

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. N. Senninger –  
Abteilung Chirurgische Forschung  
Leiter: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. H. U. Spiegel

**BEDEUTUNG DES ENDOTHELIN-NITRITOXID-GLEICHGEWICHTS  
IN DER PATHOGENESE VON MIKROZIRKULATIONSSTÖRUNGEN  
NACH LEBERRESEKTION UND TEILLEBERTRANSPLANTATION**

– Eine tierexperimentelle Studie –

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
vorgelegt von

**Harks, Michael Johannes**

aus Warendorf

2005

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. H. U. Spiegel

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. U. Stratmann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.08.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. N. Senninger -  
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. H. U. Spiegel  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. U. Stratmann

### **Zusammenfassung**

#### BEDEUTUNG DES ENDOTHELIN-NITRITOXID-GLEICHGEWICHTS IN DER PATHOGENESE VON MIKROZIRKULATIONSSTÖRUNGEN NACH LEBERRESEKTION UND TEILLEBERTRANSPLANTATION

– Eine tierexperimentelle Studie –

Michael Johannes Harks

**Einleitung:** Im Rahmen der größenreduzierten Lebertransplantation kann das so genannte Small-for-Size-Syndrom (SFS) auftreten, das pathogenetisch möglicherweise auf eine Störung der Mikrozirkulation durch ein Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktischen und vasodilatatorischen Mediatoren, wie z.B. Endothelin-1 (ET-1) und Nitritoxid (NO), zurückzuführen ist. In dieser Studie haben wir die Rolle des ET-1-NO Gleichgewichts und die Wirkung des selektiven Endothelin-A Rezeptor (ETAR) Antagonisten Darusentan<sup>®</sup> auf SFS-Schädigung nach Leberresektion und nach größenreduzierter Lebertransplantation (LTX) untersucht.

**Material und Methoden:** 126 männliche, isogene Lewis-Ratten wurden in fünf Versuchsgruppen unterteilt. In den Gruppen I (ohne Therapie) und II (mit Therapie durch Darusentan<sup>®</sup> 1 mg/kg KG i.v.) wurde eine 70 %-ige Leberresektion mit Belassen des linken Leberlappens (30 % Restlebergröße) durchgeführt. In den Gruppen III (ohne Therapie) und IV (mit Darusentan<sup>®</sup> 1 mg/kg KG i.v.) wurde eine größenreduzierte LTX mit einer Transplantatgröße von 30 % durchgeführt. Die Gruppe V fungierte als Scheinoperationsgruppe. Mittels der Intravitalmikroskopie wurde die Lebermikrozirkulation eruiert. Die Überlebensrate und die Leberfunktion wurden bis zum 14. Tag bestimmt. ET-1, ETAR, die endotheliale NO-Synthase (eNOS), Kupfferzell-Rekrutierung und Leberparenchymschäden wurden morphologisch und immunhistochemisch untersucht.

**Ergebnisse:** Nach größenreduzierter LTX kommt es zu einer erhöhten ET-1- und ETAR- sowie zu einer reduzierten eNOS-Proteinexpression, die mit einer erhöhten Kupfferzell-Rekrutierung, reduzierten Perfusionrate, Vasokonstriktion, einem erhöhten sinusoidalen Blutfluss und Leberzellschädigung mit konsekutiv beeinträchtigter Leberfunktion und Überlebensrate einhergeht. Die Behandlung mit Darusentan<sup>®</sup> (Gruppe II und IV) führte zu einer Aufrechterhaltung des ET-1/NO-Gleichgewichts, Reduktion der Mikrozirkulationsstörungen und der Leberzellschädigung, beeinflusste jedoch nicht die Überlebensrate.

**Diskussion:** Mikrozirkulationsstörungen infolge eines ET-1/NO-Ungleichgewichtes können zum SFS-Syndrom nach größenreduzierter LTX beitragen. Die Aufrechterhaltung des ET-1/NO-Gleichgewichts durch ETAR-Blockade reduziert das SFS-Syndrom durch Protektion der Mikrozirkulation und Reduktion der konsekutiven Leberzellschädigung.

**Tag der mündlichen Prüfung: 05.08.2005**

Meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Allgemeiner Teil</b>	<b>3</b>
2.1	Pathogenese der Leberzellschädigung und -regeneration	3
2.1.1	Leberzellschädigung	3
2.1.2	Leberzellregeneration	4
2.2	Mikrozirkulation der Leber	6
2.2.1	Morphologisches Korrelat der Lebermikrozirkulation	6
2.2.2	Regulationsmechanismen der hepatischen Mikrozirkulation	11
2.2.3	Vasoaktive Mediatoren nach Leberschädigung	12
2.2.4	Bedeutung vasoaktiver Mediatoren beim Pfortaderhochdruck	14
2.3	Leberresektion und Teil-Lebertransplantation	15
2.3.1	Konzept	15
2.3.2	Small-for-size Syndrom	17
2.4	Ziel der Studie	18
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Versuchstiere und Studiendesign	19
3.2	Versuchsgruppen	19
3.3	Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht (LWBWR)	21
3.4	Versuchsdurchführung	22
3.5	Methoden	23
3.5.1	Schein-Operation	23
3.5.2	Partielle Leberresektion (Gruppe I + II)	25
3.5.3	Größenreduzierte Lebertransplantation (Gruppe III + IV)	25
3.5.4	Intravitalmikroskopie	28
3.5.5	Bestimmung der Serumparameter	32
3.5.6	Immunhistochemie	32
3.6	Statistik	35

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1	Operative Ergebnisse	36
4.2	Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht (LWBWR)	36
4.3	Überlebensrate	37
4.4	Mikrozirkulation	39
4.4.1	Perfusionsrate	39
4.4.2	Gefäßdurchmesser	40
4.4.3	Flussgeschwindigkeit	41
4.4.4	Leukozyten-Endothel-Interaktion	43
4.5	Serumchemie	45
4.6	Morphologie und Immunhistochemie	51
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
5.1	Klinischer Stellenwert der Therapie des Small-for-size nach größenreduzierter Lebertransplantation	57
5.2	Entwicklung eines experimentellen Modells der größenreduzierten Lebertransplantation an der Ratte	58
5.3	Intravitalmikroskopie als Methode zur Beurteilung der Mikrozirkulation	60
5.4	Mikrozirkulationsstörungen in der Pathogenese von Funktionsstörungen nach größenreduzierter Lebertransplantation	61
5.5	ET-1/NO-Gleichgewicht als therapeutischer Angriffspunkt	64
5.6	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	65
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	I
7.2	Signifikanzindices	II
7.3	Tabellenanhang	III
7.4	Lebenslauf	XV
7.5	Danksagung	XVI
7.6	Versuchsgenehmigung	XVII

## 1 EINLEITUNG

Die zunehmende Ausweitung der Indikationsstellung der Lebertransplantation, von der Therapie der terminalen Leberinsuffizienz bis zur Therapie von Lebertumoren oder Korrektur angeborener Stoffwechselerkrankungen, hat zu einem erhöhten Bedarf an Spenderorganen und damit zu neuen Strategien der Bereitstellung von Spenderorganen geführt. Durch die einzigartige Regenerationsfähigkeit der Leber wurde das Konzept der größenreduzierten Lebertransplantation entwickelt, das die Transplantation von Teil-Lebertransplantaten, entweder nach Lebendspende oder Splitting einer Transplantatleber mit konsekutiver Regeneration entsprechend der funktionellen Anforderungen des Empfängers vorsieht [14, 31, 74]. Während bei kindlichen Empfängern mit größenreduzierten Lebertransplantaten gute Erfolge erzielt werden konnten, besteht bei erwachsenen Empfängern die Gefahr eines postoperativen Leberversagens infolge einer zu kleinen Transplantatgröße, dem sog. small-for-size-Syndrom (SFS) [14]. Insbesondere nach Lebendspende muss ein Kompromiss zwischen einer für den Empfänger ausreichenden Transplantatgröße und einer dem Spender nicht gefährdenden Restlebergröße gefunden werden [27].

Im Gegensatz zu „klassischen“ Leberresektionen, z.B. in der Chirurgie von Lebertumoren, bei denen ein Residualvolumen von bis zu 25 % des normalen, gesunden Leberparenchyms ausreichend ist, werden bei der Transplantation von größenreduzierten Lebertransplantaten ca. 40 % Residualvolumen zur Prävention eines postoperativen Leberversagens als notwendig angesehen [19, 37]. Ursächlich hierfür ist in erster Linie der Ischämie-/ Reperfusionsschaden (I/R) anzusehen. Neue Untersuchungen konnten jedoch darüber hinaus die schädigende Rolle der portalen Überperfusion in größenreduzierten Lebertransplantaten sowie eine Verbesserung der Transplantatfunktion durch portale Dekompression und Optimierung des venösen Abflusses zeigen [7, 14]. Das Verhältnis des Transplantationsgewichts zum Empfängergewicht (GRBWR = graft weight to recipient body weight ratio) stellt derzeit eine Möglichkeit zur Beurteilung der minimalen erforderlichen Transplantatgröße zur Vermeidung des postoperativen SFS dar [14, 19, 26, 37, 57]. Hierbei wird bei Spenderlebern ohne Vorschädigung eine GRBWR von

mehr als 1 % gefordert, im Falle von weniger als 0,8 % tritt mit hoher Wahrscheinlichkeit das gefürchtete SFS ein [19, 26, 57].

Mikrozirkulationsstörungen spielen möglicherweise eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des SFS nach größenreduzierter Lebertransplantation, da sich die Leberschädigung primär auf der Ebene der Mikrozirkulation manifestiert. Die Regulation der Mikrozirkulation in der Leber erfolgt auf sinusoidaler Ebene durch vasoaktive Substanzen, wie z.B. durch den Vasokonstriktor Endothelin-1 (ET-1) und dem Vasodilatator Nitritoxid (NO). ET-1 wird als vasoaktiver Mediator in den sinusoidalen Endothelzellen synthetisiert und übt seine Wirkung über Endothelin-A Rezeptoren, die größtenteils auf Ito-Zellen lokalisiert sind, aus [24, 91]. Unter physiologischen Bedingungen wird die Wirkung von ET-1 durch vasodilatierende Mediatoren, wie z.B. dem NO, das z.B. von der endothelständigen NO-Synthetase (eNOS) aus L-Arginin gebildet wird, ausgeglichen. In der geschädigten Leber, z.B. beim I/R-Schaden, ist die ET-1-Produktion erhöht, während die NO-Freisetzung aus sinusoidalen Endothelzellen erniedrigt ist mit der Folge einer reduzierten Perfusionsrate, eines reduzierten Sinusoiddurchmessers und einer erhöhten Leukozyten-Endothel-Interaktion [45, 71].

Ziel dieser Studie war deshalb die Untersuchung der Rolle des ET-1/NO Gleichgewichts und die Auswirkungen von Darusentan<sup>®</sup> auf die SFS-Leberschädigung nach Leberresektion (Simulation des Spenders nach Lebendspende) und nach größenreduzierter Lebertransplantation (Simulation des Transplantatempfängers).

## **2 ALLGEMEINER TEIL**

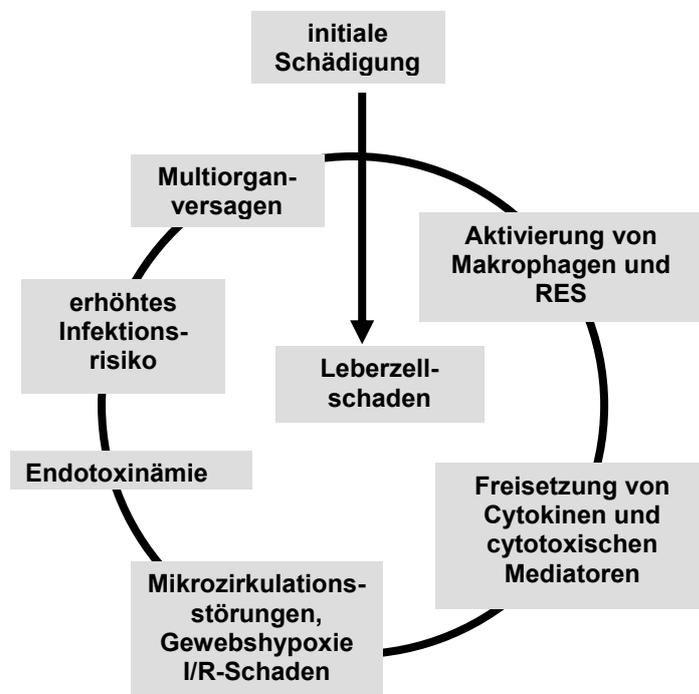
Für das Verständnis der Pathogenese des SFS und der Leberregeneration nach größenreduzierter Lebertransplantation sind genaue Kenntnisse über die Mechanismen der Leberzellschädigung und -regeneration sowie deren morphologischen Korrelate unerlässlich, über die im Folgenden ein Überblick gegeben wird.

### **2.1 Pathogenese der Leberzellschädigung und -regeneration**

#### **2.1.1 Leberzellschädigung**

Die Leberzellschädigung resultiert in Abhängigkeit von der Art, Dauer und Schwere der Einwirkung der initialen Noxe in dem Zelluntergang durch Nekrose, Apoptose oder Nekrapoptose [80]. Neben der primären Schädigung durch die initiale Noxe auf die Leberzellen kommt es auch zu einer sekundären Schädigung im Sinne eines Circulus vitiosus durch Freisetzung von Zytokinen und zytotoxischen Mediatoren aus aktivierten Zellen des RES, wie z.B. Kupfferzellen (Abb. 1). So führen die von Kupfferzellen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , Interleukin (IL-1 und IL-6) u.a. zu einer verstärkten Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Sinusoidendothel mit der Folge der Migration der Neutrophilen in das Leberparenchym [21, 47]. Diese aktivierten neutrophilen Granulozyten setzen nun u. a. große Mengen von freien Radikalen und Proteasen frei, die das Leberparenchym durch Lipidperoxidation der Zellmembranen weiter schädigen [47]. Toxische Sauerstoffradikale, die z.B. aus aktivierten Kupfferzellen aus Sauerstoff unter ATP-Mangel oder oxidativem Stress infolge der Umwandlung des Enzyms Xanthin-Dehydrogenase in eine Xanthin-Oxygenase entstehen, führen über Lipidperoxidation zu einer Schädigung der Plasma- und Organellenmembranen mit konsekutivem Zelltod [68]. Stimuliert durch Zytokine können in Kupfferzellen und Hepatozyten auch Stickoxid-Radikale über eine induzierbare NO-Synthetase (iNOS) gebildet werden, die zytotoxisch wirken können, indem sie mit Sauerstoffverbindungen reagieren [68]. Die Aktivierung und Schädigung von sinusoidalen Endothelzellen führen zu Störungen der hepatischen Mikrozirkulation mit sinusoidaler

Vasokonstriktion und Perfusionsversagen, Gewebshypoxie und konsekutivem Zelltod [62, 72]. Darüber hinaus kommt es zu einer Endotoxinämie infolge einer unzureichenden Endotoxineliminierung der Kupfferzellen. Endotoxine aktivieren die sinusoidalen Endothelzellen und Kupfferzellen und führen zur Freisetzung vasokonstriktiver und proinflammatorischer Mediatoren mit der Folge einer Verstärkung der Mikrozirkulationsstörung und der hepatozellulären Schädigung [25]. Darüber hinaus tragen die betroffenen Patienten ein erheblich erhöhtes Infektionsrisiko aufgrund der eingeschränkten Funktion der phagozytierenden Kupfferzellen, der beeinträchtigten Bildung von Komplementfaktoren und der Durchführung invasiver therapeutischer Maßnahmen, die iatrogene Infektionsquellen bieten [44].



**Abb. 1:**  
**Pathogenese der**  
**Leberschädigung**

### 2.1.2 Leberzellregeneration

Die Leber regeneriert sich über Proliferation der bestehenden reifen Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen. Erst wenn die Proliferationsantwort der Hepatozyten zu langsam oder nur ungenügend erfolgt, wird ein sekundäres Proliferationskompartiment aktiviert, das aus hepatischen Stammzellen oder ihren Nachfolgern (sog. „oval cells“) be-

steht [39]. Die meisten Erkenntnisse der Leberzellregeneration beziehen sich auf die Hepatozytenregeneration und wurden überwiegend an Modellen der partiellen Leberresektion durchgeführt [55]. Hierbei handelt es sich allerdings eher um eine kompensatorische Hyperplasie des zurückbleibenden Gewebes als um eine echte Regeneration der resezierten Anteile [39].

Jede Form der Leberzellschädigung stimuliert die überlebenden Hepatozyten zur Proliferation [39, 93]. Nach einer Leberschädigung verlassen sie ihren Ruhezustand (G-0-Phase) und treten in die proliferativen Stadien des Zellzyklus ein. Durch „Priming-Faktoren“ (z.B. TNF- $\alpha$ , Il-6) werden die Hepatozyten gegenüber den Einflüssen von Wachstumsfaktoren (z.B. HGF, EGF, TGF- $\alpha$ ) erheblich stärker sensibilisiert [39]. Molekularbiologisch zeigt sich diese Sensibilisierung durch „Priming“ in einer Genaktivierung, z.B. in Form der Expression von ca. 70 „immediate early genes“ [17]. In der prä-replikativen Phase (G-1 Phase) erfolgen die Duplizierung notwendiger Zellkomponenten und die Synthese neuer proliferationspezifischer Moleküle. In der nachfolgenden Synthesephase (S-Phase) wird die DNS repliziert. Die Weiterentwicklung zur G-1-Phase und S-Phase ist abhängig von der Stimulation der Zelle durch Wachstumsfaktoren. Bleibt diese aus, so ist das Priming reversibel und die Zelle tritt wieder in den Ruhezustand ein [12, 17]. Die Wachstumsfaktoren lassen sich in komplette Mitogene (z.B. EGF, TGF- $\alpha$ , HGF), die auch *in vitro* eine DNS-Synthese bewirken und in Co-Mitogene (z.B. Insulin, Glukagon, Schilddrüsenhormone), die lediglich die Mitogen induzierte DNS-Replikation verstärken können, unterteilen [39]. Molekularbiologisch kommt es zur „delayed early gene“ Antwort mit Expression von weiteren Zellzyklusgenen, wie z.B. von Cyclin D1 und E, durch welche die Zelle unabhängig von der Stimulation durch Wachstumsfaktoren wird („G1 restriction point“) und autonom den Zellzyklus beendet [40]. Anschließend folgt die postreplikative Phase (G-2 Phase), in der die Zelle Moleküle synthetisiert, die zur nachfolgenden Zellteilung bzw. Mitose (M-Phase) benötigt werden [93]. Nach ein oder zwei Runden der Replikation verlassen die Hepatozyten den Zellzyklus und treten wieder in den Ruhezustand (G-0 Phase) ein. Hierbei wird der Prozess der Leberzellregeneration terminiert, indem die proliferierenden Hepatozyten wieder empfindlich gegenüber der Wirkung von den Inhibitoren, wie z.B. TGF- $\beta$  und Activin A werden, wenn die erforderliche funktionelle Kapazität wieder hergestellt ist und den metabolischen Anforderungen an die Leber genügt [39, 40].

Darüber hinaus wird das Wiedererreichen der physiologischen Lebermasse durch ein Apoptose- Proliferationsgleichgewicht reguliert, das durch verschiedene Systeme, wie z.B. Apoptoseinduktion und -inhibition sowie Metalloproteinasen und -inhibitoren kontrolliert bzw. beeinflusst werden kann. Die Leberregeneration ist zudem abhängig von einer fein abgestimmten Interaktion zwischen Parenchym- und Nicht-Parenchymzellen, da die meisten Wachstumsfaktoren von Nicht-Parenchymzellen gebildet werden [17, 93]. Die Regeneration von Nicht-Parenchymzellen, wie z.B. von sinusoidalen Endothelzellen, ist jedoch noch überwiegend unbekannt. Ihr Proliferationszyklus unterliegt einem anderen Zeitmuster als der von Hepatozyten. Während Ratten-Hepatozyten nach Hepatektomie nahezu sofort nach dem Ereignis in die G-1 Phase eintreten, die S-Phase zwölf bis 15 Stunden postoperativ erreichen und sich bereits nach weiteren sechs bis acht Stunden in der Mitosephase befinden, ist die Replikation von Nicht-Parenchymzellen um 24 Stunden verspätet. Dies ist zurückzuführen auf eine verlängerte G-1 Phase [12, 17].

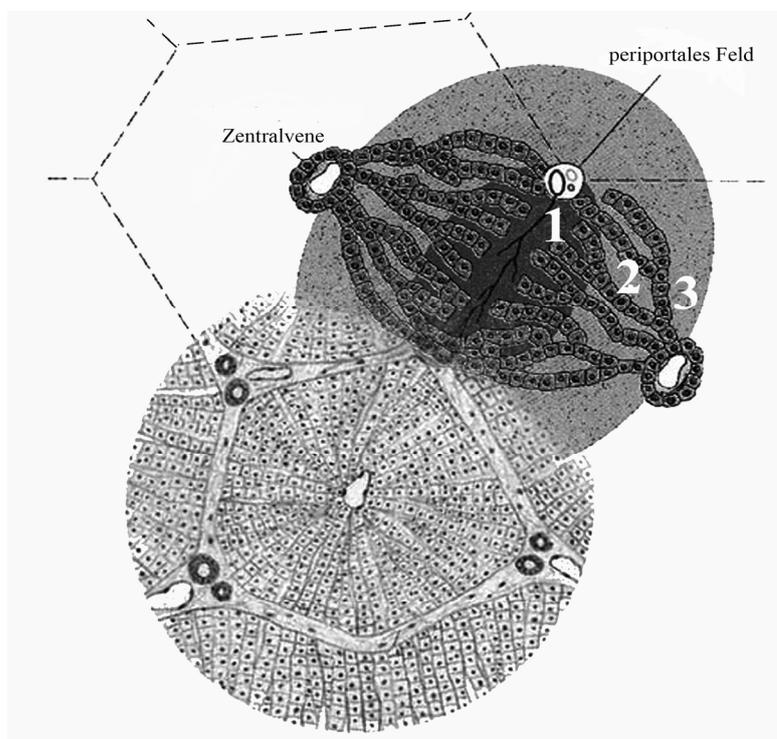
## **2.2 Mikrozirkulation der Leber**

### **2.2.1 Morphologisches Korrelat der Lebermikrozirkulation**

#### *Leberläppchen und Leberazinus*

Die klassische strukturelle Untereinheit der Leber ist das Leberläppchen, dessen äußere Begrenzungen die Portalfelder mit der *Glisson*-Triade darstellen, die aus einem Ast der V. portae, A. hepatica und einem Gallengangsast bestehen. Im Zentrum des im Querschnitt einem Polygon gleichenden Leberläppchens verläuft die Zentralvene. Die Definition des Leberazinus durch *Rappaport*, der eine Untereinheit des Leberparenchyms darstellt, geht auf Untersuchungen der Mikrozirkulation zurück [58]. Dabei bilden die zuführenden interlobulär verlaufenden Äste der V. portae und der A. hepatica zusammen mit den Ästen des Gallenganges die Achse des Azinus. Am Anfang und am Ende der Gefäßachse liegt jeweils eine *Glisson*-Triade, die beiden anderen Eckpunkte des Azinus werden von je einer zentralen Vene bzw. terminalen Vene gebildet. Die Sinusoide ziehen radiär von der Achse des Azinus zu den terminalen Venen. Da auf diesem

Weg der Austausch von Sauerstoff, Kohlendioxid und Metaboliten mit den Hepatozyten erfolgt, wurden von Rappaport drei Zonen definiert. Zur Zone 1 gehören die Hepatozyten, die als erstes mit dem der Leber zugeführten Blut in Kontakt kommen. Dieses Blut ist mit einem hohen Angebot an Sauerstoff und Substraten versetzt. Die in Zone 2 gelegenen Hepatozyten erhalten daher Blut mit reduziertem Angebot. Das Blut, das die Hepatozyten der Zone 3 erreicht, wurde von den beiden vorausgehenden Zonen stark verändert und die Zellen dieser Zone reagieren am empfindlichsten gegenüber Ischämie, Anoxie, Blutstauung und Nährstoffmangel.



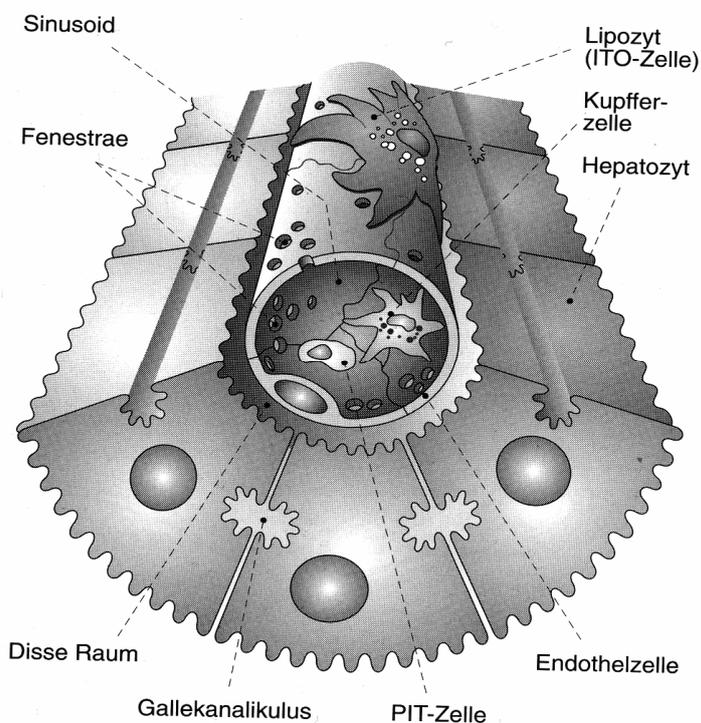
**Abb. 2:**  
**Leberazinus**

Definition durch *Rappaport* mit einer periportalen (1), mittzonalen (2) und perizentralen Zone (3)

### *Sinusoide*

Besondere Bedeutung für die Leberfunktion haben die basalmembranlosen Sinusoide, die von zwei Blutsystemen, dem portalen und arteriellen System, genährt werden und die gemeinsame Endstrecke beider Systeme darstellen [33]. Die Sinusoide werden von vier verschiedenen Zelltypen (Sinusendothelzellen, Kupfferzellen, Ito-Zellen, Pitzellen) ausgekleidet und bilden keinen geschlossenen Zellverband, wie die Endothelzellen in den Kapillaren, wodurch interzelluläre Öffnungen (Durchmesser 0,1 - 0,5  $\mu\text{m}$ ) entstehen. Sie besitzen Fenestrae, dessen Weite aktiv kontrolliert wird [89] und eine Verbindung zwischen dem Gefäßlumen und dem *Dissé*-Raum herstellt. Diese Struktu-

rierung erlaubt Serumbestandteilen, unbehindert vom Gefäßlumen in den Dissé-Raum überzutreten und die angrenzende sinusoidale Membran der Hepatozyten zu erreichen. Auch werden Blutdruckschwankungen des Lumens unbehindert auf den *Dissé*-Raum übertragen und es kommt zu einer Erhöhung der metabolischen Austauschfläche. Als intersinusoidale Sinusoide bezeichnet man kurze Sinusoide, die zwei parallel verlaufende Sinusoide miteinander verbinden [87]. Der Blutfluss durch die Sinusoide wird durch Einlass- und Ausstromsphinkter, durch intersinusoidalen Sinusoiden, durch Endothelzellschwellung, Kupfer-Zellvorwölbung und bei pathologischen Zuständen wahrscheinlich durch Kontraktion der Ito-Zellen kontrolliert [43].



