch die ständige Motivation und die vielen Nachtschichten konnten die Versuche in so kurzer Zeit fertiggestellt werden.

Weiterhin will ich den Mitarbeitern der experimentellen Chirurgie für ihre tatkräftige Unterstützung und Beratung danken. Auf Grund der langjährigen Erfahrung konnten sie mir in vielen Fällen weiterhelfen, wenn die Versuche in Stocken gerieten. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau S. Schuler für die Hilfe bei den Schnitten und dem Färben sowie der Korrektur dieser Arbeit. Außerdem möchte ich Frau Dr. rer. nat. C. Scheuer für die Hilfe bei den Western Blot Untersuchungen, Herrn Dr. rer. nat. A. Müller für die Betreuung bei der Durchführung der MRT Untersuchungen und Frau E. Gluding für die Unterstützung bei der Betreuung und Nachsorge der Tiere danken. Auch Herrn PD Dr. med. M. Wagner aus dem Institut für Pathologie gilt mein Dank für die konstruktive Kritik und die Beratung bei der Mikroskopie.

Weiterhin möchte ich allen Begleitern während der Zeit in der Experimentellen Chirurgie danken., insbesondere Herrn M.J. Strowitzki und Dr. med. P. Jeanmonod für ihre Hilfe.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie Maria, Albrecht und Jochen Keppler, welche mich auf meinem bisherigen Lebensweg immer unterstützt haben.