**Abb. 3:  
Sinusoid**

(Nach Kaplowitz N., *Liver and Biliary Diseases*, 1992, Williams & Wilkins)

### *Hepatozyten*

Die Hepatozyten sind Parenchymzellen der Leber, die sowohl an die Sinusoide als auch an die Gallenkanälchen angrenzen. Aufgrund ihrer Lokalisation lassen sich die periportalen von den perivenösen Hepatozyten unterscheiden, die aber untereinander stark variieren. Jeder Hepatozyt pflegt eine enge Beziehung mit den benachbarten Parenchymzellen, dem Gallenkanälchen und dem *Dissé*-Raum. An der dem *Dissé*-Raum zugewandten Seite besitzen die Hepatozyten viele Mikrovilli, um die Fläche für den Austausch zwischen intra- und extrazellulärem Raum zu vergrößern [18, 66]. In dem interzellulären Raum befinden sich zahlreiche Haftkomplexe wie Zonulae adherentes und Desmoso-

men, vor allem aber Gap junctions, die die Hepatozyten untereinander verbinden [33] und die Zonulae occludentes (Tight junctions), die die Gallenkanälchen abdichten. Aufgrund der vielfältigen Funktionen besitzen die Hepatozyten ein gut ausgebildetes System an Zellorganellen.

### *Sinusendothelzellen*

Die den Hauptteil der Sinusoide bildenden Sinusendothelzellen findet man nur in der Leber und sie lassen sich gut von den Kapillarendothelzellen abgrenzen. Auf raster-elektronenmikroskopischen Aufnahmen besitzen die Sinusendothelzellen eine relativ glatte Oberfläche, die durch Poren, den so genannten Fenestrae (Durchmesser 100 nm) durchsetzt sind, wobei der Gesamtquerschnitt der Fenestrae einer Sinusendothelzelle etwa 6 - 8 % von der Gesamtoberfläche erreicht. Die Fenestrae sind nicht immer gleichmäßig verteilt, sondern in bestimmten Arealen konzentriert („Cluster, Siebplatte“) und werden bei Hypoxie, Einwirkung von Endotoxinen und Drucksteigerung in den Sinusoiden weit und starr [89]. Die organellenarmen Sinusendothelzellen beinhalten eine große Zahl von Mikropinozytosevesikeln, die zur Phagozytose befähigen [22] und Adhäsionsmoleküle für Leukozyten, sog. Selektine (ELAM: endothelium-leukocyte adhesion molecule bzw. ICAM: intercellular adhesion molecule) ausbilden. Die Aktivierung der Selektine kann durch die Translokation von Endotoxinen, durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und durch inflammatorische Mediatoren (z.B. IL-1, TNF- $\alpha$ ) erklärt werden [88].

### *Kupffer-Zellen*

Kupffer-Zellen sind sternförmige, weit in das Gefäßlumen ragende Zellen, die sich zwischen die Sinusendothelien eingelagert haben und aufgrund einer hohen Phagozytoseaktivität dem mononukleären Phagozytosesystem zuzurechnen sind. Sie stammen aus dem Knochenmark, woher die meisten Ersatzzellen kommen, obgleich sich Kupfferzellen auch vor Ort mitotisch erneuern können. Ihr Anteil an den Leberzellen beträgt etwa 8 - 12 %. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass Kupfferzellen nicht gleichmäßig im Parenchym verteilt sind, sondern im periportalen Bereich drei- bis viermal häufiger angesiedelt sind als im perivenösen Bereich [86]. Kupfferzellen sind von kleinen rundlichen, villösen oder lappigen Ausstülpungen bzw. von langen,

tentakelartigen Ausläufern, den sog. Filopodien, bedeckt [18] und über diese Fortsätze mit anderen verbunden. Kennzeichnend für die Kupfferzellen ist neben dem Organellenreichtum die hohe Peroxidaseaktivität. Die Zellen können mittels phagozytotischer oder pinozytotischer Prozesse rasch jedes Fremdelement aufnehmen und mit Hilfe von Lysosomen verdauen. Sie ziehen dabei nicht selten ihre Filopodien ein, lösen sich aus dem Endothelverband und gelangen mit dem Blutstrom in die Lunge [66].

#### *PIT-Zellen*

Bei diesen erst kürzlich identifizierten Zellen handelt es sich um Lymphozyten mit großen Granula mit der Funktion von natürlichen Killerzellen, die einen Anteil an den Nicht-Parenchymzellen von 3 % besitzen [85]. PIT-Zellen geben lösliche Substanzen ab, die Fremdzellen oder Tumorzellen liquidieren oder Kupfferzellen zur Produktion zytotoxischer Stoffe stimulieren können.

#### *Ito-Zellen*

Die Ito-Zellen, die mesenchymalen Ursprungs sind, befinden sich in Erweiterungen des Disse- Raums und umgreifen mit ihren langen Zytoplasmafortsätzen die Sinusendothelzellen, wobei sie mit Hilfe von kontraktile Filamenten (Desmin, Vimentin, Aktin, Myosin) das Lumen der Sinusoide verengen können [18, 51, 70]. Diese Kontraktion wird durch Eikosanoide und Endothelin-1 induziert [63]. Die Ito-Zellen verdecken teilweise mit abgeplatteten und verzweigten Ausläufern die Oberfläche der Hepatozyten. Ito-Zellen findet man, ähnlich wie die Kupfferzellen, häufiger im periportal Azinusbereich als im perizentralen Azinusbereich und dort vor allem an den Verzweigungsstellen der Sinusoide [91]. Ihr Anteil an den Leberzellen schwankt zwischen 8 und 36 %. Ito-Zellen können sich in einem „ruhenden“ oder „aktiven“ Zustand befinden. Die ruhende Ito-Zelle nehmen Fetttropfen aus dem zirkulierenden Blut auf und speichern sie intrazellulär in Form von Vakuolen, wobei der Hauptbestandteil Vitamin-A und dessen Metaboliten sind. Im Experiment kann diese Fähigkeit der Vitamin-A-Speicherung zur Darstellung der Verteilung der Ito-Zellen genutzt werden. Die Aktivierung der Ito-Zelle erfolgt durch Signalstoffe (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, FGF, PDGF), bei dem es zu einem Verlust der Vakuolen kommt. Die Funktion der aktivierten Ito-Zelle ist die Bildung der Komponenten der extrazellulären Matrix und die Verengung der Sinusoide durch Kon-

traktion; sie spielen deshalb eine entscheidende Rolle in der pathophysiologischen Entstehung der Leberzirrhose und der portalen Hypertension [60, 63].

### **2.2.2 Regulationsmechanismen der hepatischen Mikrozirkulation**

Die Gefäßversorgung spielt eine wichtige Rolle in den physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen sind drei Gefäßversorgungen von Bedeutungen, die periphere Gefäßversorgung, die Mesenterialgefäße und die mikrovaskuläre Einheit innerhalb der Leber. Die mikrovaskuläre Einheit der Leber beinhaltet die Lebervenen, Leberarteriolen, Sinusoide, Zentralvene und Lymphgefäße, die den Widerstand innerhalb der Leber und den Blutfluss der Leber regulieren. Es wurde vermutet, dass vaskuläre, glatte Muskelzellen in den Pfortadervenen und Lebervenen eine große Rolle im Bezug auf den prä- und postsinusoidalen Gefäßwiderstand besitzen, während die Lebersinusoide mit dem Kapillarbett in anderen Geweben verglichen wurden, in dem glatte Muskelzellen den Blutfluss regulieren. In den Sinusoiden übernehmen die Endothelzellen und die Ito-Zellen eine wichtige Aufgabe zur Regulation des Widerstandes, wobei die meisten Anzeichen auf die Ito-Zellen hindeuten. Beide Zellen stehen aber in enger Verbindung untereinander. Ito-Zellen besitzen die Fähigkeit zur Kontraktion in situ in einem normalen Sinusoid. An isolierten Zellsystemen wurde die Kontraktilität der Ito-Zellen umfangreich untersucht und es wurden verschiedene Stoffe beobachtet, die einen Effekt auf die Ito-Zellen besitzen. Ito-Zellen besitzen in der kranken Leber eine erhöhte Kontraktilität, die proportional zum Krankheitszustand der Leber ist. Der Mechanismus der erhöhten Ito-Zellenkontraktilität steht mit einer verstärkten Expression glatter Muskelzellenproteine in Verbindung. Dadurch spielen Ito-Zellen eine bedeutende Rolle in der Regulation des Leberwiderstandes.

Die Mikrozirkulation bekommt das Blut über zwei afferente Gefäße, die terminale Pfortader und die Leberarterie. Die Pfortader ist direkt mit dem Kapillarnetz des Leberparenchyms, den so genannten Sinusoiden, verbunden. Das arterielle Blut fließt nicht nur indirekt durch die Anastomosen zwischen Leberarterie und Pfortader in die Lebersinusoide, sondern auch direkt durch die Leberarterien oder durch das um den Gallengang lokalisierte Kapillarnetz. Aus regulatorischer Sicht fungiert das arterielle System der

Leber nur als Ergänzung, wobei der arterielle Fluss aber notwendig ist, um Sauerstoff dem sinusoidalen System, dem Gallengangssystem, den Lebervenen und Lebernerven bereitzustellen. Der Hauptregulator des sinusoidalen Blutflusses der Leber stellt das Pfortadersystem dar. Endothelin-1 verursacht eine Kontraktion des sinusoidalen Endothels mittels ET-A Rezeptoren und eine Kontraktion der Lebervenenolen mittels ET-B Rezeptoren, die zu einem sinusoidalen und prä-sinusoidalen mikrovaskulären Widerstand führen. Die Auskleidung der Endothelzellen der Lebersinusoiden ist durch eine große Anzahl siebartiger Poren mit einem Durchmesser von 100 nm, die sinusoidale Endothelfenster genannt werden, gekennzeichnet. Die sinusoidalen Endothelfenster können darüber hinaus den sinusoidalen Blutfluss mittels einer durch Aktinomysin vermittelten Kontraktion und Erweiterung der sinusoidalen Endothelfenster regulieren.

### **2.2.3 Vasoaktive Mediatoren nach Leberschädigung**

#### *Endothelin*

Endothelin, das 1988 entdeckt wurde, existiert in drei verschiedenen Formen: Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3), die an zwei G-Protein Rezeptoren binden, den Endothelin A (ETA) und Endothelin B (ETB) Rezeptor. Während ETA Rezeptoren vor allem in den glatten Gefäßmuskelzellen vorkommen, sind ETB Rezeptoren charakteristisch für die Endothelzellen. Es wird vermutet, dass ETA Rezeptoren auf glatten Muskelzellen eine Vasokonstriktion vermitteln und ETB Rezeptoren auf Endothelzellen eine Vasodilatation durch die Freisetzung von NO veranlassen. Endothelin wird typischerweise von den Endothelzellen produziert und übt einen parakrinen Effekt auf benachbarte glatte Muskelzellen aus und besitzt einen selbstregulierenden Effekt. Das Endothelin reguliert die Gefäßspannung und hat darüber hinaus bei einer Reihe weiterer Prozesse Bedeutung, z.B. beim Zellwachstum und in der Wundheilung. Die Wichtigkeit von Endothelin in Lebererkrankungen wurde in zahlreichen Berichten über erhöhte ET-1 und ET-3 Spiegel bei Patienten mit Leberzirrhose hervorgehoben. In der gesunden Leber wird ET-1 hauptsächlich durch die sinusoidalen Endothelzellen synthetisiert, während nach Leberschädigung das ET-1 primär durch die Ito-Zellen produziert wird. Die Wirkung von Endothelin hängt von der Zielzelle ab. Endo-

thelin-Rezeptoren lassen sich zwar auf allen Leberzellen finden, zum größten Teil aber auf Ito-Zellen. Endothelin Rezeptoren werden in der geschädigten Leber und besonders in den Ito-Zellen hochreguliert. Bei Leberschäden kommt es sowohl zu einer erhöhten Endothelinrezeptor- Expression auf den Ito-Zellen als auch zu einer erhöhten lokalen Produktion von Endothelin.

### *Angiotensin II*

Ähnlich wie Endothelin besitzt Angiotensin II eine Reihe von biologischen Aktivitäten. Der bekannteste Effekt von Angiotensin II ist die Kontraktion der glatten Muskelzellen durch die Bindung an zwei verwandte Rezeptoren (AT1 und AT2), wobei die bekannten pharmakologischen Effekte durch den AT1 Rezeptor vermittelt werden. Angiotensin hat einen prominenten Effekt auf die Aldosteron-Synthese und Freisetzung nicht nur im Zentralnervensystem, sondern auch auf glatte Gefäßmuskelzellen, bei der Kontraktion, Poliferation und Synthese extrazellulärer Matrix. Ito-Zellen besitzen AT1-Rezeptoren, die Zellkontraktion und Synthese extrazellulärer Matrix veranlassen. Bei Patienten mit chronischer Leberschädigung wurden erhöhte lokale Angiotensin II Spiegel beobachtet.

### *Nitritoxid (NO)*

Die Bildung von NO erfolgt aus L-Arginin durch eines der drei Isoformen der NO-Synthase (NOS), die durch wenigstens drei verschiedene Gene verschlüsselt sind, und in zwei Enzymfamilien unterschieden werden kann. Die Regulation der NOS Expression ist komplex. Viele Komponenten, wie z.B. Cytokine oder Lipopolysaccharide stimulieren die iNOS Transkription. Die biologischen Effekte von NO wechseln und beinhalten Vasorelaxierung, Neurotransmission und Zytotoxizität insbesondere gegen Mikroben und besitzen einen ausgeprägten Effekt auf die Gefäßversorgung. Bei Mäusen, denen die NOS der Endothelzellen fehlt, wurde ein erhöhter Blutdruck festgestellt, die die wichtige Rolle dieses Enzyms in der vaskulären Homöostase verdeutlicht. Darüber hinaus konnte in in-vitro Studien gezeigt werden, dass NO den Widerstand innerhalb der Leber beeinflussen kann.

### *Stickstoff-Monoxid*

CO führt zu einer Relaxierung der glatten Muskelzellen mittels des gleichen Mechanismus, mit dem NO wirkt. In Studien konnte gezeigt werden, dass endogen produziertes CO zu einer Vasorelaxierung in den Lebersinusoiden führt.

<b>Mediator</b>	<b>Wirkung</b>
<b><i>Sinusoidkonstriktion</i></b>	
Endothelin (1, 2, 3)	++++
Angiotensin II	++
Thrombin	+
Vasopressin	+
Prostaglandin F <sub>2α</sub>	+
U46619 (Thromboxan A <sub>2</sub> )	+
Substanz P	+
PAF	+
Adenosine	+
<b><i>Sinusoiddilatation</i></b>	
Nitritoxid (NO)	++++
Carbonmonoxid (CO)	
PGE <sub>2</sub>	+
Lipo-PGE <sub>1</sub>	+
Adrenomedullin	+

**Tab. 1: Verschiedene Mediatoren und ihr vasoaktiver Einfluss auf die Ito-Zellen**

#### **2.2.4 Bedeutung vasoaktiver Mediatoren beim Pfortaderhochdruck**

Vasoaktive Mediatoren spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Pfortaderhochdrucks nach chronischer Leberschädigung und Zirrhose. Sowohl ein erhöhter sinusoidaler Widerstand in der Leber als auch ein erhöhter Blutfluss im davor geschalteten Splanchnikusgebiet tragen zum Pfortaderhochdruck bei. Die Kontraktilität der Ito-Zellen in der geschädigten Leber ist im Vergleich zur gesunden Leber erhöht und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Entstehung des sinusoidalen Widerstandes. Unter allen bisher bekannten vasoaktiven Mediatoren, die einen Effekt auf die Ito-Zellen und damit auf eine Änderung des Widerstandes innerhalb der Leber vermitteln können, spie-

len ET-1 und NO aufgrund ihres vasoaktiven Potentials die wichtigste Rolle. Während ohne Leberschädigung ein Gleichgewicht zwischen ET-1 und NO vorliegt, konnte bei chronischer Leberschädigung und bei Pfortaderhochdruck eine erhöhte ET-1-Synthese bei gleichzeitig erniedrigten NO-Spiegeln festgestellt werden. Diese „Endotheliopathie“ führt u. a. zu einer Erhöhung des sinusoidalen Widerstands in der Leber und kann möglicherweise einen neuen therapeutischen Ansatz, z.B. durch Endothelin-1-Antagonismus oder Substitution von NO darstellen.

## **2.3 Leberresektion und Teil-Lebertransplantation**

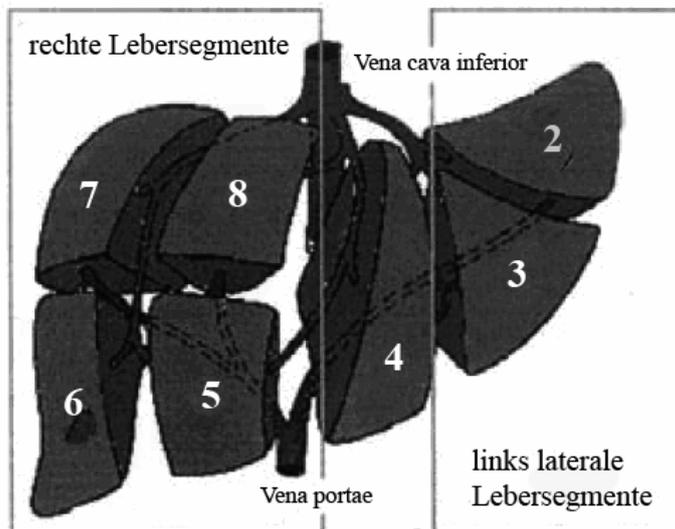
### **2.3.1 Konzept**

Das Konzept der Splitlebertransplantation sieht die Transplantation von größenreduzierten Teillebern – entweder durch Splitting einer Transplantatleber oder durch Lebendspende – vor [8, 15]. Die Split-Lebertransplantation wird in den westlichen Ländern immer häufiger aufgrund des zunehmenden Organspendermangels angewandt und in den asiatischen Ländern aufgrund des gesellschaftlich nur bedingt akzeptierten Hirntodgesetzes, das die Verwendung von Teillebern von Lebendspendern zur einzigen Alternative neben der Explantation sog. Non-Heart-Beating-Donors macht [13, 14]. Das Resultat des Lebertransplantatsplittings und der Lebendspende ist ein in der Regel für den erwachsenen Empfänger zu kleines Lebertransplantat (“small-for-size-graft”), das durch Leberregeneration im postoperativen Verlauf das der Körpergröße des Empfängers entsprechende Lebervolumen wiedergewinnen soll [31].

Zur Vermeidung des sog. SFS, eines klinisch relevanten postoperativen Leberversagens, muss einerseits die funktionelle Reserve des größenreduzierten Lebertransplantats den metabolischen Ansprüchen des Empfängers genügen, andererseits darf im Falle einer Lebendspende der Spender durch die Leberresektion nicht gefährdet werden.

Im Gegensatz zu den möglichen Resektionsausmaßen in der Tumorchirurgie der Leber (s. o.) müssen bei der Splitlebertransplantation jedoch weitere mögliche Funktionseinschränkungen des Transplantats durch den Ischämie/Reperfusionsschaden und mögliche Rejektionen berücksichtigt werden. Deshalb wird derzeit ein Transplantatvolumen von

über 40 % des Gesamtlebervolumens des Spenders bzw. ein Transplantatgewicht von über 1 % des Empfängergewichts als Minimalgröße der Teilleber zur Vermeidung einer postoperativen Leberinsuffizienz empfohlen [20, 79].



**Abb. 4:**  
**Lebersegmenteinteilung des Menschen**

(nach Strassburg und Manns, 2002)

Aufgrund der sich an der anatomischen Aufteilung der Lebersegmente orientierenden Split-Allokationen ist ein kongruentes Lebersplitting, d.h. eine Teilung der Leber in zwei gleichgroße Teillebern, nicht möglich. Bei einem Rechts-Links-Split, aber insbesondere bei einem Split entlang des Lig. falciforme stellt die linke Teilleber die in der Regel kleinere Teilleber dar, durch die – je nach Größe der Spenderleber – das für einen erwachsenen Empfänger geforderte Minimalvolumen (s.o.) häufig nicht bereitgestellt werden kann. Im Gegensatz hierzu gewährleistet die Transplantation der rechtsseitigen Teilleber zwar ein ausreichendes Lebervolumen, kann jedoch bei der Lebendspende den Spender aufgrund eines eventuell zu geringen Restlebervolumens gefährden [1, 16, 29]. Eine zuverlässige präoperative Vorhersage der Funktion der Teillebern ist derzeit nicht möglich, da – trotz der zunehmenden Durchführung von virtueller Operationsplanung [34, 35, 41], präoperativer Funktionstests (z.B. MEGX-Test) und Biopsieentnahme der Spenderleber – viele Parenchymschäden (z.B. kryptogene Stoffwechseldefekte etc.) nicht ausgeschlossen werden können. Darüber hinaus kann die postoperative Funktion der Teilleber durch zusätzliche Ereignisse nach der Transplantation, wie z.B. durch den I/R-Schaden, das Auftreten von Abstoßungsreaktionen, vaskulären Problemen etc. beeinträchtigt werden.

### 2.3.2 Small-for-size-Syndrom

Als SFS-Syndrom wird eine lebensbedrohliche Dysfunktion von größenreduzierten Lebertransplantaten nach Reperfusion definiert, die auf eine für den Empfänger nicht ausreichende Transplantatgröße zurückzuführen ist. Bei der Planung einer größenreduzierten Lebertransplantation wird derzeit die minimal notwendige Transplantatgröße durch das Verhältnis vom Transplantatgewicht zum Empfängergewicht (GRBWR = „graft weight to recipient body weight ratio“), das größer als ein Prozent liegen sollte, benutzt [81]. Eine GRBWR von weniger als 0,8 % begünstigt das Auftreten des SFS-Syndroms [19, 26, 57]. Auf den Ergebnissen von Tanaka et. al basierend, beträgt die Überlebenswahrscheinlichkeit des Transplantats und des Patienten um 90 %, bei einem Verhältnis von Transplantat zum Körpergewicht des Empfängers von mindestens 0,8 % [37]. Darüber hinaus führen Vorerkrankungen des Spenders, wie z.B. kryptogene Stoffwechselerkrankungen oder Leberzellverfettung, technische Probleme bei der Transplantation, wie z.B. eine Beeinträchtigung des venösen Ausstroms, sowie Ko-Morbiditäten und eine lange präoperative Intensivzeit des Empfängers zu einer Aggravierung des SFS-Syndroms [6, 23, 28, 37, 49, 50, 54, 59, 61, 67, 73]. Spender, die mehr als fünf Tage auf der Intensivstation verbracht haben, werden mit dem Auftreten einer Transplantatdysfunktion in Verbindung gebracht. Bei fortgeschrittenen chronischen Lebererkrankungen der Empfänger, insbesondere bei schwerem Pfortaderhochdruck, werden größere und bzw. oder besser funktionierende Transplantate benötigt, um das small-for-size Syndrom zu vermeiden [23]. Obwohl die Leber zeitlebens ihre Regenerationsfähigkeit beibehält, ist sie ab einem Alter über 40 reduziert, insbesondere im Vergleich zur Leberregenerationsfähigkeit bei Kindern. Im Rahmen einer Teillebertransplantation wird deshalb bei einem SFS-Transplantat empfohlen, die Durchführung auch von der Erkrankung und dem klinischen Status des Empfängers abhängig zu machen [36, 46].

Die Pathogenese, die klinische Manifestation, das Management und der exakte Mechanismus des SFS-Syndroms werden zurzeit noch genau untersucht. Unabhängig von individuellen Faktoren seitens des Spenders, Empfängers und des Transplantats scheint es so, als ob das SFS-Syndrom hauptsächlich mit einer verstärkten Transplantatdurchblutung assoziiert ist [14]. In anfänglichen Beschreibungen der Eigenschaften des SFS-Syndroms wurden verstärkte Hepatozyten-Beeinträchtigung, verzögerte Syntheseleistung, anhaltende Gallenstauung und verringertes Überleben des Transplantats genannt

[14, 37, 81]. Später stellte sich heraus, dass das SFS-Syndrom unter anderem durch eine temporäre portale Überperfusion des Lebertransplantats verursacht wird, die in Abhängigkeit der zunehmenden Regeneration rückläufig ist.

Klinisch manifestiert sich das SFS-Syndrom durch das Auftreten einer Cholestase, Koagulopathie, Pfortaderhochdruck, Aszites und in einigen Fällen auch Blutungen im Gastrointestinaltrakt am Ende der ersten postoperativen Woche. Nahezu 50 % aller Patienten mit SFS-Syndrom versterben innerhalb von vier bis sechs Wochen an einer Sepsis. An Hand der Serumchemie lässt sich das SFS-Syndrom durch erhöhte Cholestaseparameter, Verlängerung der Prothrombin-Zeit und einer moderaten Erhöhung der Lebertransaminasen charakterisieren. Ein erhöhter Pfortaderdruck von über 20 mmHg in den ersten Tagen nach der Lebertransplantation von Lebendspendern wird als infaustes prognostisches Zeichen angesehen [32].

Bisherige Ansätze zur Therapie des SFS-Syndroms wurden u. a. durch eine portale Dekompression und Verbesserung des venösen Ausflusses erfolgreich durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass durch eine Druckverminderung in der Leber und eine Verbesserung des venösen Abflusses die Leberfunktion nachhaltig verbessert werden konnte [7, 14, 48, 49].

## **2.4 Ziel der Studie**

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Pathogenese des SFS-Syndroms nach Leberresektion und größenreduzierter Lebertransplantation unter besonderer Berücksichtigung der Mikrozirkulation. Die Arbeitshypothese war, dass sich das SFS-Syndrom primär auf der Ebene der Mikrozirkulation infolge eines Ungleichgewichtes zwischen dem sinusoidalen Vasokonstriktor ET-1 und dem Vasodilator NO manifestiert und deshalb durch eine selektive ETAR-Blockade therapiert werden kann.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere und Studiendesign**

Als Versuchstiere dienten insgesamt 126 männliche, isogene Lewis-Ratten (Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von  $238,8 \pm 40,9$  g. Nach dem Eintreffen in der tierexperimentellen Einrichtung wurden die Tiere in Käfigen (Drahtkäfige aus rostfreiem Edelstahl; Fa. EBECO) unter konventionellen Bedingungen gehalten. Es herrschte eine Raumtemperatur von 22 - 24 °C und die Tiere wurden einem Beleuchtungsintervall von zwölf Stunden ausgesetzt. Sie erhielten Wasser und eine Haltungsdiät (Altromin 1324) ad libidum. Präoperativ wurden die Tiere für 24 Stunden in Einzelkäfigen (Makrolonkäfige Typ 3 DST) nüchtern gesetzt bei freiem Zugang zu Wasser. Nur gesunde Tiere ohne Zeichen von Atemwegserkrankungen wurden für eine Operation freigegeben. Postoperativ erhielten die Tiere sofort Wasser und Futter ad libidum.

#### **3.2 Versuchsgruppen**

Der Versuchsaufbau gliederte sich in fünf Versuchsgruppen (I - V). Alle Gruppen waren jeweils in eine Kurzzeitgruppe, in denen die Mikrozirkulation der Leber mittels der Intravitalmikroskopie untersucht wurde und eine Langzeitgruppe bis zum 14. postoperativen Tag unterteilt (Tab. 2). Alle Eingriffe erfolgten in einer Isofluran-Lachgas-Narkose ( $N_2O/O_2 = 2:1 + 1,5\%$  Isofluran).

##### *Gruppe I: Leberresektion (RES)*

In Gruppe I wurden ca. 70 % des Lebervolumens reseziert. Diese Gruppe diente zur Abgrenzung der Transplantations- assoziierten (Ischämie-/ Reperfusionsschaden) von der resektionsbedingten (Überperfusion der Restleber) Leberschädigung. Die Lebern in dieser Gruppe wurden nur einer akuten sinusoidalen Überperfusion ausgesetzt.

*Gruppe II: Leberresektion mit Darusentan<sup>®</sup>-Behandlung (RES-ETA)*

In Gruppe II wurde ebenfalls ca. 70 % des Lebervolumens reseziert, wobei zusätzlich mit einem Endothelin-A Rezeptor Antagonist Darusentan<sup>®</sup> (LU 135252, Knoll GmbH, Ludwigshafen, Deutschland; 1 mg/kg Körpergewicht intravenös) die größenreduzierte Leber vor der Durchführung der Leberresektion therapiert wurde. Das Vorgehen in den Kurz- und Langzeitversuchen entsprach Gruppe I.

*Gruppe III: größenreduzierte Lebertransplantation (PLT)*

Die Gruppe III (PLT) wurde in eine Spenderoperation, in der eine Größenreduktion der Leber durchgeführt wurde, und eine Empfängeroperation aufgeteilt. In das Empfängertier wurde der linke Leberlappen in orthotoper Position implantiert, wobei der arterielle und venöse Blutstrom nach dem Modell von *Engemann* wiederhergestellt wurde. Das größenreduzierte Lebertransplantat wies ein Lebervolumen von ca. 30 % des gesamten Lebervolumens auf. Das Vorgehen in den Kurz- und Langzeitversuchen entsprach Gruppe I (RES).

*Gruppe IV: größenreduzierte Lebertransplantation mit Darusentan<sup>®</sup> (PLT-ETA)*

Die Gruppe IV (PLT-ETA) wurde, analog zur Gruppe III (PLT) in eine Spenderoperation, bei der eine 70 %-ige Leberresektion vor der Explantation durchgeführt wurde, und eine Empfängeroperation aufgeteilt, bei der dem Empfängertier die Restleber in orthotoper Position implantiert wurde. Auch hier erfolgte die OP-Technik nach dem Modell von *Engemann*. Darüber hinaus wurde hier eine Behandlung mit Darusentan<sup>®</sup>, analog zur Gr. II (RES-ETA) durchgeführt. Das Vorgehen in den Kurz- und Langzeitversuchen entsprach Gruppe I (RES).

*Gruppe V: Scheinoperation*

In der Gruppe V wurde die Leber nach medianer Laparotomie durch Durchtrennung der Leberbänder mobilisiert. Das Vorgehen in den Kurz- und Langzeitversuchen entsprach Gruppe I.

In den Gruppen I (RES), III (PLT) und V (SHAM) fungierte Kochsalzlösung als Vehi-  
kel.

<b>Gruppe</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Anzahl (n)</b>
<b>I</b>	<b>Leberresektion (RES)</b>	
	a) Kurzzeit	7
	b) Langzeit	7
<b>II</b>	<b>Leberresektion mit Darusentan<sup>®</sup> (RES-ETA)</b>	
	c) Kurzzeit	7
	d) Langzeit	7
<b>III</b>	<b>Teil-Lebertransplantation (PLT)</b>	
	a) Kurzzeit	14*
	b) Langzeit	28*
<b>IV</b>	<b>Teil- Lebertransplantation mit Darusentan<sup>®</sup> (PLT-ETA)</b>	
	a) Kurzzeit	14*
	b) Langzeit	28*
<b>V</b>	<b>Scheinoperation (SHAM)</b>	
	a) Kurzzeit	7
	b) Langzeit	7
<b>Gesamtzahl</b>		<b>126</b>

**Tab. 2: Versuchsgruppen (\* = Spender- und Empfängertiere)**

Aufgrund der hohen Mortalität in den Transplantationsgruppen wurden jeweils 14 Tiere in die Langzeitgruppen (Gr. III + IV) eingeschlossen

### **3.3 Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht (LWBWR = Liver weight to body weight ratio)**

In Gruppe I (RES) und II (RES-ETA) wurde das Gewicht der Rest-Leber mit dem Gesamt-Lebergewicht von unbehandelten Lewis Ratten (150 - 250 g, n = 10), die in vorangegangenen Versuchen geopfert wurden, verglichen.

In Gruppe III (PLT) und IV (PLT-ETA) wurde vor der Empfängeroperation das Gewicht des Teil-Lebertransplantats bestimmt. Im Rahmen einer partiellen Lebertransplantation lässt sich die Relation des Lebergewichtes zum Körpergewicht (LWBWR) anhand dem Verhältnis von Transplantatgewicht zum Gewicht des Empfängers (GRBWR = weight graft to recipient body weight ratio) mittels folgender Berechnung beurteilen:

$$\text{Lebergewicht} * 100 / \text{Körpergewicht} [\%]$$

In dieser Studie lag in den ersten vier Gruppen (I - IV) ein Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht von weniger als 1 % vor, um in dieser Studie das SFS-Syndrom untersuchen zu können. Nur das Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht in der Gruppe V (SHAM) lag mit  $3,1 \pm 0,2$  % etwa dreimal höher und damit deutlich außerhalb der potentiellen Gefährdungsgrenze bei small-for-size Teil-Lebertransplantaten (s. Abb. 11).

### **3.4 Versuchsdurchführung**

Insgesamt wurden 35 Ratten, davon jeweils sieben Tiere aus den beiden Resektionsgruppen I (RES) und II (RES-ETA) und der Scheinoperationsgruppe V (SHAM) sowie jeweils 14 Tiere aus den Teil-Lebertransplantationsgruppen III (PLT) und IV (PLT-ETA) in die Kurzzeitversuche, in denen die Mikrozirkulation der Leber mittels Intravitalmikroskopie erfolgte, eingeschlossen. Dabei wurde die untere Seite des linken Leberlappens mikroskopiert. Zur Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe wurde vor der Laparotomie ein zentraler Venenkatheter (ZVK) gelegt. Alle Versuche wurden dabei unter konstanten hämodynamischen Bedingungen (kontinuierliche Blutdruckmessung, mittlerer  $P_{art} > 100$  mmHg) und Temperaturbedingungen (rektale Temperatur  $> 36$  °C) durchgeführt. Nach der Intravitalmikroskopie wurde das Tier geopfert und Leberbiopsien entnommen.

In den Langzeitversuchen wurden insgesamt 49 Ratten eingeschlossen, jeweils sieben Tiere aus den beiden Leberresektionsgruppen I (RES) und II (RES-ETA) sowie jeweils 14 Tiere aus den beiden Gruppen nach Teil-Lebertransplantation und sieben Tiere aus der Gruppe der Scheinoperation V (SHAM). Die Tiere wurden im Rahmen der Langzeituntersuchung über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Postoperativ und nach den Tagen 1, 2, 7 und 14 wurden Blutentnahmen durchgeführt und die Vitalparameter (Überleben, Gewicht, Allgemeinzustand) aufgezeichnet. Durch die Messung von ALAT wurde die Leberschädigung, durch den  $NH_3$ - und Bilirubinspiegel die Entgiftungsfunktion der Leber und durch den Albuminspiegel die Synthesefunktion der Leber bestimmt. Nach 14 Tagen wurde das Tier durch  $CO_2$ -Inhalation getötet und die Leber makrosko-

pisch beurteilt (Farbe, Konsistenz). Des weiteren wurde das Lebervolumen als Maß für die Leberregeneration bestimmt und eine Biopsieentnahme für die anschließende histomorphologische Untersuchung entnommen.

Zielgröße	Parameter
Kurzzeitfunktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mikrozirkulation (Intravitalmikroskopie)</li> <li>• Leberhistomorphologie</li> </ul>
Vitalparameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Allgemeinzustand</li> <li>• Gewicht</li> <li>• Überleben</li> </ul>
Langzeitfunktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Leberschädigung (ASAT)</li> <li>• Entgiftungsparameter (NH<sub>3</sub>, Bilirubin)</li> <li>• Syntheseparameter (Albumin)</li> <li>• Leberhistomorphologie</li> <li>• Leberregeneration (Lebervolumen)</li> </ul>

**Tab. 3: Untersuchungsparameter bei Langzeit- und Kurzzeitgruppe**

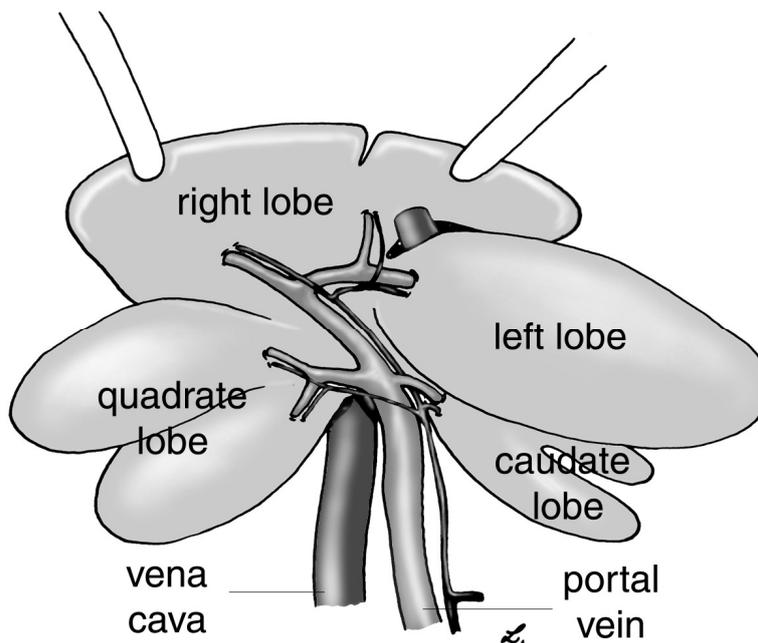
### 3.5 Methoden

#### 3.5.1 Schein-Operation

Die Schein-Operation begann mit der Anlage des ZVK via V. jugularis interna, der zur Blutentnahme und zur Verabreichung von Medikamenten für die Therapie und Fluoreszenzfarbstoffe für die Intravitalmikroskopie diente. Nach dem Setzen eines Querschnittes am Hals wurde die V. jugularis interna aufgesucht, distal ligiert und proximal ausgeklemmt. Mittels einer Mikroschere wurde das Gefäß eröffnet und ein Silicon-Katheter (24 G) über die Öffnung ins Gefäß eingeführt und bis in die V. cava superior vorgeschoben. Die korrekte Lage des ZVK im rechten Vorhof wurde durch eine Blutaspiration kontrolliert und anschließend mit einer proximalen Ligatur gesichert. Bei den Kurzversuchen wurde über den gleichen Zugang die A. carotis communis kannüliert, um

eine kontinuierliche Blutdruckmessung während der Intravitalmikroskopie zu ermöglichen.

Nach einer medianen Laparotomie und Retrahierung des Xiphoids wurde das gesamte Darmkonvult auf der linken Seite des Tieres ausgelagert und zusätzlich in Folie mit 0,9 %-iger NaCl-getränkten Kompressen eingeschlagen, um es vor Austrocknung zu schützen. Dann wurden die Leberlappen mobilisiert, wobei folgende Bänder durchtrennt wurden: das Lig. falciforme hepatis am Diaphragma, das Lig. triangulare am rechten Leberlappen, das Ligament des linken Leberlappens, die Pars flaccida des Omentum minus und das Lig. hepatogastrale. Die Ösophagusvenen wurden koaguliert und samt Band durchtrennt. Als nächstes wurde die V. diaphragmatica inferior, die an der linken Zwerchwellkuppe in die suprahepatische V. cava nahe der Leber mündet, doppelt ligiert und durchgeschnitten. Zuletzt wurde noch die V. gastroduodenalis doppelt ligiert und durchtrennt. Nach Spülung des Abdomens mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung wurden die einzelnen Bauchschichten (Muskel- und Hautschicht) mit 4-0 Vicryl (Ethicon, Deutschland) aneinander adaptiert. In der Kurzzeitgruppe erfolgte kein Bauchdeckenverschluss.



**Abb. 5:**  
**Schein-Operation**  
**SHAM (Gruppe V)**

### 3.5.2 Partielle Leberresektion (Gruppe I + II)

Folgende Lappen wurden reseziert, um ein Resektionsvolumen von ca. 70 % der Gesamtleber zu erreichen: Lobus quadratus, Lobus caudatus und Lobus dexter hepatis.

Nach medianer Laparotomie wurde die Leber mobilisiert und die Vv. diaphragmatica inferior und gastroduodenales doppelt ligiert und durchtrennt. Danach wurden die Verläufe der Strukturen des Ligamentum hepatoduodenale sauber dargestellt. Die Abgänge des Ductus choledochus zu den zu resezierenden Leberlappen wurden als erstes ligiert und durchtrennt. Als nächstes wurden die Abgänge der A. hepatica doppelt ligiert und durchtrennt und zum Schluss die Abgänge der V. portae. Anschließend wurde das Parenchym der einzelnen Leberlappen ligiert, um noch die offenen Lebervenen der einzelnen Lappen zu verschließen und dann reseziert. Der Lobus hepatis sinister verblieb als einziger Lappen im Situs durchblutet und biliär angeschlossen. Das Volumen der Teil-leber betrug noch ca. 30 % des Gesamtlebervolumens.

### 3.5.3 Größenreduzierte Lebertransplantation (Gruppe III + IV)

Die größenreduzierte Lebertransplantation an der Ratte wurde nach einer modifizierten Technik von *Engemann* [75] durchgeführt. Die Operation wurde in eine Spender- und Empfängeroperation unterteilt.

#### *Spenderoperation*

Die Spenderoperation begann zusätzlich zur medianen Laparotomie mit einem V-förmigen Schnitt; das Xiphoid wurde mit Hilfe einer Overholt-Klemme kopfwärts retrahiert. Dadurch wurde das Operationsfeld weiträumig dargestellt, was eine organschonende Präparierung ermöglichte. Nach Auslagerung des Darms und Mobilisierung der Leberlappen wurde die V. diaphragmatica inferior doppelt ligiert und durchtrennt. Anschließend wurde eine  $\frac{2}{3}$ -Leberresektion wie in Gruppe I + II durchgeführt. Der Ductus choledochus wurde aus dem Ligamentum hepatoduodenale freipräpariert und vor dem Eintauchen in das Pankreasgewebe abgesetzt. In das distale Ende des Gallenganges wurde ein Teflon-Splint (24 G, 5 mm Länge) für die spätere Reanastomisierung in der Empfängeroperation eingeführt. Die Pfortader wurde bis zur V. splenica vorsichtig von dem umgebenden Fettgewebe freipräpariert und die in sie mündende V. gastro-

duodenalis durchtrennt. Die Leberarterie wurde bis zur Aufteilung des Truncus coeliacus in A. gastrica sinistra, A. splenica und A. hepatica communis dargestellt und die Erstgenannten doppelt ligiert und durchtrennt. Dann wurde die Aorta vom retroperitonealen Fett zwischen der iliacaalen Bifurkation und dem Truncus coeliacus befreit und die restlichen Abgänge doppelt ligiert und durchtrennt. Die A. mesenterica superior wurde bis zur Perfusion nicht ligiert, um den portalen Blutfluss der Leber zu sichern. Proximal des Truncus coeliacus wurde eine Ligatur gesetzt. Im Bereich der infrahepatischen V. cava wurde das Retroperitonem eröffnet, die V. suprarenalis dexter koaguliert und die infrahepatische V. cava sorgfältig freipräpariert. Die Explantation der Leber begann mit der portalen Perfusion. Nach Abklemmen der Pfortader mit einem Biemer-Klemmchen wurde ein Perfusionskatheter portal eingeführt und die Leber mit 4 °C kalter Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat- (HTK-) Lösung über fünf Minuten mit einem Druck von 10 mmHg perfundiert. Zur Drainage des Perfusats wurden die thorakale V. cava inferior und die infrahepatische V. cava proximal der V. renalis dextra durchtrennt. Als nächstes wurde die Aorta proximal des Truncus coeliacus und die A. mesenterica superior ligiert und durchtrennt. Ebenso wurde sie proximal der iliacaalen Bifurkation mit einem sauberen Schnitt durchtrennt und das hepatoaortale Segment mit HTK-Lösung durchspült [75]. Nach homogener lehmgelber Verfärbung der Leber wurden die suprahepatische V. cava möglichst nahe am Zwerchfell, ohne dabei Muskelreste am Gefäß zu belassen und die Pfortader möglichst weit distal abgesetzt. Die Leber wurde aus dem Situs entfernt und in 4 °C kalter HTK-Lösung 60 Minuten bis zur Implantation aufbewahrt. Für die Implantation wurden schon im Eisbad die Eckfäden (8-0 Monofil, Serag-Wiessner, Deutschland) für die suprahepatische Anastomose gesetzt.

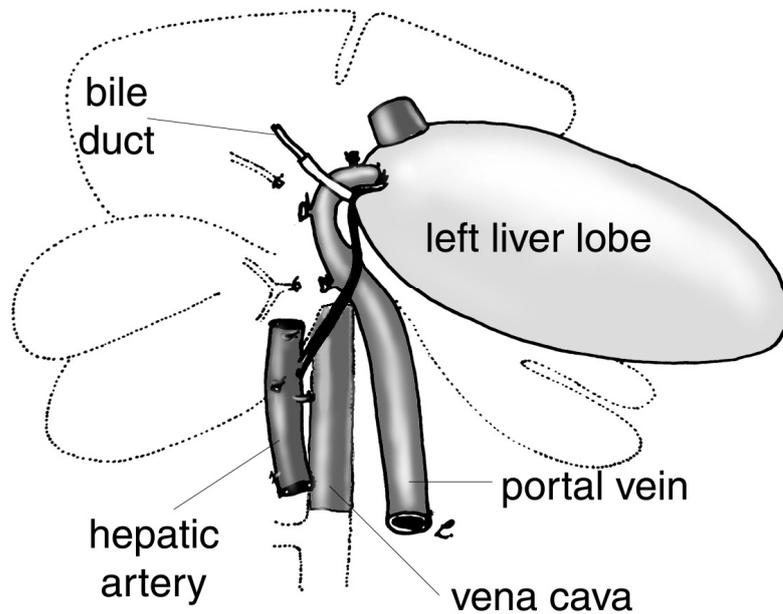
#### *Empfängeroperation*

Die Empfängeroperation begann mit der Katheterisierung der V. jugularis. Nach medianer Laparotomie wurden die Strukturen des Ligamentum hepatoduodenale freipräpariert und die Leber mobilisiert. Der Gallengang wurde hilusnah abgesetzt, die A. hepatica communis nahe des Truncus coeliacus doppelt ligiert und durchtrennt. Anschließend wurden die V. portae und die supra- und infrahepatische V. cava inferior in folgender Reihenfolge ausgeklemmt. Als erstes wurde die Pfortader distal des Stumpfes der V. gastroduodenalis mit einem Biemer-Klemmchen abgeklemmt. Hierbei darf das Gefäß nicht in sich verdreht werden. Mit dem Abklemmen der Portalvene begann die so ge-

nannte anhepatische Zeit, die 25 Minuten nicht überschreiten sollte. Als nächstes folgte die infrahepatische V. cava, die mit einer Bulldog-Klemme proximal der V. renalis dextra ausgeklemmt wurde. Hier war beim Abklemmvorgang ebenfalls leicht eine Verdrehung des Gefäßes möglich. Beim abschließenden Abklemmen der suprahepatischen V. cava mit der Satinsky-Klemme war darauf zu achten, dass sie großzügig im Zwerchfell ausgeklemmt wurde. Aufgrund des stark reduzierten venösen Rückstroms zum Herzen während der Abklemmphase musste die Narkose zurückgenommen werden, da die Atmung sonst sehr schnell insuffizient wurde und das Tier sterben konnte. Die suprahepatische V. cava wurde so nahe wie möglich am oberen Leberpol abgesetzt. Die V. portae wurde distal der letzten Lappenvene sauber durchtrennt. Die infrahepatische V. cava wurde ebenfalls so lebernah wie möglich abgesetzt. Die Leber wurde aus ihrer Loge entfernt.

Das Transplantat wurde orthotop platziert. Die suprahepatische V. cava inferior wurde End-zu-End in fortlaufender Technik mit 8-0 Monofil genäht. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass keine Diaphragmareste in die suprahepatische Anastomose hineinragten, die bei der Reperfusion zu thrombembolischen Komplikationen führen konnten. Nach Hochklappen des Transplantates wurden die beiden Gefäßstümpfe der Spender- und Empfängerportader durch zwei Eckfäden (10-0 Monofil) adaptiert und fortlaufend End-zu-End anastomosiert. Darauf folgte die portale Reperfusion. Als erstes wurde das leberferne Biemer-Klemmchen an der Empfängerportader geöffnet, um dieses Segment zu entlüften und nachzuprüfen, ob die Anastomose dicht war. Als nächstes wurde das lebernahe Klemmchen an der Spenderportader geöffnet und die restlichen Gefäße entlüftet. Nach Eröffnung der Satinsky-Klemme war die anhepatische Zeit vorbei. Das Transplantat sollte sich nach Reperfusion innerhalb von ca. einer Minute kastanienbraun verfärben. Die Anastomisierung der infrahepatischen V. cava inferior erfolgte in Ruhe End-zu-End fortlaufend mit 8-0 Monofil. Anschließend folgte die Rearterialisierung des Transplantates. Die Empfängeraorta wurde infrarenal mit zwei Mikrogefäßklemmchen ausgeklemmt und längs inzidiert. Das hepatico-aortale Segment wurde spannungsfrei End-zu-Seit mit 10-0 Monofil auf die Aorta abdominalis des Empfängers genäht. Nach Entfernen der distalen Klemme zur Prüfung der Anastomose wurde die proximale Klemme entfernt und das Transplantat arteriell reperfundiert. Der Transplantatgallen-

gang wurde über den Splint mit dem Empfängergallengang zusammengeführt und durch vier Einzelknopfnähte fixiert.

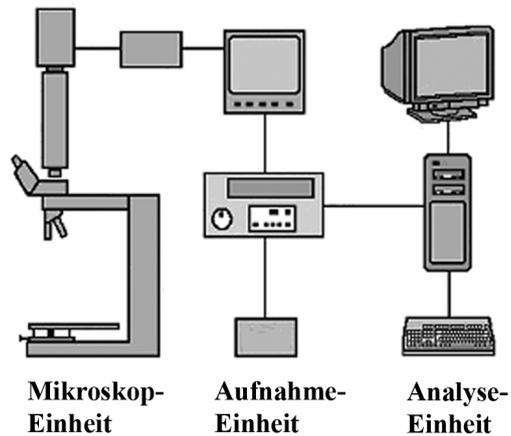


**Abb. 6:**  
**Größenreduzierte Leber-**  
**transplantation**

Implantation eines Teillebertransplantates mit 30 % des ursprünglichen Lebervolumens

### 3.5.4 Intravitalmikroskopie

Unter Zuhilfenahme der Intravitalmikroskopie wurde die Mikrozirkulation der Leber untersucht [84]. Hierbei wurden mittels fluoreszierenden Farbstoffen entweder Parenchymzellen kontrastiert oder Zellen spezifisch angefärbt (s. u.). Mit Hilfe eines speziell angefertigten Mikroskops (verstärkte Lichtquelle, High-Resolution-Kamera, Spezialfilter, Zoomobjektiv) konnte das Gewebe bei bis zu 1000-facher Vergrößerung in Epiilluminationstechnik (Eindringtiefe ca. 300  $\mu\text{m}$ ) untersucht werden. Durch eine Aufzeichnung der einzelnen Bildsequenzen mit einer High-Resolution-Kamera und einem Videorekorder mit Einzelbildlauf ließen sich die gewonnenen Daten offline mittels eines PC mit windowskompatibler Software und Grafikkarte auswerten (Abb. 7).



**Abb. 7:**  
**Aufbau des Intravital-**  
**mikroskops**

Die mit der Mikroskopeinheit (links) gewonnenen Bilder werden aufgenommen (Mitte) und offline ausgewertet (rechts)

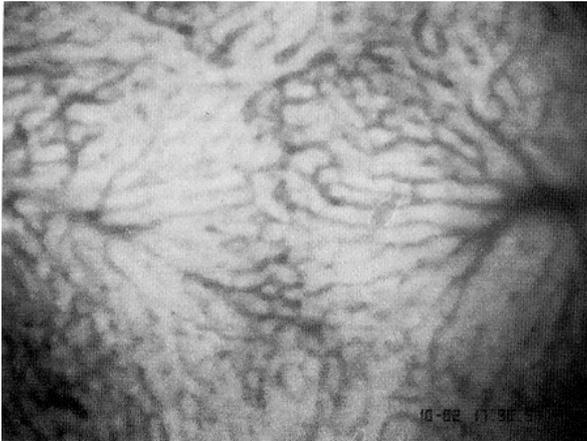
In der vorliegenden Arbeit wurde in den Kurzzeitversuchen in allen Versuchsgruppen (I - V) mittels der Intravitalmikroskopie die Mikrozirkulation der Leber untersucht. Um bei der Intravitalmikroskopie jedes Mal die gleichen Voraussetzungen zu erhalten, wurde z.B. zum Erreichen einer konstanten Temperatur auf ein in den Operationstisch integriertes Heizsystem zurückgegriffen sowie der arterielle Druck und die Herzfrequenz kontinuierlich gemessen.

#### *Kanülierung zur Intravitalmikroskopie*

Zur Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte die Anlage eines zentralen Venenkatheters. Ein Silicon-Katheter (24 G) wurde über die V. jugularis externa in die V. cava superior eingeführt. Die korrekte Lage des ZVK im rechten Vorhof bei ca. 3 cm Länge konnte durch die dann mögliche Blutaspiration validiert werden. Anschließend wurde über den gleichen Zugang die A. carotis communis kannüliert, um eine kontinuierliche Blutdruckmessung während der Mikroskopie zu ermöglichen.

#### *Durchführung der Intravitalmikroskopie*

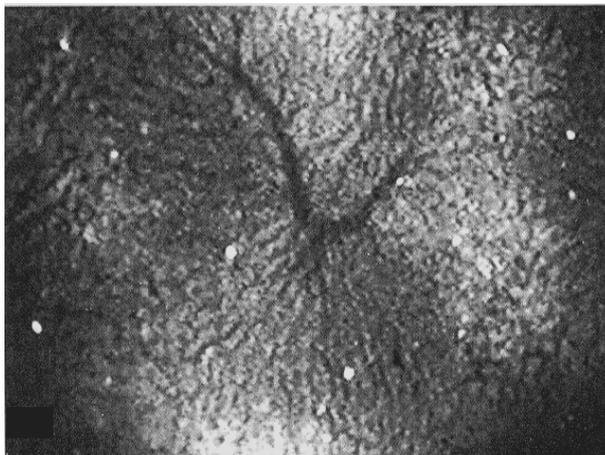
Alle Versuche wurden unter konstanten hämodynamischen Bedingungen (kontinuierliche Blutdruckmessung, mittlerer  $P_{art} > 100$  mmHg) und Temperaturbedingungen (rektale Temperatur  $> 36$  °C) durchgeführt. Mit Hilfe des Farbstoffes Natrium-Fluoreszein, das unter Sicht appliziert wurde, erfolgte die Beurteilung der Mikrozirkulation in der periportalen Region eines Halbsinusoids gemäß der Definition nach *Rappaport* (Abb. 8) der Durchmesser der Sinusoide und die sinusoidale Perfusionsrate (Abb. 5 + 6) sowie der Durchmesser von postsinusoidalen Venen (s. Tab. 4).



**Abb. 8:**  
**Sinusoid: Natrium-  
Fluoreszein-Bild eines Leber-  
azinus nach Rappaport**

In der Mitte des Bildes ist die periportale Zone und zu den Seiten sind die beiden Zentralvenen, die den Leberazinus begrenzen, zu sehen

Mit Hilfe des Farbstoffs Rhodamin 6 G, das 15 Minuten vor Durchführung der Intravitalmikroskopie appliziert wurde, erfolgten die Darstellung der Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Messung der Leukozytenflussgeschwindigkeit.



**Abb. 9:**  
**Sinusoid - Rhodamin 6 G-Bild**

Die Leukozyten sind als weiße Punkte dargestellt und werden in freifließend (Referenz, Messung der Flußgeschwindigkeit), rollend (sog. "Roller") und > 30 Sekunden anhaftend (sog. "Sticker") unterteilt

Insgesamt wurden zehn verschiedene Felder (Halbazini gemäß der Definition nach Rappaport, Abb. 2) und postsinusoidale Venen jeweils 30 Sekunden lang (für NaFlu-Filter und Rhodamin-Filter) ausgewertet.

<b>Farbstoff</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Eigenschaften</b>
<b>Natrium-Fluoreszein</b>	2 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht	Kleine Molekülgröße, diffundiert durch Gefäßmembranen und verteilt sich im Interstitium. Dadurch wird der Kontrast zwischen den Gefäßen und dem Hintergrund verstärkt und eine direkte Visualisation der Organmorphologie ermöglicht.
<b>Rhodamin 6 G</b>	0,2 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht	Positiv geladenes Molekül, das von der mitochondrialen Membran der Leukozyten absorbiert wird und dadurch spezifisch Leukozyten markiert.

**Tab. 4: Fluoreszenzfarbstoffe in der Intravitalmikroskopie der Leber**

<b>Parameter</b>	<b>Definition</b>
<b>Perfusionsrate</b>	Perfundierte Kapillaren / alle Kapillaren in einem definierten Bereich [%]
<b>Gefäßdurchmesser</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinusoide [<math>\mu\text{m}</math>]</li> <li>• Postsinusoidale Venen [<math>\mu\text{m}</math>]</li> </ul>
<b>Flußgeschwindigkeit</b>	Weg / Zeit [ $\mu\text{m/s}$ ] von Rhodamin-markierten Leukozyten in <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sinusoiden</li> <li>• Postsinusoidale Venen</li> </ul>
<b>Leukozyten-Endothel-Interaktion</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Frei-fließende Leukozyten [Anzahl / 30 Sekunden]</li> <li>• „Sticker“ [permanente = 30 Sekunden lange Adhäsion an der Gefäßwand]</li> <li>• „Roller“ [langsameres Entlangrollen an der Gefäßwand während 30 Sekunden]</li> </ul>

**Tab. 5: Parameter der Intravitalmikroskopie der Leber**

### 3.5.5 Bestimmung der Serumparameter

Allen Tieren wurden 500 µl Blut präoperativ (D 0 prae), unmittelbar nach der Operation (D0), am ersten (D1), 2. (D2), 7. (D7) und 14. postoperativen Tag (D 14) aus dem retroorbitalen Venengeflecht entnommen und auf ALAT, Bilirubin, NH<sub>3</sub> und Albumin untersucht (Reaktionsprinzipien s. Tab. 6).

---

Parameter	Reaktionsprinzip
<b>Albumin</b>	Albumin + Bromcresolgrün (BCG) → BCG-Albumin-Komplex (37 °C, 630 nm)
<b>Ammoniak (NH<sub>3</sub>)</b>	NH <sub>3</sub> + Bromphenolblau (Ammoniak-Indikator) → blauer Farbstoff (4 °C, 600 nm)
<b>Gesamt-Bilirubin</b>	Gesamt-Bilirubin → (+ Dyphyllin) → Azobilirubin-Chromophoren (37 °C, 540 und 460 nm)
<b>Alaninaminotransferase (ALAT)</b>	Alanin + α -Ketoglutarat → (+ ALT, P-5-P) → Pyruvat + Glutamat (37 °C, 340 nm) Pyruvat + NADH + H <sup>+</sup> → (+ LDH) → Laktat + NAD <sup>+</sup> (37 °C, 340 nm)

---

**Tab. 6: Reaktionsprinzipien zur Bestimmung der Serumparameter**

In Klammern sind die jeweiligen Wellenlängen und Temperaturen während der Reaktion angegeben

### 3.5.6 Immunhistochemie

#### *Endothelin-1 und Endothelin A Rezeptor (ET<sub>A</sub>-Rezeptor)*

Zur immunhistochemischen Darstellung von ET-1 und ET<sub>A</sub>-Rezeptor im Gewebe fand jeweils ein polyklonaler Antikörper der Firma DPC Biermann (Bad Neuheim, Deutschland) Verwendung, wobei als Nachweismethode die so genannte Labeled-Avidin-Biotin (LAB)-Methode genutzt wurde. Durch die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen Endothelin-1 und den Endothelin-A Rezeptor lässt sich die Intensität der immunologischen Markierung von cytoplasmatischem Endothelin-1 und Endothelin A Rezep-

tor anhand des semiquantitativen immunhistochemischen Scores bestimmen. Als Parameter wurde die Anzahl der positiven Zellen pro 10 beobachteten Abschnitten, den sogenannten High Power Fields (HPF) gezählt und die Intensität der sich ergebenden Immunreaktion folgendermaßen ausgewertet: 0 (keine Markierung) bis 3 (maximale Intensität der Markierungen). Die Zahl der gekennzeichneten Zellen wurde gezählt und semiquantitativ bewertet von 0 bis 4 (0 = 0, 1 = 1 - 30, 2 = 31 - 60, 3 = 61 - 90, 4 > 90 markierte Zellen in einem von zehn beobachteten Abschnitten.)

Intensität	Score-Wert	Anzahl positiver Zellen / 10 HPF	Score-Wert
keine	0	0	0
schwach	1	1 - 30	1
mäßig	2	31 - 60	2
stark	3	61 - 90	3
		>90	4

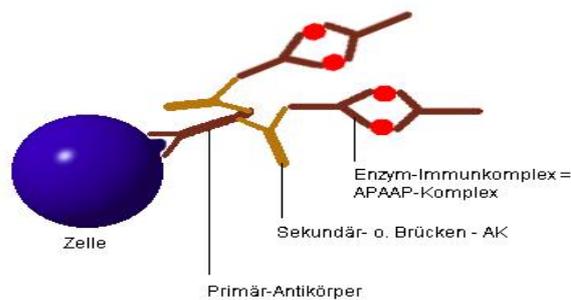
**Tab. 7: Semiquantitativer immunhistochemischer Score**

### *Kupfferzellen*

Kupfferzellen wurden auf Kälteschnitten mithilfe der APAAP Methode (Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase) mit Fuchsin als Farbstoff gekennzeichnet. Monoklonale Endothelin-1-spezifische Antikörper gegen Kupfferzellen (1:400 verdünnt) wurden bei Biozol Diagnostica, Deutschland, bezogen. Die Anzahl der Kupfferzellen pro 100 hepatozellulären Kerne wurde durch Zählen von 1000 Hepatozyten und nicht-parenchymalen Zellen ausgewertet.

### *APAAP-Methode*

Bei der APAAP-Methode werden lösliche Enzym-Immunkomplexe zwecks Signalverstärkung und damit Erhöhung der Sensitivität eingesetzt. Es werden drei Antikörperlösungen eingesetzt, der Primär-Antikörper, der Brücken-Antikörper und der APAAP-Komplex (= Enzym-Immunkomplex). Anschließend wird durch eine Enzym-Substrat-Reaktion eine Färbung zum sichtbaren Nachweis erreicht.



**Abb. 10:**  
**APAAP-Methode**

### *Apoptose*

Der immunhistochemische Nachweis der Apoptose wurde an formalinfixierten und in Paraffin eingebettetem Gewebe mittels der Streptavidin-Biotin Immunoperoxidase Technik (Streptavidin Alexa Fluor 488, Molecular Probes Eugene, USA) mithilfe polyklonaler Kaninchen-Antikörpern gegen ssDNA (IBL Co, Ltd., Japan) mit einer 1:2000 Verdünnung und biotinylierten Anti-Kaninchen-Antikörpern (Vector Laboratories, USA) mit einer 1:500 Verdünnung durchgeführt. Die Kerne wurden durch den Farbstoff DAPI (Sigma Chemical Co., USA), der sich an AT-reiche DNA-Regionen bindet, mithilfe einer 1:10.000 Verdünnung gekennzeichnet. Der Apoptose-Index wurde als das Verhältnis von ssDNA-positiven Kernen zu 100 ssDNA-negativen hepatozellulären Kernen definiert und semiquantitativ durch Auszählen von 1000 Hepatozyten und Nicht-Parenchymzellen ermittelt.

### *Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase (eNOS)*

eNOS wurde an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe mittels eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers (Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA) mit einer Verdünnung von 1:100 und einem Ziege-Anti-Kaninchen EnVision-HRP Antikörper (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) gekennzeichnet.

### *Endothelzell-Reaktivität*

Das Endothelzellen-Antigen der Ratten (RECA) wurde auf Kälteschnitten mithilfe der APAAP Methode (Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase) mit Fuchsin als Farbstoff gekennzeichnet. Monoklonale Antikörper HIS-52 (verdünnt 1:40), die spezifisch für das Endothelzellen-Antigen der Ratte sind, wurden von Biozol Diagnostica, Deutschland, bezogen. Die Objekte wurden semiquantitativ auf die Anwesenheit von speziell gekennzeichneten Zellen untersucht.

### *Nitrotyrosin (NT)*

Nitrotyrosin wurde an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe mittels eines monoklonalen Antikörpers einer Maus (Zymed, San Francisco, CA, USA) mit einer Verdünnung von 1:20 und Ziege-Anti-Maus EnVision-HRP (DakoCytomation) markiert.

## 3.6 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte unter Verwendung von SPSS-Software (Version 12.0).

### *Deskriptive Statistik*

Alle dargestellten Messwerte wurden arithmetisch gemittelt ( $\bar{x}$ ) und die Standardabweichung des mittleren Fehlers ( $s_{\bar{x}} = \text{SEM}$ ) berechnet (s. Tab. 8).

Parameter	Berechnung
Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )	$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n xi$
Standardabweichung (mittlere quadratische Abweichung) s	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}{n - 1}}$
Standardabweichung des mittleren Fehlers ( $s_{\bar{x}} = \text{SEM}$ )	$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$

**Tab. 8: Formeln zur Bestimmung der Statistik**

### *Analytische Statistik*

Sämtliche Daten wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests auf Signifikanz geprüft. Ergaben sich signifikante Unterschiede mit der Multivarianzanalyse, wurde der Paarvergleich nach Kruskal-Wallis zum Einzelgruppenvergleich untereinander durchgeführt [53].

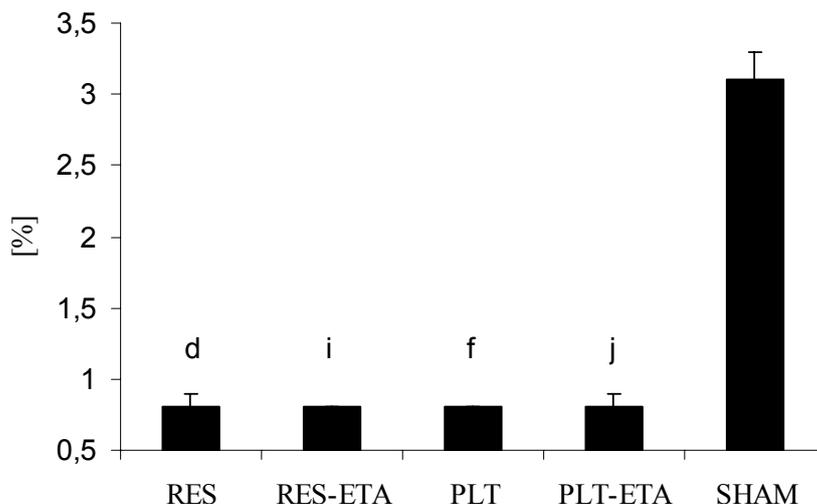
## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Operative Ergebnisse

In allen Gruppen (I - V) traten intra- und perioperativ keine Komplikationen auf, so dass kein Tier von der Auswertung ausgeschlossen werden musste. Die Kaltischämiezeit lag bei den Gruppen III (PLT) und IV (PLT-ETA), bei denen eine Teil-Lebertransplantation durchgeführt wurde, zwischen 100 - 120 Minuten und die Warmischämiezeit unter 20 Minuten.

### 4.2 Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht (LWBWR)

In den Gruppe I (RES) und II (RES-ETA) wurde das Gewicht der Rest-Leber mit dem Gesamt-Lebergewicht von unbehandelten Lewis Ratten (150 - 250 g, n = 10), die in vorangegangenen Versuchen geopfert wurden, verglichen. In Gruppe III (PLT) und IV (PLT-ETA) wurde vor der Empfängeroperation das Gewicht des Teil-Lebertransplantats bestimmt. Dadurch konnte das Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht (LWBWR = Liver weight to body weight ratio) bestimmt werden. In der Gruppe der Scheinoperation lag das Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht bei  $3,1 \% \pm 0,2$  und daher mit etwa 388 % signifikant höher als in den restlichen vier Gruppen I - IV, die alle ein Verhältnis des Lebergewichtes zum Körpergewicht (LWBWR) von 0,8 % aufwiesen.



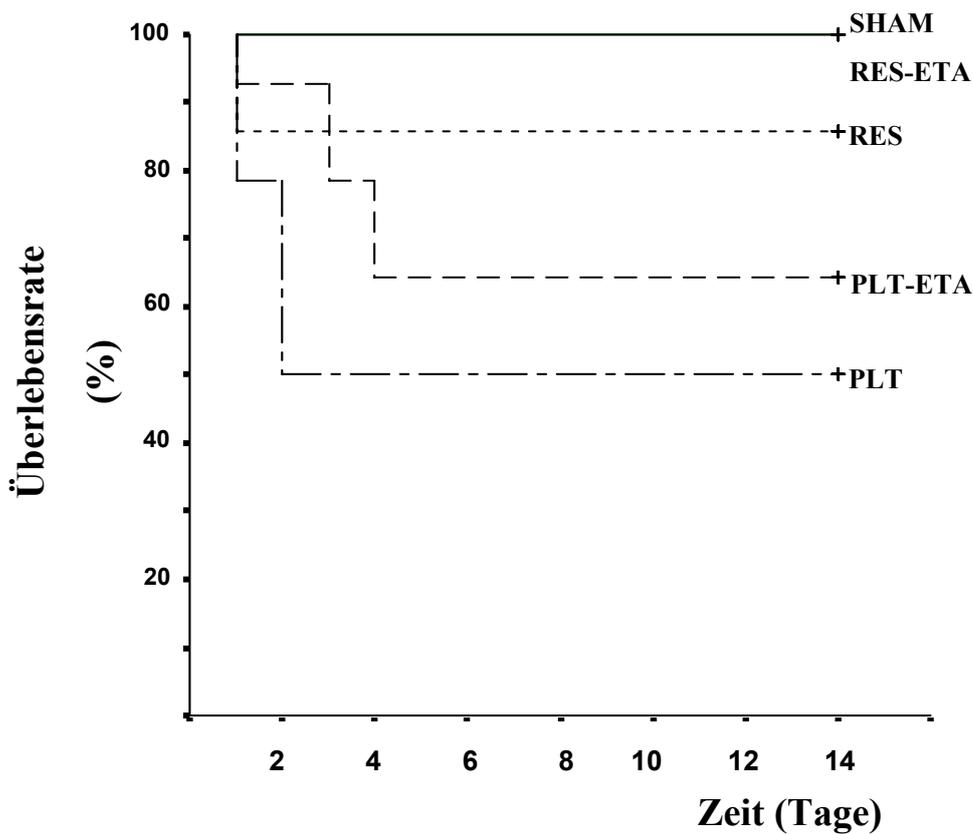
**Abb. 11:**  
**LWBWR [%]**

Signifikanzindices  
s. Anhang

Bei den Tieren der Transplantations- und Resektionsgruppe (I - IV) lag das Verhältnis von Lebergewicht zum Körpergewicht, was 0,8 % betrug, signifikant niedriger als in der Gruppe der Scheinoperation (V).

### **4.3 Überlebensrate**

In der Scheinoperationsgruppe (SHAM) und in der Resektionsgruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie (RES-ETA) überlebten alle Tiere (100 %) bis zum 14. Tag in einem guten Allgemeinzustand. In der Resektionsgruppe ohne Therapie I (RES) lag die Überlebensrate niedriger als in der Resektionsgruppe mit Therapie, aber signifikant höher als in der Transplantationsgruppe ohne Therapie (PLT). Am ersten postoperativen Tag verstarben in der Gruppe I (RES) zwei Tiere mit ausgebliebener Perfusion der Rest-Leber. Die verbliebenen fünf Ratten überlebten in einem guten Allgemeinzustand bis zu ihrer Operation am 14. Tag. Die Überlebensrate der Ratten in der Transplantationsgruppe ohne Therapie (PLT) zeigte bis zum zweiten Tag einen Abfall der Überlebensrate, wobei am ersten Tag drei Tiere und am folgenden Tag vier von 14 Tieren starben. Die restlichen sieben Ratten (50 %) überlebten bis zum 14. Tag in einem guten Allgemeinzustand. Bei den Tieren der Gruppe IV (PLT-ETA), die mit Darusentan<sup>®</sup> therapiert worden sind, verschlechterte sich die Überlebensrate vom ersten bis zum vierten Tag nach der Operation, an dem die Überlebensrate stagnierte. Am ersten Tag starb ein Tier; am dritten und vierten postoperativen Tag verstarben jeweils zwei Tiere, während neun Ratten bis zur Operation am 14. Tag im guten Allgemeinzustand überlebten.



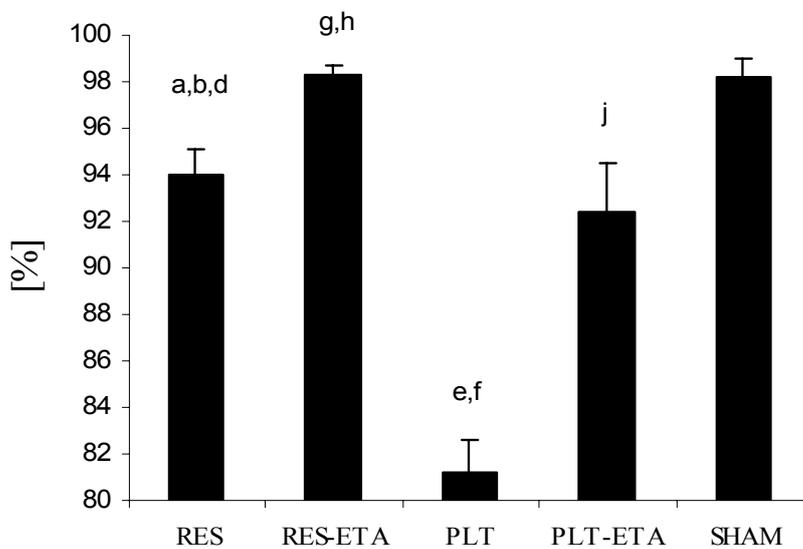
**Abb. 12: Überlebensraten**

Die Tiere der Resektionsgruppe I (RES) zeigten im Vergleich zur Transplantationsgruppe III (PLT) eine signifikant höhere Überlebensrate. Die Darusentan<sup>®</sup>-Therapie führte nach Leberresektion (RES-ETA) und Teil-Lebertransplantation (PLT-ETA) zu einer Steigerung der Überlebensrate. Die Tiere der Transplantationsgruppe mit Therapie (PLT-ETA) verstarben allerdings zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. nicht an den ersten beiden postoperativen Tagen wie in der Transplantationsgruppe ohne Therapie, sondern bis auf ein Tier am dritten und vierten Tag nach der durchgeführten Transplantation, wobei der Unterschied nicht signifikant war.

## 4.4 Mikrozirkulation

### 4.4.1 Perfusionsrate

In den Kurzzeitversuchen erfolgte die Untersuchung der Perfusionsrate der Leber mittels Intravitalmikroskopie. Dabei wurde 90 Minuten postoperativ in der Scheinoperationsgruppe V (SHAM) mit  $98,2 \pm 0,8 \%$  und in der Resektionsgruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie ( $98,3 \pm 0,4 \%$ ) fast alle Sinusoide pro Azinus perfundiert. In der Resektionsgruppe ohne Therapie (RES) war die Perfusionsrate signifikant niedriger ( $94 \pm 1,1 \%$ ) als in der Resektionsgruppe mit Therapie (RES-ETA) und auch als in der Scheinoperationsgruppe. Bei den Tieren der Transplantationsgruppe lag die Perfusionsrate signifikant niedriger als in der Scheinoperationsgruppe, wobei die Transplantationsgruppe ohne Therapie mit  $81,2 \pm 1,4 \%$  von allen Gruppen am niedrigsten war und signifikant niedriger als in der Transplantationsgruppe mit Therapie ( $92,4 \pm 2,1 \%$ ).



**Abb. 13:**  
**Perfusionsrate**

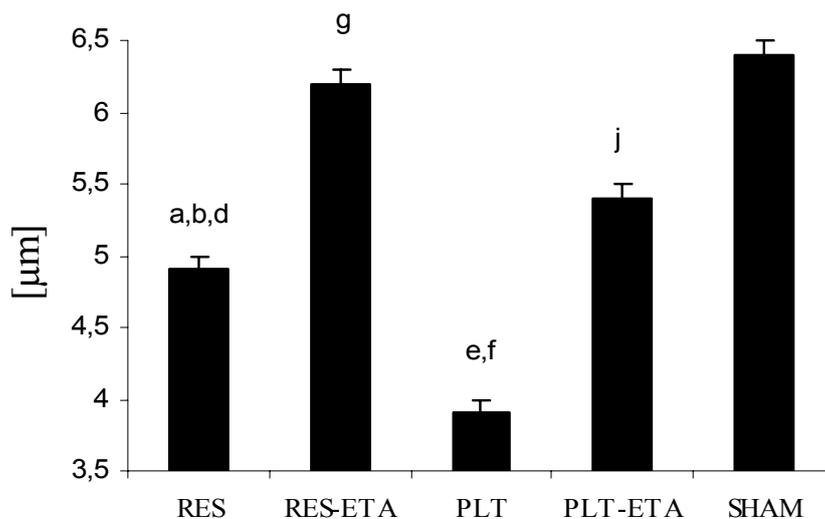
Signifikanzindices  
s. Anhang

In den Gruppen I (RES), III (PLT) und IV (PLT-ETA) zeigten sich signifikant niedrigere Perfusionsraten als in der Gruppe V (SHAM), nur die Resektionsgruppe mit Therapie zeigte eine vergleichbar hohe Perfusionsrate. Die Perfusionsrate in den Gruppen mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie war signifikant größer als in den Versuchsgruppen ohne Therapie.

#### 4.4.2 Gefäßdurchmesser

##### *Periportale Sinusoidweite*

Die periportale Sinusoidweite der Leber war 90 Minuten nach Reperfusion in der Scheinoperationsgruppe V (SHAM) mit  $6,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$  von allen Gruppen am größten. In der Resektionsgruppe ohne Therapie war die periportale Sinusoidweite ( $4,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) signifikant niedriger als in der Gruppe II mit Therapie ( $6,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ) und in der Scheinoperationsgruppe. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch im Vergleich der Transplantationsgruppen untereinander, bei der die Gruppe III (PLT) mit  $3,9 \pm 0,1 \mu\text{m}$  eine signifikant niedrigere Sinusoidweite aufwies als die Gruppe mit Darusentan<sup>®</sup> Therapie ( $5,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ). Beide Transplantationsgruppen wiesen einen signifikant kleineren periportale Sinusoidaldurchmesser auf als die Tiere in Gruppe V (SHAM).



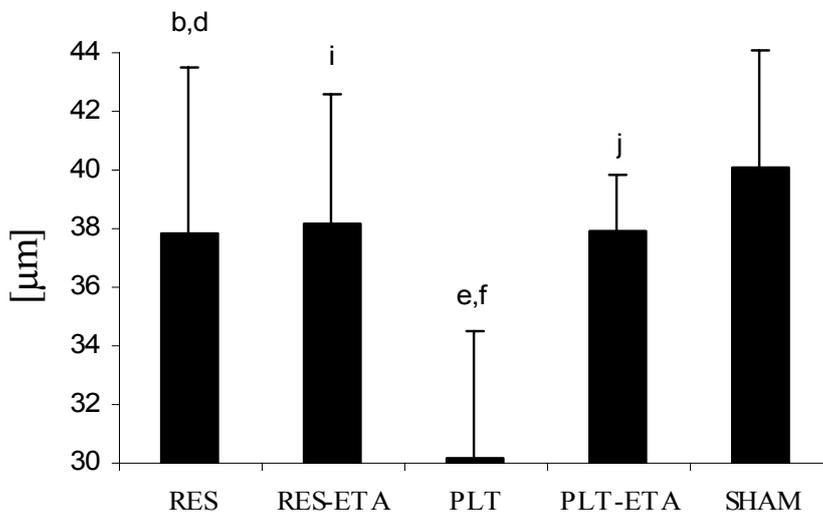
**Abb. 14:**  
**Periportale**  
**Sinusoidweite**

Signifikanzindices  
s. Anhang

Im Vergleich zur Gruppe der Scheinoperation wiesen die Transplantationsgruppen und die Resektionsgruppe ohne Therapie eine signifikant niedrigere periportale Sinusoidweite der Leber auf. Die Resektionsgruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie wies auch eine kleinere periportale Sinusoidweite auf als die Tiere in der Scheinoperationsgruppe, der jedoch nicht signifikant war. Die periportalen Sinusoidweiten waren ohne Therapie sowohl in der Transplantations- als auch in der Resektionsgruppe signifikant niedriger als in den Gruppen, in denen eine solche Therapie durchgeführt worden ist.

### Postsinusoidaler Venendurchmesser

Der postsinusoidale Venendurchmesser der Leber war in der Scheinoperationsgruppe V (SHAM) mit  $40,1 \pm 4 \mu\text{m}$  signifikant größer als in den vier restlichen Gruppen. Der postsinusoidale Venendurchmesser in der Resektionsgruppe ohne Therapie ( $37,8 \pm 5,7 \mu\text{m}$ ) unterschied sich nicht signifikant von der Gruppe II ( $38,2 \pm 4,4 \mu\text{m}$ ). In der Transplantationsgruppe lag der postsinusoidale Venendurchmesser mit  $30,2 \pm 4,3 \mu\text{m}$  bei den Tieren ohne Therapie signifikant niedriger als mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie (Gruppe IV:  $37,9 \pm 1,9 \mu\text{m}$ ).



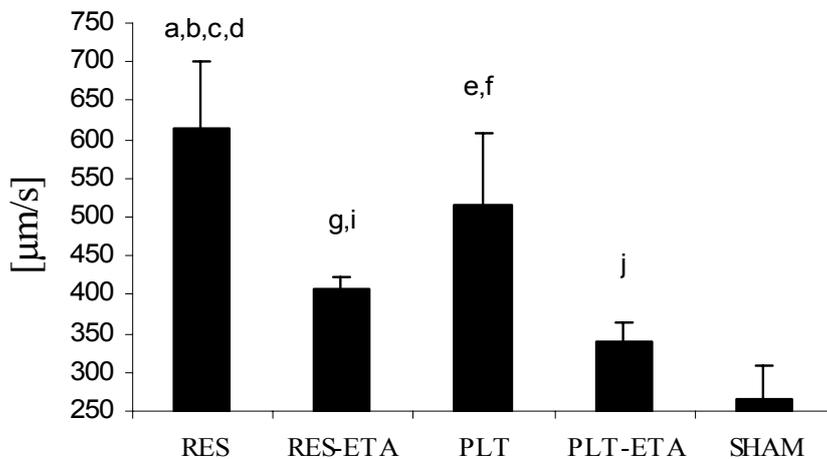
**Abb. 15:**  
Postsinusoidaler  
Venendurchmesser

Signifikanzindices  
s. Anhang

### 4.4.3 Flussgeschwindigkeit

#### *Leukozytengeschwindigkeit im Azinus*

In den Gruppen I - IV lag die Flussgeschwindigkeit signifikant höher als in der Scheinoperationsgruppe ( $263,9 \pm 44,8 \mu\text{m/s}$ ), wobei sie in der Resektionsgruppe ohne Therapie ( $615,7 \pm 84,9 \mu\text{m/s}$ ) am höchsten war und auch signifikant höher als in der Resektionsgruppe mit Therapie ( $408,2 \pm 13,5 \mu\text{m/s}$ ). Auch in der Teil-Lebertransplantationsgruppe ohne Therapie ( $516,5 \pm 92,7 \mu\text{m/s}$ ) lag eine signifikant höhere azinäre Leukozytengeschwindigkeit als in der Gruppe mit Darusentan<sup>®</sup> Therapie vor ( $339,9 \pm 23,1 \mu\text{m/s}$ ).



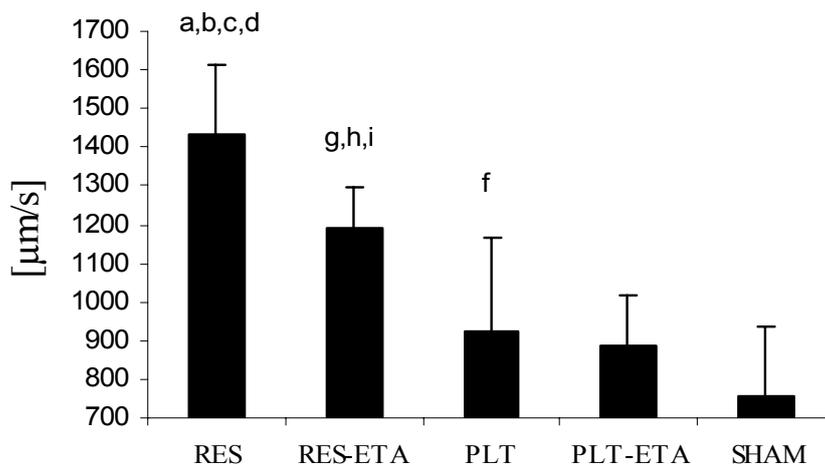
**Abb. 16:**  
**Leukozyten-**  
**geschwindigkeit im**  
**Azinus**

Signifikanzindices  
s. Anhang

In beiden Transplantations- und Resektionsgruppen lag die Leukozytengeschwindigkeit im Azinus signifikant höher als in der Scheinoperationsgruppe. Die beiden Gruppen I und III ohne Therapie zeigten im Vergleich zu den Therapiegruppen jeweils signifikant höhere azinäre Geschwindigkeiten der Leukozyten.

#### *Leukozytengeschwindigkeiten in den postsinusoidalen Venen*

Die Leukozytengeschwindigkeiten in den postsinusoidalen Venen waren in allen Gruppen um das 1,8- bis 2,9-fache höher als in den Lebersinusoiden. Die niedrigste Leukozytengeschwindigkeit wurde mit  $757,2 \pm 177,1 \mu\text{m/s}$  in der Scheinoperationsgruppe gemessen und war signifikant niedriger als die Leukozytengeschwindigkeit in den Resektionsgruppen und in der Transplantationsgruppe ohne Therapie. Innerhalb der Resektionsgruppe waren die Geschwindigkeiten in den postsinusoidalen Venen bei den Tieren ohne Therapie mit  $1434,9 \pm 176,9 \mu\text{m/s}$  signifikant höher als in der Gruppe mit Therapie ( $1192,2 \pm 105,9 \mu\text{m/s}$ ). Die Gruppe der Teil-Lebertransplantation mit Therapie zeigte eine geringere Geschwindigkeit der Leukozyten ( $886,1 \pm 133,1 \mu\text{m/s}$ ) in den postsinusoidalen Venen als die Gruppe ohne Therapie ( $926,3 \pm 239,2 \mu\text{m/s}$ ).



**Abb. 17:**  
**Leukozytengeschwindigkeit Vene**

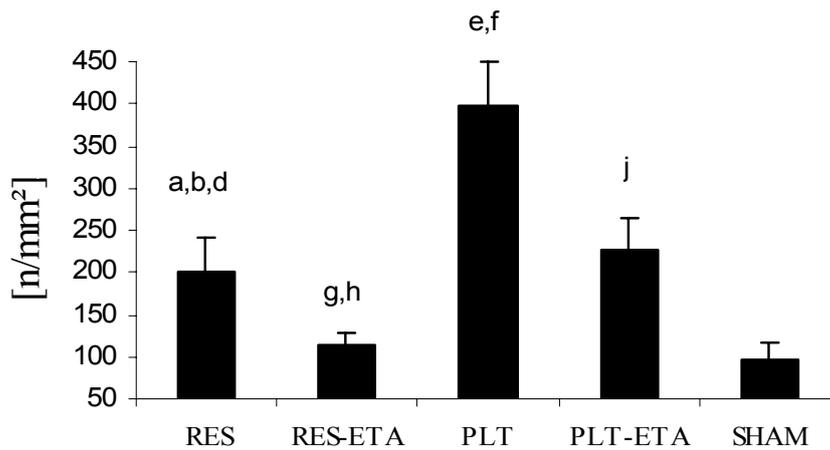
Signifikanzindices  
s. Anhang

Die Leukozytengeschwindigkeit in den postsinusoidalen Venen war sowohl in der Resektionsgruppe mit Therapie als auch in der Transplantationsgruppe unter Darusentan®-Therapie signifikant niedriger als in der jeweiligen Gruppe ohne Therapie.

#### 4.4.4 Leukozyten-Endothel-Interaktion

*„Sticker“ pro Azinus*

In den Gruppen I (RES), III (PLT) und IV (PLT-ETA) war die Anzahl der „Sticker“ pro Azinus signifikant höher als in der Scheinoperationsgruppe ( $97,8 \pm 17,5$  „Sticker“/mm<sup>2</sup>), wobei sie in der Transplantationsgruppe ohne Therapie ( $398,2 \pm 51,3$  „Sticker“/mm<sup>2</sup>) am höchsten war und signifikant höher als in der Transplantationsgruppe mit Therapie ( $227,4 \pm 37$  „Sticker“/mm<sup>2</sup>). In der Leberresektionsgruppe ohne Therapie fand sich mit  $199,7 \pm 42,5$  „Sticker“/mm<sup>2</sup> eine signifikant höhere Anzahl an „Stickern“ pro Azinus als in der Resektionsgruppe mit Darusentan® Therapie ( $113,9 \pm 13,9$  „Sticker“/mm<sup>2</sup>).



**Abb. 18:**  
**„Sticker“ pro**  
**Azinus**

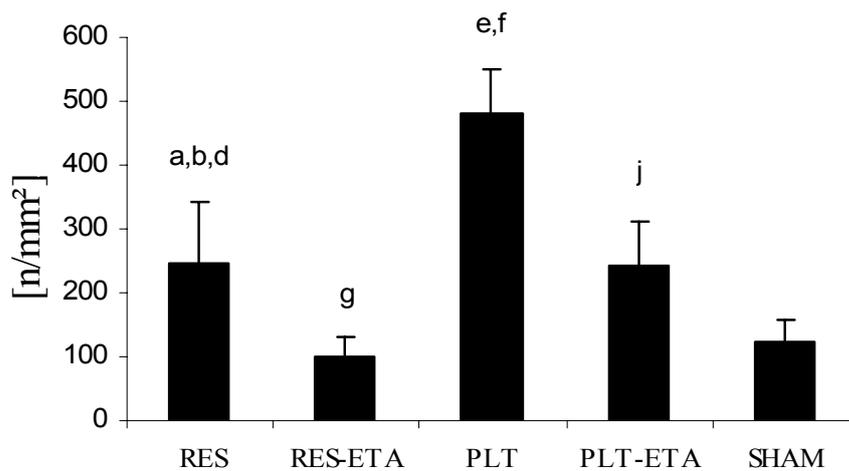
Signifikanzindices  
s. Anhang

In allen Gruppen war die Anzahl der „Sticker“ pro Azinus größer als in der Scheinoperationsgruppe. In den Transplantations- und Resektionsgruppen mit Therapie lag die Anzahl der „Sticker“ pro Azinus signifikant niedriger als in den entsprechenden Gruppen ohne die Therapie.

#### „Sticker“ pro Vene

In den postsinusoidalen Venen war im Vergleich zu den sinusoidalen Venen eine höhere Anzahl an „Stickern“ vorzufinden, mit Ausnahme der Resektionsgruppe mit Therapie. In den Gruppen I (RES), III (PLT) und IV (PLT-ETA) war die Anzahl der „Sticker“ signifikant größer als in der Scheinoperationsgruppe ( $122,1 \pm 35$  „Sticker“/mm<sup>2</sup>).

In der Transplantationsgruppe ohne Darusentan<sup>®</sup>-Therapie ( $481,4 \pm 69,3$  „Sticker“/mm<sup>2</sup>) fand sich die höchste Anzahl an „Stickern“ pro Vene und war signifikant größer als in der Transplantationsgruppe mit Therapie ( $241,1 \pm 69,9$  „Sticker“/mm<sup>2</sup>). In der Leberresektionsgruppe ohne Therapie fand sich mit  $246,9 \pm 94,7$  „Stickern“/mm<sup>2</sup> eine signifikant höhere Anzahl an „Stickern“ pro Vene als in der Gruppe mit Darusentan<sup>®</sup> Therapie ( $99,9 \pm 29,8$  „Sticker“/mm<sup>2</sup>).



**Abb. 19:**  
„Sticker“ pro Venen-  
innenfläche

Signifikanzindices s.  
Anhang

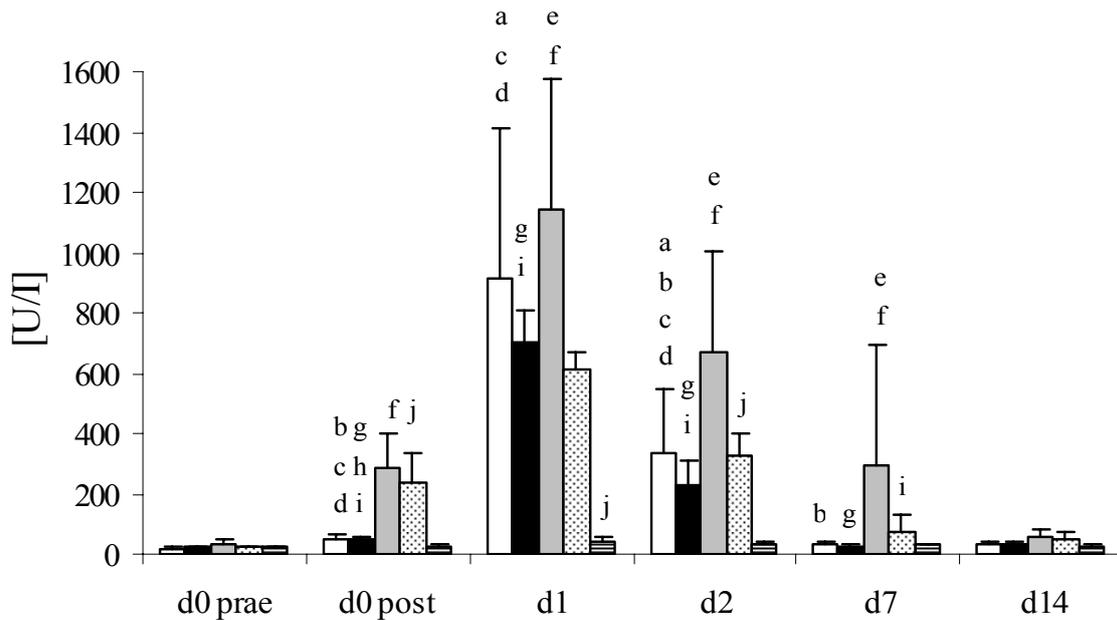
Die Resektionsgruppe und die Transplantationsgruppe ohne Therapie zeigten im Vergleich zur Therapiegruppe eine signifikant höhere Anzahl von „Stickern“ pro Vene.

#### 4.5 Serumchemie

##### *Alanin-Aminotransferase (ALAT)*

Die ALAT-Konzentration war präoperativ in allen Gruppen im Normbereich. Vom Operationstag beginnend stieg der ALAT-Spiegel in allen Gruppen bis zu ihren Höchstwerten am ersten postoperativen Tag an, die dann im weiteren postoperativen Verlauf bis zum 14. Tag zurückgingen und spätestens am 14. Tag in allen Gruppen wieder im Normbereich lagen. In der Resektionsgruppe erfolgte vom Operationstag beginnend ein Anstieg der ALAT-Spiegel bis zum ersten Tag, mit einem Höchstwert von  $912,2 \pm 502,1$  U/I in der Gruppe ohne Therapie und mit  $700,4 \pm 105,3$  U/I in der Gruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie. Im weiteren postoperativen Verlauf kam es zu einem Rückgang der ALAT-Spiegel, die dann am 7. und 14. Tag wieder im Normbereich lagen. Die Tiere der Transplantationsgruppe wiesen im postoperativen Verlauf bis einschließlich zum 7. Tag eine signifikant höhere ALAT-Konzentration auf als die Tiere der Scheinoperationsgruppe (SHAM) und lagen erst am 14. Tag wieder im Normbereich. Der ALAT-Spiegel stieg postoperativ kontinuierlich bis zum ersten postoperativen Tag an und er-

reichte in der Transplantationsgruppe ohne Therapie eine Konzentration von  $1144,1 \pm 435,2$  U/I, während die Konzentration in der Transplantationsgruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie signifikant niedriger lag ( $611,6 \pm 59,7$  U/I). Am 1., 2., und 7. Tag waren die ALAT-Spiegel in der Transplantationsgruppe mit Therapie signifikant kleiner als in der Gruppe ohne Therapie.



**Abb. 20: ALAT-Spiegel (logarithmische Darstellung)**

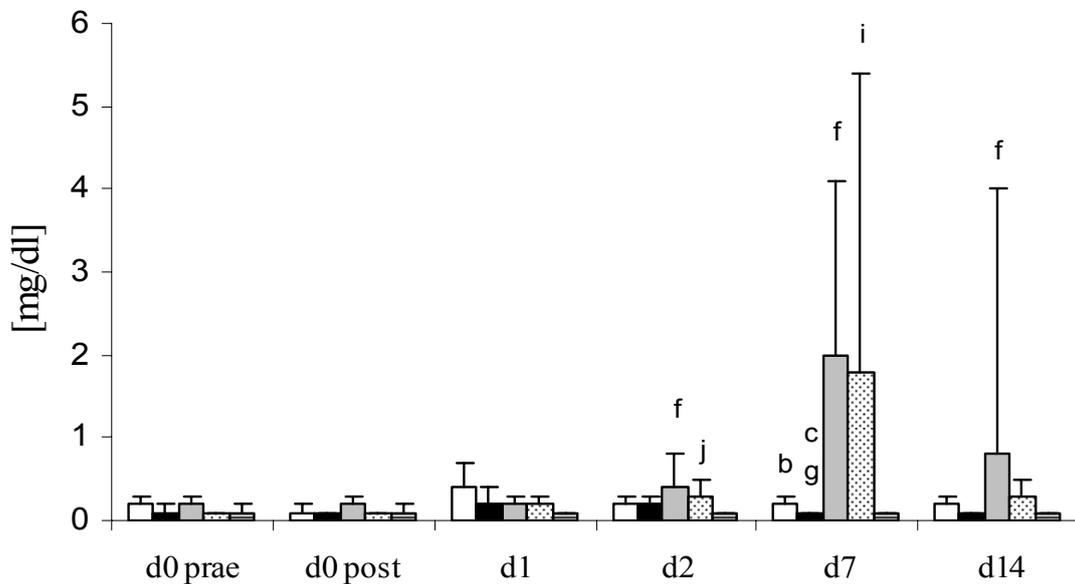
Gr. I (RES) = , Gr. II (RES-ETA) = , Gr. III (PLT) = ,  
Gr. IV (PLT-ETA) = , Gr. V (SHAM) = . Signifikanzindices s. Anhang

Die Resektionsgruppe mit Therapie (RES-ETA) und die Transplantationsgruppe mit Therapie (PLT-ETA) wiesen in den ersten beiden postoperativen Tagen im Vergleich zu den jeweiligen Gruppen ohne Darusentan<sup>®</sup> Therapie einen signifikant niedrigeren ALAT-Spiegel auf. In allen Gruppen kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg der ALAT-Konzentration mit einem Peak am ersten Tag.

### *Bilirubin*

Präoperativ, am Operationstag und am 1. Tag war die Bilirubin-Konzentration in allen Gruppen im Normbereich. Ab dem 2. postoperativen Tag zeigt die Transplantationsgruppe einen kontinuierlichen Anstieg der Bilirubin-Konzentration bis zum 7. Tag

(PLT:  $2 \pm 2,1$  mg/dl; PLT-ETA:  $1,8 \pm 3,6$  mg/dl), die dann am 14. Tag wieder zurückgingen (PLT  $0,8 \pm 3,2$  mg/dl; PLT-ETA:  $0,3 \pm 0,2$  mg/dl).



**Abb. 21: Bilirubin-Spiegel**

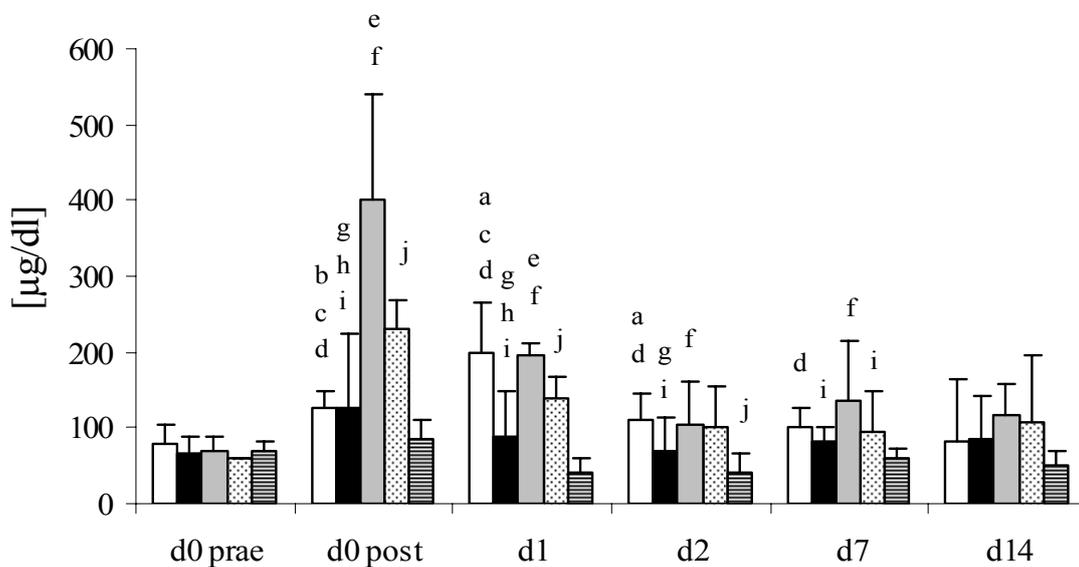
Gr. I (RES) = Gr. II (RES-ETA) = Gr. III (PLT) =   
Gr. IV (PLT-ETA) = Gr. V (SHAM) = . Signifikanzindices s. Anhang

Die Transplantationsgruppe mit Therapie zeigte im Vergleich zur Gruppe ohne Therapie am 7. und 14. Tag niedrigere Bilirubinwerte. Am 14. Tag lag die Transplantationsgruppe mit Therapie wieder im Normbereich, während die Gruppe ohne Therapie noch eine signifikant höhere Bilirubin-Konzentration aufwies als die Kontrollgruppe ( $0,1 \pm 0$  mg/dl).

#### *Ammoniak (NH<sub>3</sub>)*

Die NH<sub>3</sub>-Konzentration war präoperativ in allen Gruppen im Normbereich. Postoperativ vom Operationstag bis zum 7. Tag war die NH<sub>3</sub> Konzentration in den Gruppen I - IV signifikant größer als in der Scheinoperationsgruppe und erst am 14. Tag wieder im Normbereich. Mit Ausnahme der Resektionsgruppe ohne Therapie (RES), die ihren Höchstwert der NH<sub>3</sub>-Konzentration am 1. Tag erlangte, erreichten alle Gruppen ihre Höchstwerte der Konzentration von NH<sub>3</sub> am Operationstag, die dann im weiteren Ver-

lauf weiter absank. In der Resektionsgruppe kam es am Operationstag zu einem signifikanten Anstieg der  $\text{NH}_3$ -Konzentration im Vergleich zur Scheinoperationsgruppe, wobei sich die Resektionsgruppe mit bzw. ohne Therapie nicht signifikant unterschied (RES:  $127,6 \pm 19,8 \mu\text{g/dl}$ ; RES-ETA:  $126,6 \pm 97,1 \mu\text{g/dl}$ ). Am Operationstag und am 1. Tag zeigte die Transplantationsgruppe mit Therapie eine bis zu 1,7-fache signifikant niedrigere  $\text{NH}_3$ -Konzentration als die Gruppe ohne Darusentan<sup>®</sup>-Therapie. Die Tiere der Resektionsgruppe mit Therapie wiesen am ersten und zweiten postoperativen Tag eine signifikant niedrigere  $\text{NH}_3$ -Konzentration auf als die Gruppe ohne diese Therapie.



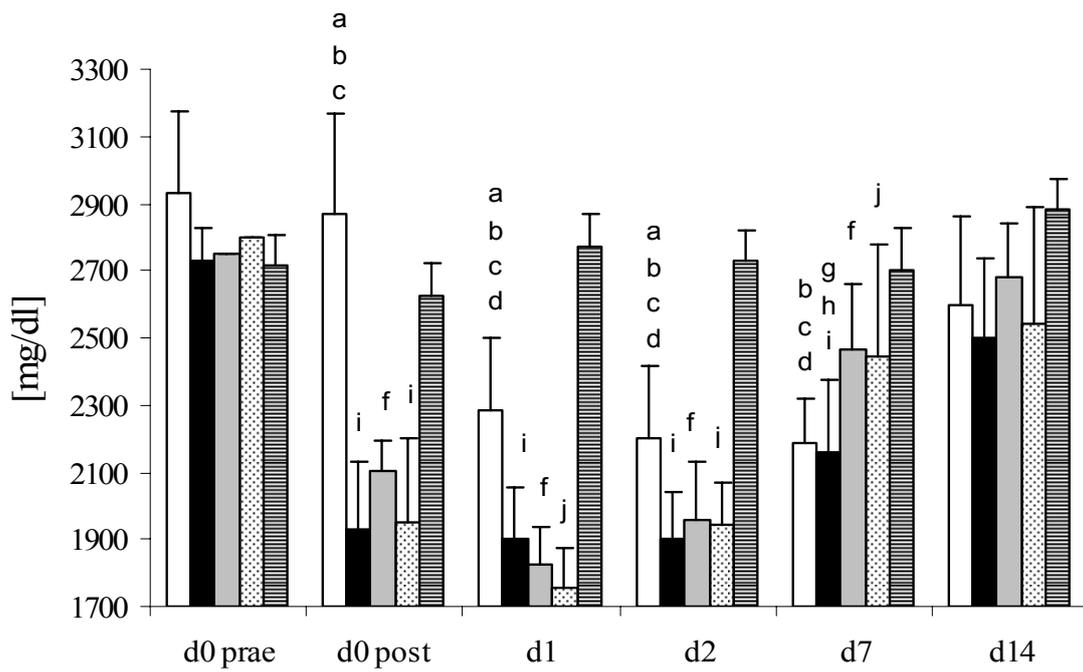
**Abb. 22: Ammoniak-Spiegel**

Gr. I (RES) = Gr. II (RES-ETA) = Gr. III (PLT) =   
 Gr. IV (PLT-ETA) = Gr. V (SHAM) = . Signifikanzindices s. Anhang

Vom Operationstag bis zum 7. Tag war die  $\text{NH}_3$  Konzentration in den Gruppen I - IV signifikant größer als in der Scheinoperationsgruppe und normalisierte sich erst wieder am 14. Tag. In der Resektionsgruppe war die  $\text{NH}_3$ -Konzentration in der Gruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie am 1. und 2. Tag signifikant niedriger als in der Gruppe ohne Therapie. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in der Transplantationsgruppe, bei der die Tiere mit Therapie am Operationstag und 1. Tag eine signifikant niedrigere  $\text{NH}_3$ -Konzentration aufwiesen als in der Transplantationsgruppe ohne Therapie.

### *Albumin*

Die Albumin-Konzentration war präoperativ in allen Gruppen im Normbereich. Vom Operationstag bis zum 7. Tag lag mit Ausnahme der Resektionsgruppe ohne Therapie am Operationstag die Albumin-Konzentration in den restlichen Gruppen (II, III, IV) signifikant niedriger als in der Scheinoperationsgruppe und normalisierte sich erst wieder am 14. Tag. In der Transplantationsgruppe sank der Albuminspiegel vom Operationstag bis zum 1. postoperativen Tag, an dem er seinen Tiefpunkt erreichte (PLT:  $1828,6 \pm 111,3$  mg/dl; PLT-ETA:  $1757,1 \pm 113,4$  mg/dl) und stieg dann bis zum 14. Tag wieder an, an dem sich die Albumin Konzentration normalisiert hatte. Während des gesamten postoperativen Verlaufs bis zum 7. Tag war die Albumin-Konzentration signifikant niedriger als in der Scheinoperationsgruppe. In der Transplantationsgruppe gab es zwischen der Gruppe mit Therapie und der Gruppe ohne Therapie keine signifikanten Unterschiede. In der Resektionsgruppe kam es bis zum 2. Tag zu einem Abfall der Albumin-Konzentration, die am zweiten Tag ihren Tiefpunkt markierte (RES:  $2200 \pm 216$  mg/dl; RES-ETA:  $1900 \pm 141,4$  mg/dl). Im weiteren postoperativen Verlauf kam es zu einer Erhöhung der Albumin-Konzentration, bis am 14. Tag die Konzentration des Albumins wieder im Normbereich lag. In der Resektionsgruppe ohne Therapie lag die Albumin-Konzentration vom Operationstag bis zum 2. Tag signifikant höher als in der Therapiegruppe und am 1., 2. Tag und 7. Tag signifikant niedriger als in der Scheinoperationsgruppe.



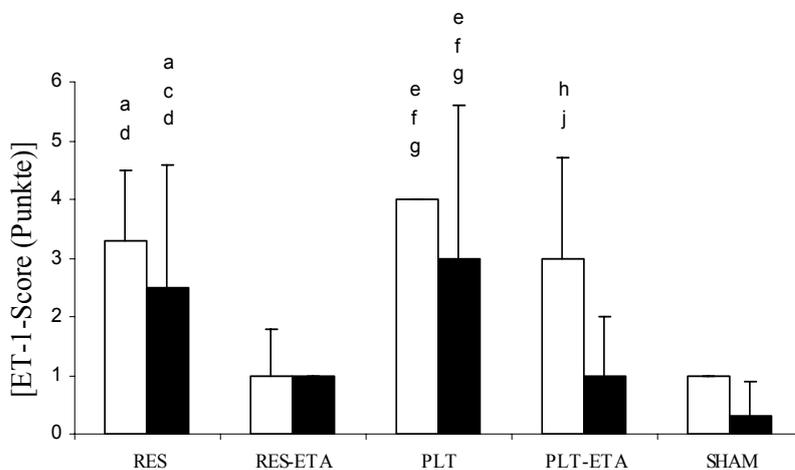
**Abb. 23: Albumin**

Gr. I (RES) = , Gr. II (RES-ETA) = , Gr. III (PLT) = ,  
 Gr. IV (PLT-ETA) = , Gr. V (SHAM) = . Signifkanzindices s. Anhang

## 4.6 Morphologie und Immunhistochemie

### Endothelin-1 / Endothelin-A-Rezeptor

In der Scheinoperationsgruppe (SHAM) wurde 120 Minuten postoperativ ET-1 bzw. ETAR semiquantitativ bestimmt. Die Konzentration von ET-1 mit  $1 \pm 0$ , bzw. von ETAR mit  $0,3 \pm 0,6$  war im Vergleich mit den anderen vier Gruppen (I - IV) am niedrigsten. Die Resektionsgruppe ohne Therapie zeigte eine ET-1 Konzentration von  $3,3 \pm 1,2$  und war signifikant höher als in der Resektionsgruppe mit Therapie ( $1 \pm 0,8$ ) und in der Scheinoperationsgruppe. Die Konzentration von ETAR zeigte ein ähnliches Bild und lag in der Resektionsgruppe ohne Therapie bei  $2,5 \pm 2,1$  und war damit signifikant größer als in der Resektionsgruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie ( $1 \pm 0$ ) und als in der Scheinoperationsgruppe. Die ET-1 und ETAR-Konzentration der Transplantationsgruppe ohne Therapie (ET-1:  $4 \pm 0$ ; ETAR:  $3 \pm 2,6$ ) war signifikant höher als in der jeweiligen Gruppe mit Therapie (ET-1:  $3 \pm 1,7$ ; ETAR:  $1 \pm 1$ ) und in der Scheinoperationsgruppe.



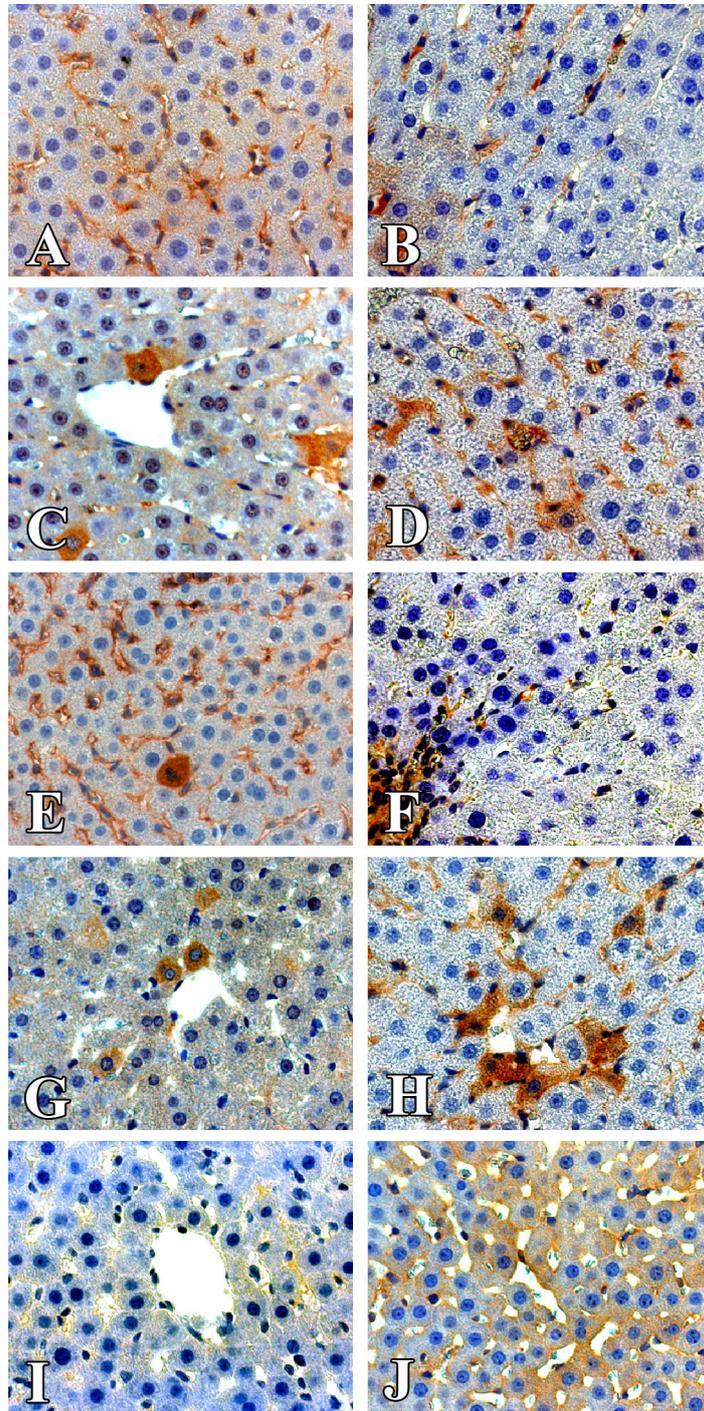
**Abb. 24:**  
**Endothelin-1 / Endothelin-A-Rezeptor**

Endothelin-1 = ,  
Endothelin-A Rezeptor =   
Signifikanzindices  
s. Anhang

### eNOS (= endothelial nitric oxide synthase)

Im Vergleich zur physiologischen eNOS-Protein-Expression (Scheinoperationsgruppe) führten die Leberresektion (RES) und Teil-Lebertransplantation (PLT) zu einer deutlich

verminderten eNOS-Protein-Expression, die durch die Darusentan<sup>®</sup>-Therapie (RES-ETA, PLT-ETA) wieder zunahm.

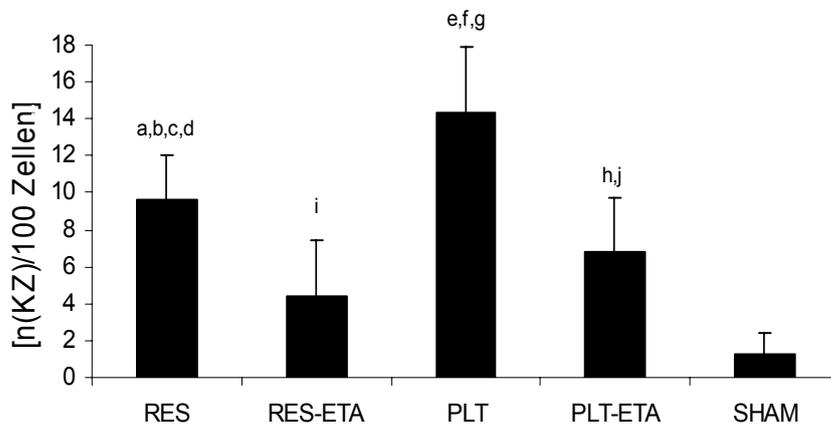


**Abb. 25: Proteinexpression von ET-1 und eNOS 120 Minuten postoperativ**

ET-1 = linke Spalte, eNOS = rechte Spalte, RES (Gruppe I, A + B), RES-ETA (Gruppe II, C + D), PLT (Gruppe III, E + F), PLT-ETA (Gruppe IV, G + H), SHAM (Gruppe V, I + J)

### **Anzahl der Kupfferzellen**

Die Kupfferzell-Anzahl war in allen vier Gruppen (I - IV) signifikant höher als in der Scheinoperationsgruppe ( $1,3 \pm 1,1$ ). In der Resektionsgruppe ohne Therapie war die Anzahl der Kupfferzellen mit  $9,6 \pm 2,4$  signifikant größer als in der Resektionsgruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie ( $4,4 \pm 3$ ) und als in der Scheinoperationsgruppe (SHAM). Ein ähnliches Bild zeigte die Transplantationsgruppe, bei der die Anzahl der Kupfferzellen ohne Therapie mit einer Anzahl von  $14,3 \pm 3,6$  signifikant höher war als in der Transplantationsgruppe mit Therapie durch Darusentan<sup>®</sup> ( $6,8 \pm 2,9$ ). In der Leberresektionsgruppe (RES) und in der Transplantationsgruppe (PLT) zeigte sich ein Verteilungsgradient, der von den periportalen Feldern bis zur Zentralvene anstieg.



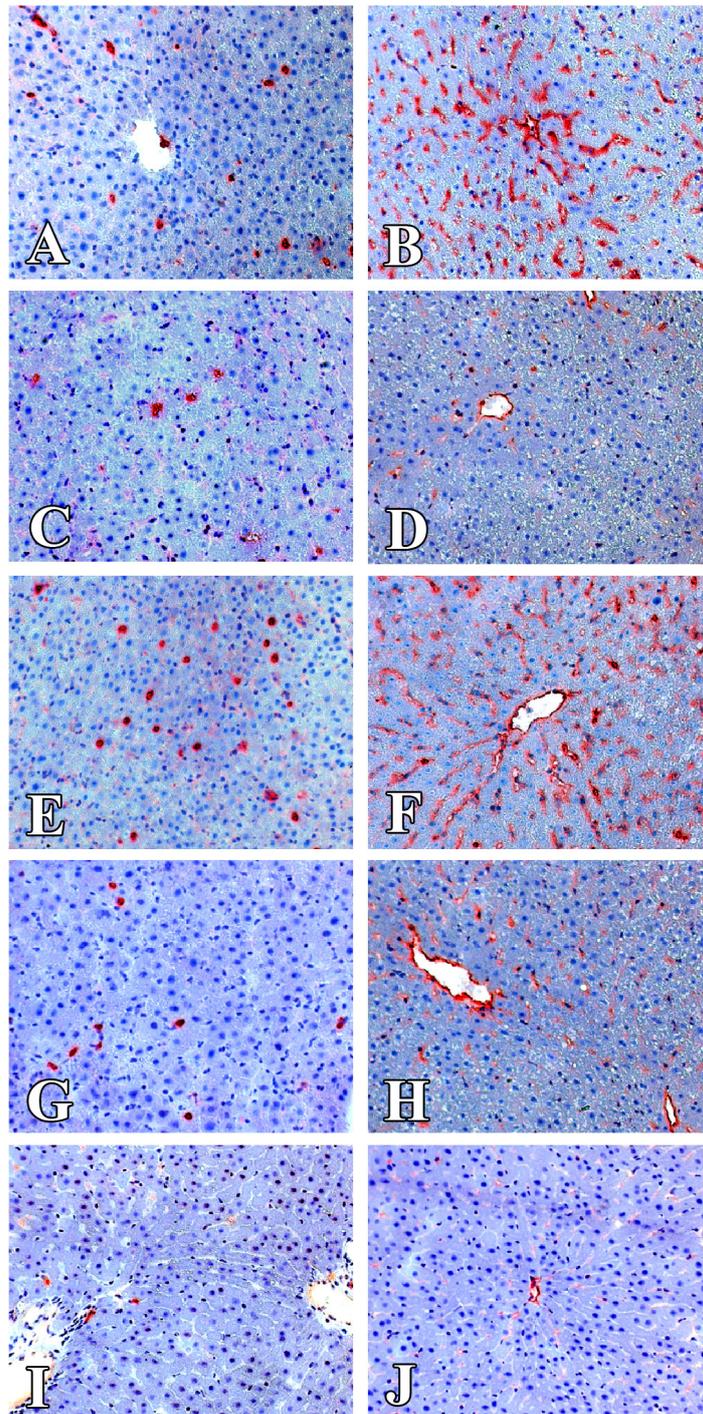
**Abb. 26:**  
**Anzahl Kupfferzellen**

*Signifikanzindices  
s. Anhang*

Mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie war die Anzahl der Kupfferzellen sowohl in der Resektionsgruppe als auch in der Transplantationsgruppe signifikant niedriger als in den Gruppen ohne Therapie. Alle Gruppen I - IV wiesen zudem signifikant höhere Werte auf als die Tiere in der Scheinoperationsgruppe (SHAM).

### **Endothelzellen-Reaktivität - RECA (= rat endothelial cell antigen)**

Bei der Untersuchung der Endothelzellen-Reaktivität 120 Minuten postoperativ war in der Scheinoperation nur eine geringe Endothelzellen-Reaktivität festzustellen. Sowohl in der Resektionsgruppe mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie als auch in der Transplantationsgruppe mit Therapie wurde eine herabgesetzte Endothelzellen-Reaktivität beobachtet, während in den jeweiligen Gruppen ohne diese Therapie eine starke Endothelzellen-Reaktivität festzustellen war.

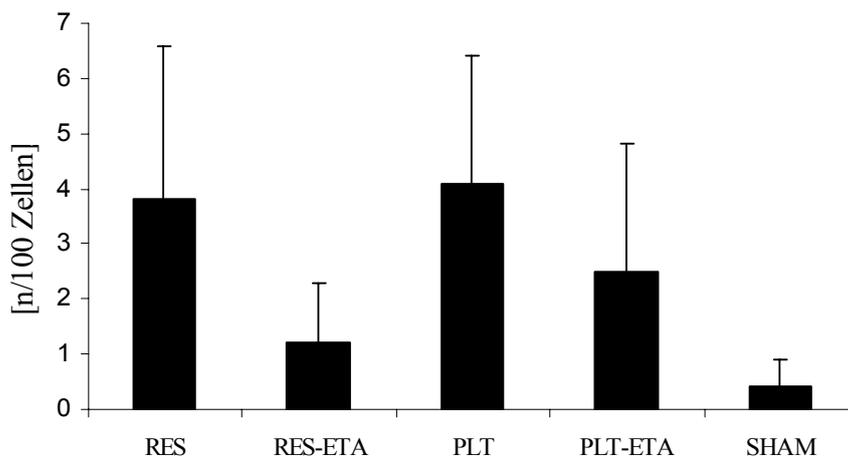


**Abb. 27: Markierte Kupferzellen und RECA 120 Minuten postoperativ**

Kupferzellen (ED-1-markiert = linke Spalte, RECA = rechte Spalte, RES (Gruppe I, A + B), RES-ETA (Gruppe II, C + D), PLT (Gruppe III, E + F), PLT-ETA (Gruppe IV, G + H), SHAM (Gruppe V, I + J)

## Apoptose-Index

Der Apoptose-Index der Hepatocyten und Nicht-Parenchymzellen war nach Leberresektion und Teil-Lebertransplantation signifikant höher als in der Scheinoperationsgruppe und konnte durch die Darusentan<sup>®</sup>-Therapie (RES-ETA, PLT-ETA) signifikant gesenkt werden.

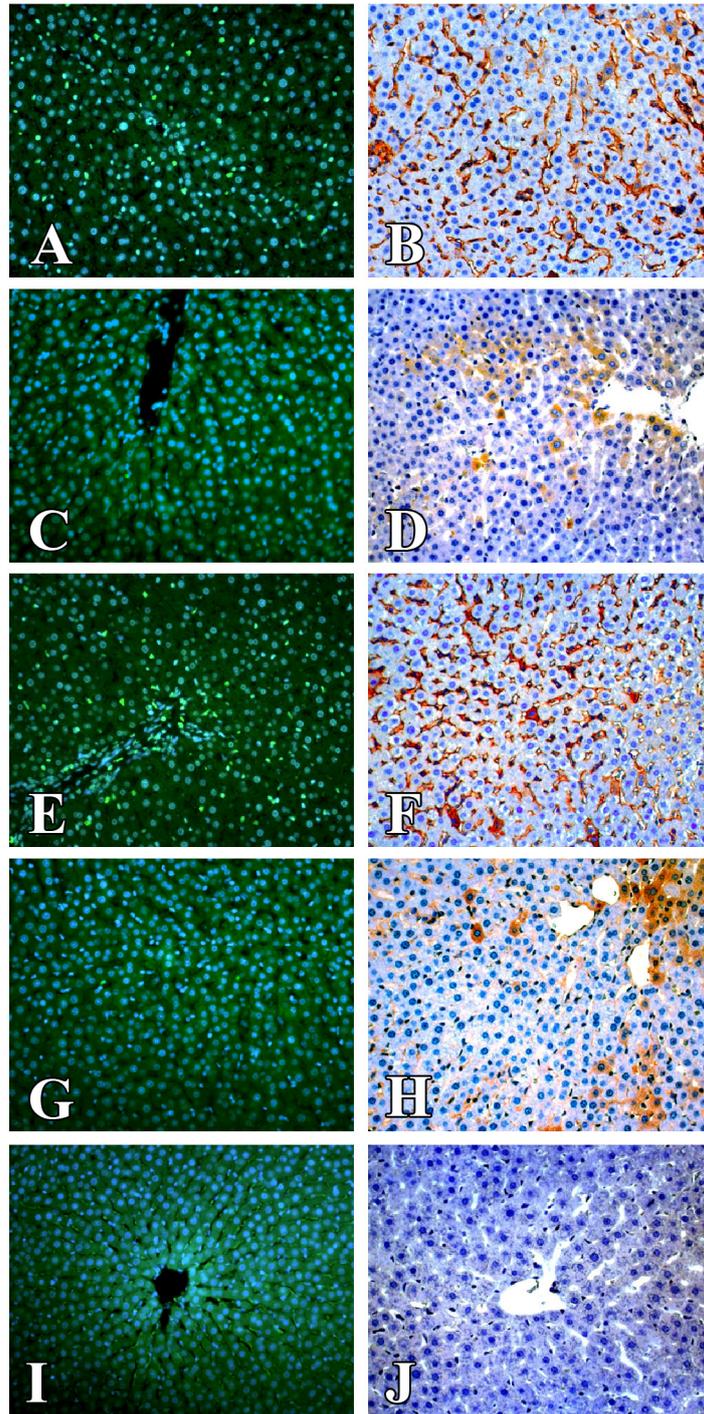


**Abb. 28:**  
**Apoptose-Index**

*Signifikanzindices s.  
Anhang*

## Nitrotyrosin

In der Scheinoperationsgruppe konnte keine Nitrotyrosin-Expression nachgewiesen werden, während in der Resektionsgruppe und in der Transplantationsgruppe ohne Therapie eine starke Nitrotyrosin-Expression besonders in den Endothelzellen festgestellt werden konnte. In den Gruppen mit Darusentan<sup>®</sup>-Therapie wurde im Vergleich zu den nicht therapierten Gruppen eine Reduktion der Nitrotyrosin-Expression beobachtet.



**Abb. 29: Apoptose und Nitrotyrosin 120 Minuten postoperativ**

Apoptose = linke Spalte (grün), Nitrotyrosin = rechte Spalte (braun), RES (Gruppe I, A + B), RES-ETA (Gruppe II, C + D), PLT (Gruppe III, E + F), PLT-ETA (Gruppe IV, G + H), SHAM (Gruppe V, I + J)

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Klinischer Stellenwert der Therapie des Small-for-size Syndrom nach Größenreduzierter Lebertransplantation

Obwohl die Größenreduzierte Lebertransplantation durch die Einführung innovativer Resektionstechniken der Leber inzwischen als eine etablierte Therapieoption angesehen werden kann, wird sie derzeit nur in einer begrenzten Anzahl an Transplantationszentren durchgeführt. Neben dem technischen und logistischen Aufwand, der z.B. bei der Durchführung einer Leber-Lebendspende entsteht, stellen die schwierige präoperative Einschätzung und die begrenzten therapeutischen Möglichkeiten des SFS eine wesentliche Ursache dieser Entwicklung dar. In klinischen Fallberichten und experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass durch eine portale Dekompression, z.B. durch die Anlage eines portosystemischen Shunts, oder durch eine Verbesserung des venösen Ausstromes des Größenreduzierten Transplantats, dass SFS erfolgreich therapiert werden kann. Die Anwendung dieser Maßnahmen im klinischen Alltag werden jedoch durch die schwierige Indikationsstellung erschwert, weshalb bei klinischer Manifestation des SFS häufiger eine Leber-Re-Transplantation favorisiert wird als die Anlage eines portosystemischen Shunts bei einem i.d.R. multimorbiden Patienten. Darüber hinaus tritt das SFS in Abhängigkeit des Fortschreitens der Leberregeneration vorübergehend auf. Dementsprechend ist z.B. nach der Anlage eines portosystemischen Shunts nach erfolgreicher Therapie des SFS die Aufhebung desselben notwendig, um enzephalopathische Nebenwirkungen zu vermeiden.

In Anlehnung der erfolgreichen, aber aufwendigen Therapie des SFS durch portosystemische Shunts wurde in dieser Studie der intrahepatische Widerstand im sinusoidalen Gefäßbett als therapeutischer Angriffspunkt gewählt. Darüber hinaus erfolgte ein medikamentöser Therapieansatz, der gut steuerbar ist und zeitlich begrenzt in Abhängigkeit des Fortschreitens der Leberregeneration durchgeführt werden kann.

## **5.2 Entwicklung eines experimentellen Modells der größtenreduzierten Lebertransplantation an der Ratte**

Ziel dieser Studie war deshalb zunächst die Entwicklung eines experimentellen Modells an der Ratte, das die klinischen Grundzüge des SFS simuliert und sich darüber hinaus zur Untersuchung der Mikrozirkulation eignet.

Ratten wurden aus wissenschaftlichen und logistischen Gründen als Versuchstiere ausgewählt. Bezüglich der Pathophysiologie von Mikrozirkulationsstörungen nach Leberresektion und Teillebertransplantation sind wesentliche Erkenntnisse an der Ratte vorhanden. Ferner sind alle Transplantationsmodelle, insbesondere die mikrochirurgische Technik an der Ratte etabliert. Eine wichtige Voraussetzung im Rahmen der Vermeidung von Abstoßungsreaktionen bei der Lebertransplantation ist die Übereinstimmung des so genannten Major-Histocompatibilitäts-Komplexes (MHC) zwischen Spender und Empfänger. Deshalb wurden in dieser Studie Ratten-Inzucht-Stämme gewählt, da mit der Verwendung von syngenem, d.h. genetisch identischen Spender- und Empfängertieren, transplantationsimmunologische Abstoßungsreaktionen ausgeschlossen werden können und keine Immunsuppression nötig ist. Dies ermöglicht, Untersuchungen über Funktion und histologische Veränderungen des Transplantats durchzuführen, ohne durch Abstoßungsreaktionen verfälscht zu werden. Ratten als Versuchstiere sind im Vergleich zu anderen Versuchstieren wesentlich stressresistenter und daher auch weniger anfällig für z.B. Herz-Kreislauf-Komplikationen, was besonders für diese Studie mit den ohnehin sehr kreislaufbelastenden operativen Eingriffen von entscheidendem Vorteil ist. Auch gegenüber Infektionen sind Ratten wesentlich unempfindlicher als beispielsweise Schweine, weshalb sich eine prophylaktische oder postoperative Antibiose erübrigt und deshalb keine weiteren unterstützenden Maßnahmen wie Bluttransfusionen oder Infektionsprophylaxe erforderlich sind.

Die Ratte eignet sich außerdem für dieses Versuchsvorhaben sehr gut, da die Aufzweigung der intrahepatischen Blutgefäße bei dieser Spezies der des Menschen ähnlich ist, so dass die beim Menschen übliche Einteilung der Leber in acht Segmente übernommen werden kann [11]. Zur partiellen Leberresektion liegen zahlreiche etablierte Techniken am Rattenmodell vor, die an der Ratte leicht durchzuführen sind und genaue Vergleiche der Regenerationsraten erlauben [4, 56]. Aufgrund der starken Lappung der Rattenleber

ist es möglich, jeweils einen gesamten Lappen basisnah mit nur einer Ligatur zu entfernen, ohne eine große Resektionsfläche mit hohem Blutungsrisiko zu erhalten. Darüber hinaus bietet die Ratte als Versuchstier gegenüber Großtieren auch ökonomische Vorteile, die in niedrigeren Kosten für die Anschaffung und Unterbringung der Tiere, geringem Futtermittelverbrauch, sowie einfacheres Handling zu sehen sind.

In Anlehnung an klinische Beobachtungen, die das Auftreten eines SFS bei einer GWBWR von 0,8 % zeigen, wurde eine 70 %-ige Leberresektion angestrebt. Hierbei war es vorteilhaft, den linken Leberlappen zu belassen, da er ein Volumen von ca. 30 % des Gesamtlebervolumens besitzt und sich aufgrund des langen Gefäßhilus hervorragend zu intravitalmikroskopischen Untersuchungen eignet [55]. In den sog. Resektionsgruppen (I + II) erfolgte lediglich eine 70 %-ige Leberresektion, mit der einerseits die Situation des Spenders nach Lebendspende simuliert werden kann und andererseits durch den Vergleich mit der größenreduzierten Lebertransplantation eine Abgrenzung zwischen der größenreduktions- und transplantations-assoziierten Schädigung im SFS erfolgen kann. Die Technik der größenreduzierten Lebertransplantation stellt eine Modifikation der Operationstechnik der orthotopen Lebertransplantation nach *Engemann* dar. Um ein möglichst standardisiertes Vorgehen zu erzielen, erfolgten zu Beginn der Spenderoperation die Größenreduktion der Leber und anschließend die Organexplantation. Nach einer standardisierten Kaltlagerungszeit in 4° C kalter HTK-Lösung erfolgte die Implantation der größenreduzierten Leber. Hierbei wurden alle Gefäßanastomosen in mikrochirurgischer Nahttechnik durchgeführt, die im Vergleich zur Cuff-Technik mit einer geringeren Thromboseinzidenz assoziiert ist [38, 75]. Die Transplantatarterialisierung erfolgte mit Hilfe eines Spenderaortensegmentes, das End-zu-Seit an die infrarenale Aorta abdominalis des Recipients anastomosiert wurde. Diese Methode, die sich bereits mehrfach bei der orthotopen Rattenlebertransplantation bewährt hat, stellt eine zuverlässigere Rearterialisierungstechnik als direkte End-zu-End-Anastomosen der Leberarterie, wie z.B. durch die Sleeve-Technik, dar [75]. Daneben erfordert diese Technik, trotz der aufwendigen Präparation des Aortensegments in der Spenderoperation, nur minimale anatomische Manipulationen der Recipientratte und gewährleistet eine hohe postoperative Offenheitsrate der Leberarterie [75]. In dieser Studie war die Transplantatarterie bei allen Tieren bei ihrer Opferung am 14. Tag noch durchlässig.

Die Gallengangsrekonstruktion erfolgte mit Hilfe der Splint-Technik nach *Zimmermann*, die einfach und zuverlässig durchzuführen ist [94]. Im Gegensatz zu anderen Rekonstruktionsmethoden des Transplantatgallengangs, wie z.B. die direkte End-zu-End-Anastomose, wird die Anastomose durch den Splint noch zusätzlich geschient. Hierdurch wird einerseits ein direkter Kontakt des Gallengangs während der Wundheilung mit den aggressiven Gallensäuren vermieden, andererseits kann im Falle einer Gallengangsnekrose, z.B. nach Transplantatarterienthrombose, der Splint als interne Schienung fungieren und cholestatische Komplikationen vermeiden [75, 76]. In dieser Studie traten jedoch Probleme mit der Gallenganganastomose nach sieben Tagen auf, die sich anhand erhöhter Cholestaseparameter manifestierten und vermutlich durch eine Stentmigration verursacht wurden. In Zukunft sollten deshalb alternative Techniken der Gallenganganastomose, wie z.B. die Direktnaht oder biliodigestive Anastomose in diesem Modell evaluiert werden.

### **5.3 Intravitalmikroskopie als Methode zur Beurteilung der Mikrozirkulation**

Die Mikrozirkulation stellt die Schnittstelle zwischen Gewebe und Blut dar. Ihr morphologisches Korrelat sind Sinusoide („Leberkapillaren“), kleine Blutgefäße von ca. 8 - 10 µm Durchmesser zwischen Periportalfeldern (jeweils bestehend aus V. portae terminalis, A. hepatica und Gallengang) und Zentralvenen [52]. Da sich alle Veränderungen der Organfunktion primär auf der Ebene der Mikrozirkulation manifestieren, eignen sich Mikrozirkulationsuntersuchungen hervorragend zur Untersuchung der Transplantatfunktion. Mikrozirkulationsuntersuchungen lassen sich kategorisch in Messungen des Blutflusses und der Gewebepfusion unterteilen. Die meisten in Forschung und Klinik angewendeten Mikrozirkulationsuntersuchungen messen entweder den Blutfluss (z.B. Doppler-Flowmessungen) oder die Gewebepfusion (z.B. lokale Sauerstoffpartialdruckmessung, Wasserstoff-Clearance, Fluorometrie). Die Intravitalmikroskopie (IVM) kombiniert mit Fluoreszenzfarbstoffen, nimmt unter den genannten Methoden eine Sonderstellung ein, da durch sie eine direkte Visualisation der Mikrozirkulation ermöglicht wird und dementsprechend Blutfluss und Gewebepfusion gemessen werden können [84]. Obwohl sich die IVM bereits vielfach zu Mikrozirkulationsuntersu-

chungen in experimentellen Studien bewährt hat, eignet sie sich aufgrund ihrer aufwendigen Durchführung und der Notwendigkeit von Fluoreszenzfarbstoffen, die in hohen Konzentrationen (photo-) toxische Nebenwirkungen aufweisen, nur bedingt [42, 69]. Infolgedessen wurde die Technik der orthogonalen Reflex-Spektrophotometrie eingeführt, mit der eine direkte Visualisation der Mikrozirkulation ohne Kontrastverstärkung durch Fluoreszenzfarbstoffe möglich ist [42].

In der vorliegenden Studie entsprachen alle intravitalmikroskopischen Parameter in der Scheinoperationsgruppe (Perfusionsrate, Durchmesser der Sinusoide und postsinusoidalen Venolen, Leukozytengeschwindigkeit, Leukozyten-Endothel-Interaktion) den Standardwerten der Leber in der Literatur [42, 77, 83]. Während viele Arbeitsgruppen nur den mittzonalen Durchmesser der Lebersinusoide messen, wurde in dieser Studie zwischen dem periportal und perizentralen Durchmesser gemäß der zonalen Aufteilung des Azinus nach *Rappaport* (Abb. 2) unterschieden. Die Bestimmung der Flußgeschwindigkeit in den Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen erfolgte mit Hilfe von Rhodamin-markierten Leukozyten. Diese Methode hat sich als gleichwertig zu fluoreszein-markierten (FITC-) Erythrozyten erwiesen, gestaltet sich nicht so aufwendig in der Vorbereitung und bietet zudem den Vorteil der gleichzeitigen Visualisation der Leukozyten-Endothel-Interaktion [84].

#### **5.4 Mikrozirkulationsstörungen in der Pathogenese von Funktionsstörungen nach größenreduzierter Lebertransplantation**

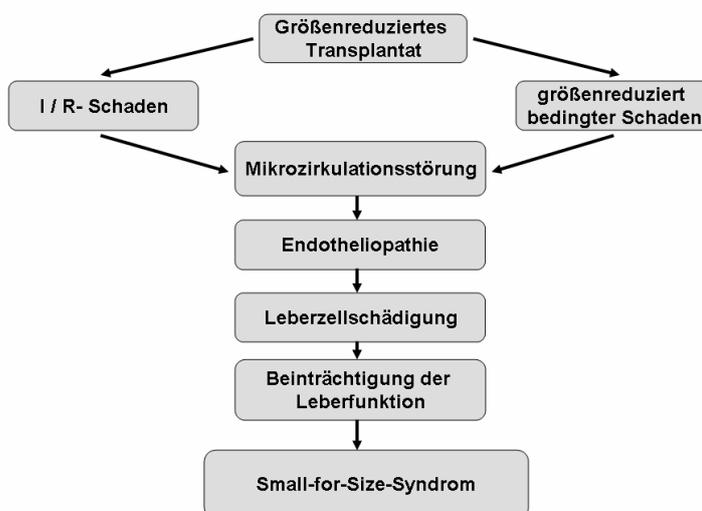
In der durchgeführten Studie konnten wir eine enge Korrelation zwischen den Mikrozirkulationsstörungen nach Leberresektion und nach partieller Lebertransplantation mit der SFS Leberschädigung nachweisen, die unter anderem auf einem Ungleichgewicht des Vasokonstriktors ET-1 und dem Vasodilatator NO bestand.

In dieser Studie zeigten die Ratten, die eine GWBWR von 0,8 % besaßen, charakteristische Mikrozirkulationsstörungen mit erniedrigter sinusoidale Perfusionsrate, Vasokonstriktion und überhöhtem sinusoidalen Blutfluss. Diese Änderungen der Mikrozirkulation wurden durch eine erhöhte Apoptose-Rate der Leberzellen, Verstärkung der Kupfferzellen und besonders durch eine Beeinträchtigung der sinusoidalen Endothelzel-

len begleitet, die zu einer eingeschränkten Leberfunktion und erhöhter Sterblichkeit geführt haben.

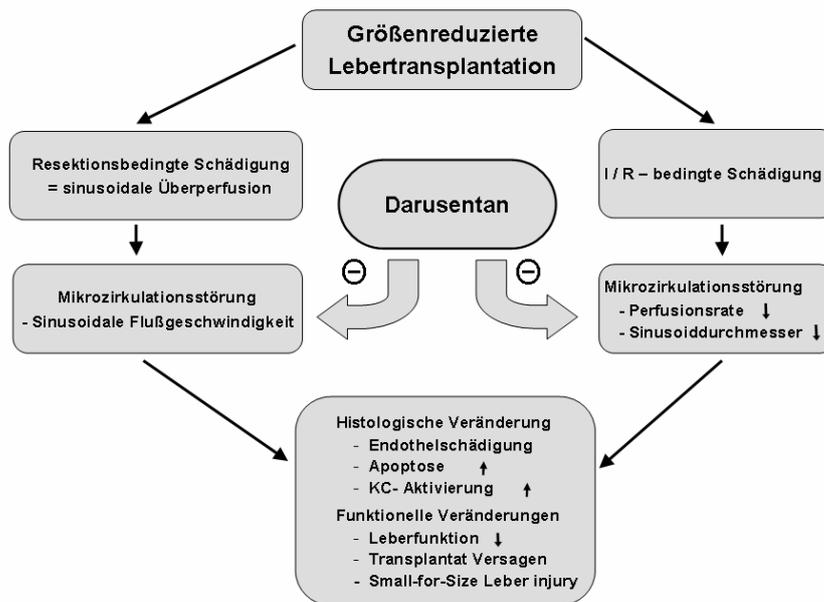
Die alleinige Zwei-Drittel-Leberresektion, die exemplarisch für die restliche Spenderleber nach Lebendspende steht, führt zu einer Beeinträchtigung der Lebermikrozirkulation und -funktion, jedoch nicht des Überlebens. Als Schädigungsmechanismus kann hierbei die sog. „sinusoidale Überperfusion“ angesehen werden, die durch eine erhöhte sinusoidale Blutflussgeschwindigkeit zu Folgeschäden insbesondere am sinusoidalen Endothel führt.

Im Gegensatz zur alleinigen Leberresektion führt die Transplantation eines Größenreduzierten Lebertransplantats zu einer signifikant schlechteren Leberfunktion und verminderten Überlebensrate, was u. a. auf den zusätzlichen I/R-Schaden zurückgeführt werden kann [10]. Der I/R-Schaden kann prinzipiell in eine Gefäßkomponente (Veränderungen in der Leberperfusion durch sinusoidale Vasokonstriktion), eine Entzündungsreaktion (verstärkte Leukozyten-Endothel-Interaktion) und in eine Schädigung durch reaktive Sauerstoffradikale bei der Reperfusion unterteilt werden [10, 77, 83]. Dabei triggen sich alle genannten Störfaktoren gegenseitig und führen zu einer Organdysfunktion, die sich primär in der im Vergleich zur Scheinoperation beobachteten niedrigeren Perfusionsrate, sinusoidalen Vasokonstriktion und erhöhten Leukozytenaktivierung manifestierte mit konsekutiven Folgeschäden am Endothel (s. Endothelzellen-Reaktivität und Apoptoserate) und eingeschränkter Leberfunktion.



**Abb. 30:**  
**Entstehungs-Kaskade**  
**des SFS-Syndroms**

Endothelin-1 (ET-1) und Nitritoxid (NO) scheinen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Mikrozirkulationsstörung beim SFS zu spielen. NO, das aus L-Arginin durch die NO-Synthase in den Endothelzellen (eNOS) synthetisiert wird, besitzt eine vasodilatierende Wirkung. Während unter physiologischen Bedingungen der sinusoidale Durchmesser durch das Gleichgewicht zwischen ET-1 und NO reguliert wird, führt sowohl die Leberresektion als auch die Teillebertransplantation zu einer signifikanten Erhöhung von ET-1 und ETAR-Protein-Expression und parallel hierzu zu einer reduzierten eNOS Expression [65]. Vermutlich führen der erhöhte sinusoidale Blutfluss in der restlichen Leber und die vermehrte Kupfferzell-Rekrutierung zu einer „Endothelialopathie“ mit einer erhöhten ET-1 Freisetzung und ETAR-Expression auf den Ito-Zellen sowie eine beeinträchtigte eNOS Aktivität der sinusoidale Endothelzellen [10, 30, 64]. Kupfferzellen sind in der Lage, Zytokine wie IL-1 oder TNF- $\alpha$  freizusetzen, die als potente Stimulatoren der ET-1 Freisetzung bekannt sind [2, 24]. Die unmittelbare ET-1 und ETAR Synthese, die dem Leberschaden in dieser Studie unmittelbar folgt, steht im Einklang mit der Kinetik von ET-1, ETAR-mRNA und Protein Expression in reperfundierten Pankreas Transplantaten [24, 90]. Ein erhöhter ET-1-Spiegel fördert die ETAR-vermittelte Ito-Zell-Kontraktion mit konsekutiver sinusoidaler Vasokonstriktion, Leukozyten-Endothel-Interaktion sowie ETAR-vermittelten Konstruktion der postsinusoidalen Venen. Gleichzeitig wird die sinusoidale Vasokonstriktion durch die reduzierte NO-Synthese getriggert.



**Abb. 31:**  
**Pathogenetisches**  
**Konzept**

## 5.5 ET-1/NO-Gleichgewicht als therapeutischer Angriffspunkt

Obwohl vielfältige vasoaktive Mediatoren ursächlich für die Mikrozirkulationsstörung des SFS sein können, sind ET-1 und NO die derzeit potentesten Vasomediato­ren. Um die ET-1 vermittelten temporären Mikrozirkulationsstörungen beim SFS zu reduzieren, erschien ein selektiver ETAR Antagonist als eine viel versprechende Therapieoption. Selektive ETB- und gemischte ETA/B-Rezeptor-Antagonisten wurden aufgrund der engen therapeutischen Breite und hepatotoxischen Wirkung im therapeutischen Bereich nicht verwendet [3, 82, 92]. Selektive ETAR haben sich bereits in der Therapie des Ischämie-Reperfusionsschadens nach Lebertransplantation, des Pfortaderhochdrucks und der Leberfibrose bewährt [9]. In dieser Studie wurde Darusentan® unmittelbar vor Durchführung Leberresektion bzw. Reperfusion des größenreduzierten Lebertransplan­tes verabreicht, da die initiale Mikrozirkulationsstörung entscheidend für die Manifes­ta­tion des SFS ist. In Anbetracht der zurückgehenden Schädigung des größenreduzierten Transplantates mit fortschreitender Leberregeneration und des schnellen Metabolismus der Ratte, erachteten wir eine einmalige Applikation von Darusentan® – mit einer Halbwertszeit von 24 Stunden – als ausreichend. Durch die Darusentan® Behandlung wurde das ET-1/NO-Gleichgewicht nach größenreduzierter Lebertransplantation wieder hergestellt, was sich durch eine signifikant reduzierte ET-1 und ETAR Protein Expres-

sion und durch erhöhte eNOS Protein Expression, einen erhöhten sinusoidalen Durchmesser und reduzierte Flussgeschwindigkeit zeigte. Darüber hinaus scheint die verminderte Anzahl der Kupfferzellen in den Therapie-Gruppen (RES-ETA und PLT-ETA) pathogenetisch zu dem reduzierten ET-1-Level infolge der verminderten Freisetzung inflammatorischer Parameter beizutragen. Die Verbesserung der Mikrozirkulation korrelierte zudem mit einer geringeren Leberzellschädigung, insbesondere der Apoptose der sinusoidalen Endothelzellen und Normalisierung der Serumparameter. Das Überleben konnte in dieser Studie durch die ETAR Blockade jedoch nicht signifikant verbessert werden. Offensichtlich war eine Einzeldosis des selektiven ETAR-Antagonisten Darusentan<sup>®</sup> mit einer Halbwertszeit von 24 Stunden nicht ausreichend, die vorübergehende SFS-Schädigung zu überbrücken. Zusätzliche Untersuchungen sind deshalb notwendig, um den Effekt der wiederholten Applikation von Darusentan<sup>®</sup> auf das Überleben nach größenreduzierter Lebertransplantation zu evaluieren.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Mikrozirkulationsstörungen infolge eines ET-1/NO-Ungleichgewichtes zu dem SFS nach größenreduzierter Lebertransplantation beitragen. Durch den ETAR-Antagonisten Darusentan<sup>®</sup>, der bereits bei Patienten mit Herzinsuffizienz in Phase-II-klinischen Studien eingesetzt wird, können die Mikrozirkulationsstörungen und deren morphologischen Folgen im SFS durch Korrektur des ET-1/NO-Ungleichgewichtes wieder hergestellt werden [5, 78]. Hierdurch ergibt sich ein klinisch viel versprechendes Potential des auch oral verabreichbaren ETAR-Antagonisten Darusentan<sup>®</sup> zur Therapie des SFS, sowohl für die Empfänger größenreduzierter Lebertransplantate als auch für die Spender nach Lebendspende-Lebertransplantation.

## **5.6 Zusammenfassung und Schlussfolgerung**

Nach größenreduzierter Lebertransplantation und Leberresektion kann es bei Unterschreitung eines minimalen Lebervolumens zu einem SFS-Syndrom kommen, das neben anderen Komponenten wahrscheinlich durch eine Störung der Mikrozirkulation infolge eines Ungleichgewichts zwischen vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Mediatoren zurückzuführen ist.

Durch die Untersuchung der Bedeutung des Endothelin-Nitritoxid-Gleichgewichts in der Pathogenese von Mikrozirkulationsstörungen konnten wir im Rahmen der größenreduzierten Lebertransplantation und Leberresektion neben einer erhöhten ET- und ETAR Proteinexpression auch eine reduzierte Proteinexpression nachweisen. Ferner wurden eine erhöhte Kupfferzell-Rekrutierung, eine reduzierte Perfusionsrate und ein erhöhter sinusoidaler Blutfluss sowie Leberzellschädigung festgestellt.

Durch den therapeutischen Ansatz des selektiven ETAR-Antagonisten Darusentan<sup>®</sup>, der zentral in die Mediatorokaskade der Mikrozirkulationsstörung durch Blockierung des stark vasokonstriktorisch wirkenden Endothelin-1 eingreift, konnte in den Gruppen II und IV das Gleichgewicht zwischen ET-1/NO wiederhergestellt werden, was in einer Reduktion der Mikrozirkulationsstörungen und der Leberzellschädigung resultierte.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die medikamentöse Endothelin-A Rezeptor Blockade ein Eingriff in die Vasoregulation der Mikrozirkulation möglich ist und so zu einer verminderten Leberzellschädigung mit verbesserter Leberfunktion führt.

Die Wiederherstellung des physiologischen Gefäßdurchmessers hat sich im Rahmen dieser Studie als wichtiges Kriterium für den Erhalt der Integrität der Mikrozirkulation herausgestellt. Darüber hinaus geben die Leberenzymwerte darüber Ausschuss, dass durch die Protektion der Mikrozirkulation es zu einer Verringerung des Parenchym-schadens gekommen ist.

Durch erfolgreiche Therapie des SFS-Syndroms mittels selektiver ETAR-Blockaden durch Darusentan<sup>®</sup> konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich das SFS-Syndrom auf der Ebene der Mikrozirkulation infolge eines Ungleichgewichts zwischen Endothelin-1 und Nitritoxid ausdrückt.

Bisherige Therapieerfolge des SFS-Syndroms wurden vor allem durch portosystemische Shunts erzielt, während in dieser Studie der intrahepatische Widerstand im sinusoidalen Gefäßbett als therapeutisches Ziel gewählt wurde, der medikamentös beeinflusst werden kann.

Es bedarf weiterer Studien, die durch einen Eingriff in den Endothelin-Stoffwechsel die Pathogenese von Mikrozirkulationsstörungen hinterleuchten, insbesondere ob durch eine wiederholte Gabe eines ETAR-Antagonisten das SFS Syndrom nach größenreduzierter Lebertransplantation effektiver therapiert werden kann.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abouna GJ. Emergency adult to adult living donor liver transplantation for fulminant hepatic failure - is it justifiable? *Transplantation* 2001 May 27; 71: 1498-1500
2. Battistini B, Forget MA, Laight D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. *Shock*. 1996; 5: 167-183
3. Bauer M, Bauer I, Sonin NV, Kresge N, Baveja R, Yokoyama Y, Harding D, Zhang JX, Clemens MG. Functional significance of endothelin B receptors in mediating sinusoidal and extrasinusoidal effects of endothelins in the intact rat liver. *Hepatology*. 2000 Apr; 31: 937-947
4. Bengmark S, Fredlund P, Goransson G, Olsson A, Vang J. Physiology of liver Resection. *Zentralbl Chir*. 1973 Nov 16; 98: 1642-1651
5. Bergler-Klein J, Pacher R, Berger R, Bojic A, Stanek B. Neurohumoral and hemodynamic effects of the selective endothelin antagonist Darusentan® in advanced chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2004 Jan; 23: 20-27
6. Blomquist L, Wang Y, Kimiaei S, Jacobsson H. Change in size, shape and radiocolloid uptake of the alcoholic liver during alcohol withdrawal, as demonstrated by single photon emission computed tomography. *J Hepatol*. 1994 Sep; 21: 417-423
7. Boillot O, Delafosse B, Mechet I, Boucaud C, Pouyet M. Small-for-size reduced-size liver graft in an adult recipient; a new transplant technique. *Lancet* 2002; 359: 406
8. Broelsch CE, Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Baker AL, Lichtor JL. Application of reduced-size liver transplants as split grafts, auxiliary orthotopic grafts, and living related segmental transplants. *Ann Surg* 1990 Sep; 212: 368-375
9. Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in a advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2000 Jun; 118: 1169-1178
10. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology* 1998; 28: 281-285
11. Couinaud C. *Le foie: Études anatomiques et chirurgicales*. Masson. Paris. 1957

12. Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg.* 2002 Sep; 89: 1089-1095
13. De Villa VH, Chen CL, Chen YS, Wang CC, Tan KC, Suh KS, Lee SG, Tanaka K, Fan ST. Split liver transplantation in Asia. *Transplant Proc* 2001 Feb-Mar; 33: 1502-1503
14. Emond JC, Renz JF, Ferrell LD, Rosenthal P, Lim RC, Roberts JP, Lake JR, Ascher NL. Functional analysis of grafts from living donors. Implications for the treatment of older recipients. *Ann Surg.* 1996 Oct; 224: 544-552
15. Emond JC, Whittington PF, Broelsch CE. Overview of reduced-size liver transplantation. *Clin Transplant* 1991 Apr; 5: 168-173
16. Fan ST, Lo CM, Liu CL, Yong BH, Chan JK, Ng IO. Safety of donors in live donor liver transplantation using right lobe grafts. *Arch Surg* 2000 Mar; 135: 336-340
17. Fausto N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl.* 2001 Oct; 7: 835-844
18. Fujita T, Tanaka K, Tokunaga J. *Zellen und Gewebe.* Fischer-Verlag. 1986
19. Furukawa H, Kishida A, Omura T, Kamiyama T, Suzuki T, Matsushita M, Nakajima Y, Todo S. Indication and strategy for adult living related liver transplantation. *Transplant Proc.* 1999 Aug; 31: 1952
20. Furukawa H, Shimamura T, Ishikawa H, Jin MB, Kamiyama T, Matsushita M, Todo S. What is the limit of graft size for successful living donor liver transplantation in adults? *Transplant Proc* 2001 Feb-Mar; 33: 1322
21. Galun E, Axelrod JH. The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Nov 11; 1592: 345-358.
22. Gerok W, Andus T. *Hepatology.* Urban & Schwarzenberg. 2. Aufl. 1995
23. Gondolesi GE, Florman S, Matsumoto C, Huang R, Fishbein TM, Sheiner PA, Schwartz ME, Emre S, Thung S, Shapiro R, Miller CM. Venous hemodynamics in living donor right lobe liver transplantation. *Liver Transpl.* 2002 Sep; 8: 809-813
24. Goto M, Takei Y, Kawano S, Nagano K, Tsuji S, Masuda E, Nishimura Y et al. Endothelin-1 is involved in the pathogenesis of ischemia/reperfusion liver injury by hepatic microcirculatory disturbances. *Hepatology* 1994; 19: 675-681
25. Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol.* 2002 Dec; 8: 961-965

26. Harihara Y, Makuuchi M, Kawarasaki H, Takayama T, Kubota K, Ito M, Yoshino H, Hirata M, Kita Y, Kusaka K, Sano K, Ijichi M, Watanabe M, Hashizume K, Nakatsuka T. Initial experience with 40 cases of living-related donor liver transplantation at the University of Tokyo. *Transplant Proc.* 1999 Nov; 31: 2893-2894
27. Hashikura Y, Kawasaki S, Miyagawa S, Terada M, Ikegami T, Nakazawa Y, Urata K, Chisuwa H, Ogino S, Makuuchi M. Recent advance in living donor liver transplantation. *World J Surg.* 2002 Feb; 26: 243-246
28. Heaton N. Small-for-size liver syndrome after auxiliary and split liver transplantation: donor selection. *Liver Transpl.* 2003 Sep; 9: S26-28
29. Hirano I, Blei AT. Deaths after living related liver transplantation. *Liver Transplant* 2000; 6: 250
30. Housset C, Rockey DC, Bissell DM. Endothelin receptors in rat liver: lipocytes as a contractile target for endothelin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 9266-9270
31. Inomata Y, Kiuchi T, Kim I, Uemoto S, Egawa H, Asonuma K, Fujita S, Hayaishi M, Tanaka K. Auxiliary partial orthotopic living donor liver transplantation as an aid for small-for-size grafts in larger recipients. *Transplantation.* 1999 May 27; 67: 1314-1319
32. Ito T, Kiuchi T, Yamamoto H, Oike F, Ogura Y, Fujimoto Y, Hirohashi K, Tanaka AK. Changes in portal venous pressure in the early phase after living donor liver transplantation: pathogenesis and clinical implications. *Transplantation.* 2003 Apr 27; 75: 1313-1317
33. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* Springer Verlag, 5. Aufl. 2002
34. Kamel IR, Kruskal JB, Raptopoulos V. Imaging for right lobe living donor liver transplantation. *Semin Liver Dis* 2001 May; 21: 271-282
35. Kamel IR, Kruskal JB, Warmbrand G, Goldberg SN, Pomfret EA, Raptopoulos V. Accuracy of volumetric measurements after virtual right hepatectomy in potential donors undergoing living adult liver transplantation. *AJR Am J Roentgenol* 2001 Feb; 176: 483-487
36. Kawasaki S, Makuuchi M, Matsunami H, Hashikura Y, Ikegami T, Nakazawa Y, Chisuwa H, Terada M, Miyagawa S. Living related liver transplantation in adults. *Ann Surg.* 1998 Feb; 227: 269-274

37. Kiuchi T, Kasahara M, Uryuhara K, Inomata Y, Uemoto S, Asonuma K, Egawa H, Fujita S, Hayashi M, Tanaka K. Impact of graft size mismatching on graft prognosis in liver transplantation from living donors. *Transplantation*. 1999 Jan 27; 67: 321-327
38. Knoop M, Bachmann S, Keck H, Steffen R, Neuhaus P. Experience with cuff rearterialization in 600 orthotopic liver grafts in the rat. *Am J Surg*. 1994 Mar; 167: 360-363
39. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg*. 2003 Oct; 197: 634-659
40. Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology*. 2001 Mar-Apr; 48: 556-562
41. Lamade W, Glombitza G, Fischer L, Chiu P, Cardenas CE Sr, Thorn M, Meinzer HP, Grenacher L, Bauer H, Lehnert T, Herfarth C. The impact of 3-dimensional reconstructions on operation planning in liver surgery. *Arch Surg* 2000 Nov; 135: 1256-1261
42. Langer S, Harris AG, Biberthaler P, von Dobschuetz E, Messmer K. Orthogonal polarization spectral imaging as a tool for the assessment of hepatic microcirculation: a validation study. *Transplantation*. 2001 May 15; 71: 1249-1256
43. Lautt WW, Greenway CV. Conceptual review of the hepatic vascular bed. *Hepatology*. 1987 Sep-Oct; 7: 952-963
44. Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med*. 1993 Dec 16; 329: 1862-1872.
45. Leivas A, Jimenez W, Bruix J, Boix L, Bosch J, Arroyo V, Rivera F, Rodes J. Gene expression of endothelin-1 and ET(A) and ET(B) receptors in human cirrhosis: relationship with hepatic hemodynamics. *J Vasc Res*. 1998 May-Jun; 35: 186-193
46. Lo CM, Fan ST, Liu CL, Chan JK, Lam BK, Lau GK, Wei WI, Wong J. Minimum graft size for successful living donor liver transplantation. *Transplantation*. 1999 Oct 27; 68: 1112-1116
47. Losser MR, Payen D. Mechanisms of liver damage. *Semin Liver Dis*. 1996 Nov; 16: 357-367
48. Man K, Fan ST, Lo CM, Liu CL, Fung PC, Liang TB, Lee TK, Tsui SH, Ng IO, Zhang ZW, Wong J. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intragraft gene expression. *Ann Surg*. 2003 Feb; 237: 256-264

49. Man K, Lo CM, Ng IO, Wong YC, Qin LF, Fan ST, Wong J. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes. *Arch Surg.* 2001 Mar; 136: 280-285
50. Marcos A, Olzinski AT, Ham JM, Fisher RA, Posner MP. The interrelationship between portal and arterial blood flow after adult to adult living donor liver transplantation. *Transplantation.* 2000 Dec 27; 70: 1697-1703
51. Marzi I, Takei Y, Rucker M, Kawano S, Fusamoto H, Walcher F, Kamada T. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transpl Int.* 1994; 7 Suppl 1: S503-506
52. McCuskey RS. Morphological mechanisms for regulating blood flow through hepatic sinusoids. *Liver.* 2000 Feb; 20: 3-7
53. Miller RG Jr. *Simultaneous Statistical Inference.* Second Edition. Springer New York 1981
54. Morgan GR, Diflo T, John D, Teperman L. Selection and imaging of the living liver donor. *Curr Opin Org Transpl* 2001; 6: 350-354
55. Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials.* 2004 Apr; 25: 1601-1611
56. Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery.* 1997 Feb; 121: 142-149
57. Park KM, Lee SG, Lee YJ, Hwang S, Nam CW, Choi KM, Nam CH, Choi DN, Kim KH, Choi KT, Ko KS, Min PC. Adult-to-adult living donor liver transplantation at Asian Medical Center, Seoul, Korea. *Transplant Proc.* 1999 Feb-Mar; 31: 456-458
58. Rappaport AM. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr Pathol.* 1976 May; 157: 215-243
59. Reichel C, Block W, Skodra T, Traber F, Schiedermaier P, Spengler U, Nuber R, Schild HH, Sauerbruch T. Relationship between cytochrome P-450 induction by rifampicin, hepatic volume and portal blood flow in man. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1997 Oct; 9: 975-979
60. Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut.* 2002 Apr; 50: 571-581
61. Rinella ME, Alonso E, Rao S, Whittington P, Fryer J, Abecassis M, Superina R, Flamm SL, Blei AT. Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors. *Liver Transpl.* 2001 May; 7: 409-414

62. Riordan SM, Williams R. Acute liver failure: targeted artificial and hepatocyte-based support of liver regeneration and reversal of multiorgan failure. *J Hepatol.* 2000; 32: 63-76
63. Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology.* 1997 Jan; 25: 2-5
64. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology.* 1998 Feb; 114: 344-351
65. Rockey DC. Vascular mediators in the injured liver. *Hepatology.* 2003 Jan; 37: 4-12
66. Rohen JW, Lütjen-Drecoll E. *Funktionelle Histologie.* Schattauer-Verlag. 2. Aufl. 1990
67. Rosemurgy AS, McAllister EW, Godellas CV, Goode SE, Albrink MH, Fabri PJ. The effect of partial portal decompression on portal blood flow and effective hepatic blood flow in man: a prospective study. *J Surg Res.* 1995 Dec; 59: 627-630
68. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology.* 1995 Jan; 108: 252-275
69. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem.* 1997 Apr; 45: 505-513
70. Schmitt-Graff A, Kruger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol.* 1991 May; 138: 1233-1242
71. Shao R, Yan W, Rockey DC. Regulation of endothelin-1 synthesis by endothelin-converting enzyme-1 during wound healing. *J Biol Chem.* 1999 Jan 29; 274: 3228-3334
72. Skawran S, Palmes D, Budny T, Bahde R, Stratmann U, Spiegel HU. Development and evaluation of an experimental model for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies of acute liver failure. *Transplant Proc.* 2003 Dec; 35: 3142-3146
73. Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Kondi A, Gamaletsos E, Theodoraki K, Kehagias D, Mystakidou K, Contis J. Hemodynamic interaction between portal vein and hepatic artery flow in small-for-size split liver transplantation. *Transpl Int.* 2002 Jul; 15: 355-360

74. Soyer P, Roche A, Elias D, Levesque M. Hepatic metastases from colorectal cancer: influence of hepatic volumetric analysis on surgical decision making. *Radiology*. 1992 Sep; 184: 695-697
75. Spiegel HU, Palmes D. Surgical techniques of orthotopic rat liver transplantation. *J Invest Surg*. 1998 Mar-Apr; 11: 83-96
76. Spiegel HU, Schleimer K, Kranz D, Diller R. Orthotopic rat liver transplantation and bile duct reconstruction by a splint technique. *Eur Surg Res*. 1997; 29: 421-428
77. Spiegel HU, Uhlmann D, Uhlmann S. Controlled vasoregulation of postischemic liver microcirculation - a therapeutic approach. *J Invest Surg*. 2000 Sep-Oct; 13: 273-278
78. Spieker LE, Mitrovic V, Noll G, Pacher R, Schulze MR, Muntwyler J, Schalcher C, Kiowski W, Luscher TF. Acute hemodynamic and neurohumoral effects of selective ET(A) receptor blockade in patients with congestive heart failure. ET 003 Investigators. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Jun; 35: 1745-1752
79. Suh K, Lee K, Roh HR, Koh YT, Minn KW, Kim SJ, Park MH, Lee KU. Outcome of adult living donor liver transplantation using small volume of left liver graft less than 1 % of body weight. *Transplant Proc* 2001 Feb-Mar; 33: 1401-1402
80. Sun Z, Klein AS, Radaeva S, Hong F, El-Assal O, Pan HN, Jaruga B, Batkai S, Hoshino S, Tian Z, Kunos G, Diehl AM, Gao B. In vitro interleukin-6 treatment prevents mortality associated with fatty liver transplants in rats. *Gastroenterology*. 2003 Jul; 125: 202-215
81. Troisi R, Praet M, de Hemptinne B. Small-for-size syndrome: what is the problem? *Liver Transpl*. 2003 Sep; 9: S1
82. Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Endothelin-receptorblockade as therapeutic approach of ischemia/reperfusion injury. Lengerich: Pabst Science Publishers 2002: 123-126
83. Uhlmann D, Uhlmann S, Spiegel HU. Important role for endothelins in acute hepatic ischemia/reperfusion injury. *J Invest Surg*. 2001 Jan-Feb; 14: 31-45
84. Uhlmann S, Uhlmann D, Spiegel HU. Evaluation of hepatic microcirculation by in vivo microscopy. *J Invest Surg*. 1999 Jul-Aug; 12: 179-193
85. Vanderkerken K, Bouwens L, Wisse E. Characterization of a phenotypically and functionally distinct subset of large granular lymphocytes (pit cells) in rat liver sinusoids. *Hepatology*. 1990 Jul; 12: 70-75

86. Vollmar B, Glasz J, Post S, Menger MD. Depressed phagocytic activity of Kupffer cells after warm ischemia-reperfusion of the liver. *J Hepatol.* 1994 Feb; 20: 301-304
87. Vonnahme FJ. *The human liver.* Karger-Verlag. 1993
88. Wisse E, Braet F, Luo D, De Zanger R, Jans D, Crabbe E, Vermoesen A. Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver. *Toxicol Pathol.* 1996 Jan-Feb; 24: 100-111
89. Wisse E, De Zanger RB, Charels K, Van Der Smissen P, McCuskey RS. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology.* 1985 Jul-Aug; 5: 683-692
90. Witzigmann H, Ludwig S, Armann B, Gabel G, Teupser D, Kratzsch J, Pietsch UC, Tannapfel A, Geissler F, Hauss J, Uhlmann D. Endothelin(A) receptor blockade reduces ischemia/reperfusion injury in pig pancreas transplantation. *Ann Surg.* 2003; 238: 264-274
91. Zhang JX, Pegoli W Jr, Clemens MG. Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol.* 1994 Apr; 266: G624-632
92. Zhang XY, Francis RJ, Sun Ck CK, Wheatley AM. Endothelin receptor A blockade ameliorates hypothermic ischemia-reperfusion-related microhemodynamic disturbances during liver transplantation in the rat. *J Surg Res.* 2002 Feb; 102: 63-70
93. Zimmermann A. Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Monit.* 2002 Mar; 8: RA53-63
94. Zimmermann FA, Butcher GW, Davies HS, Brons G, Kamada N, Turel O. Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of the immunologic responses to fully allogeneic liver grafts. *Transplant Proc.* 1979 Mar; 11: 571-577

## 7 ANHANG

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alaninaminotransferase
ALT	Auxiliäre Lebertransplantation
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartataminotransferase
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bromcresolgrün
CO	Stickstoffmonoxid
CO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
EGF	Epidermal Growth Factor
eNOS	endotheliale No-Synthetase
ET-1	Endothelin-1
ETAR	Endothelin-A Rezeptor
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GRBWR	Graft Weight To Recipient Body Weight Ratio
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HPF	High Power Fields
HSC	Hepatic Stellate Cells
HTK-Lösung	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
I/R-Schaden	Ischämie/Reperfusionsschaden
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
IVM	Intravitalmikroskopie
LAB	Labeled-Avidin-Biotin
LDH	Laktatdehydrogenase
LTX	Lebertransplantation

LWBWR	Liver Weight To Body Weight Ratio
MEGX	Monoethylglycinexylidide
MHC	Histocompatibilitäts-Komplex
NaCl	Natriumchlorid
NAD+	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NaFlu	NatriumFluoresceins
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NO	Nitritoxid
NOS	NO-Synthetase
NT	Nitrotyrosin
PAF	Platelet Activation Factor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PG	Prostaglandin
PLT	Teil-Lebertransplantation
RECA	Rat Endothelial Cell Antigen
RES	Leberresektion
SFS	Small-for-Size-Syndrom
SHAM-Gruppe	Scheinoperationsgruppe
TGF	Tumor Growth Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ZVK	Zentraler Venenkatheter

## 7.2 Signifkanzindices

<sup>a</sup> =  $p < 0,05$  RES (I) vs. RES-ETA (II), <sup>b</sup> =  $p < 0,05$  RES (I) vs. PLT (III), <sup>c</sup> =  $p < 0,05$  RES (I) vs. PLT-ETA (IV), <sup>d</sup> =  $p < 0,05$  RES (I) vs. SHAM (V), <sup>e</sup> =  $p < 0,05$  PLT (III) vs. PLT-ETA (IV), <sup>f</sup> =  $p < 0,05$  PLT (III) vs. SHAM (V), <sup>g</sup> =  $p < 0,05$  RES-ETA (II) vs. PLT (IV), <sup>h</sup> =  $p < 0,05$  RES-ETA (II) vs. PLT-ETA (IV), <sup>i</sup> =  $p < 0,05$  RES-ETA (II) vs. SHAM (V), <sup>j</sup> =  $p < 0,05$  PLT-ETA (IV) vs. SHAM (V)

## 7.3 Tabellenanhang

### 7.3.1 Serumergebnisse

#### RES (Gruppe I)

ALAT	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
Tier 1	17,0	65,0	954,0	382,0	51,0	x
Tier 2	16,0	x	560,0	246,0	x	38,0
Tier 3	23,0	66,0	1007,0	521,0	37,0	43,0
Tier 4	13,0	33,0	902,0	430,0	x	22,0
Tier 5	20,0	33,0	x	83,0	33,0	21,0
Tier 6	16,0	40,0	1408,0	506,0	31,0	x
Tier 7	18,0	41,0	643,0	198,0	30,0	43,0
x	<b>17,4</b>	<b>46,6</b>	<b>912,2</b>	<b>333,6</b>	<b>36,1</b>	<b>33</b>
sD	<b>3,2</b>	<b>15,4</b>	<b>502,1</b>	<b>213,4</b>	<b>4,4</b>	<b>6,5</b>

Bilirubin	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
Tier 1	0,2	0,1	0,4	0,1	0,2	0,4
Tier 2	0,3	0,2	0,7	x	x	X
Tier 3	0,2	0,3	0,9	0,6	0,3	0,2
Tier 4	0,2	0,1	0,1	0,1	x	0,2
Tier 5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	x
Tier 6	0,2	0,1	0,1	x	0,2	x
Tier 7	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1
x	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>
sD	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>

Ammoniak	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
Tier 1	62,0	101,0	123,0	73,0	160,0	112,0
Tier 2	122,0	133,0	x	109,0	149,0	x
Tier 3	50,0	x	263,0	146,0	108,0	81,0
Tier 4	92,0	175,0	261,0	75,0	70,0	106,0
Tier 5	55,0	105,0	126,0	149,0	x	x
Tier 6	80,0	139,0	189,0	x	67,0	60,0
Tier 7	96,0	113,0	234,0	123,0	55,0	54,0
x	<b>79,3</b>	<b>127,6</b>	<b>199</b>	<b>112</b>	<b>102,16</b>	<b>82,4</b>
sD	<b>25</b>	<b>19,8</b>	<b>65,3</b>	<b>33,9</b>	<b>23,9</b>	<b>81,5</b>

Albumin	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
Tier 1	3600,0	3000,0	2600,0	2600,0	2100,0	2400,0
Tier 2	3700,0	2900,0	2500,0	2300,0	2200,0	2300,0
Tier 3	3200,0	2600,0	2300,0	2000,0	2100,0	2800,0
Tier 4	3400,0	3200,0	2100,0	2000,0	2200,0	2800,0
Tier 5	3900,0	3200,0	2300,0	2300,0	2300,0	x
Tier 6	3600,0	2800,0	2200,0	2100,0	2000,0	2400,0
Tier 7	3300,0	2400,0	2000,0	2100,0	2400,0	2900,0
x	<b>2928,6</b>	<b>2871,4</b>	<b>2285,7</b>	<b>2200</b>	<b>2185,7</b>	<b>2600</b>
sD	<b>243</b>	<b>298,4</b>	<b>211,6</b>	<b>216</b>	<b>134,5</b>	<b>260,8</b>

## RES-ETA (Gruppe II)

ALAT	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
Tier 1	21,0	43,0	508,0	146,0	28,0	44,0
Tier 2	23,0	56,0	645,0	182,0	21,0	31,0
Tier 3	18,0	64,0	684,0	231,0	24,0	28,0
Tier 4	24,0	58,0	778,0	261,0	26,0	24,0
Tier 5	23,0	35,0	778,0	224,0	36,0	39,0
Tier 6	20,0	46,0	691,0	189,0	31,0	37,0
Tier 7	21,0	46,0	819,0	391,0	27,0	24,0
<b>x</b>	<b>21,4</b>	<b>49,7</b>	<b>700,4</b>	<b>232</b>	<b>27,6</b>	<b>32,4</b>
<b>sD</b>	<b>2,1</b>	<b>10</b>	<b>105,3</b>	<b>79,5</b>	<b>4,9</b>	<b>7,8</b>

Bilirubin	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
Tier 1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tier 2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tier 3	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Tier 4	0,1	x	0,1	0,1	0,1	0,2
Tier 5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tier 6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Tier 7	0,2	x	0,7	0,5	0,1	0,1
<b>x</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
<b>sD</b>	<b>0,1</b>	<b>0</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Ammoniak	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
Tier 1	79,0	117,00	67,00	39,00	98,00	132,00
Tier 2	67,0	127,00	57,00	51,00	73,00	81,00
Tier 3	81,0	x	68,00	87,00	94,00	90,00
Tier 4	23,0	111,00	61,00	60,00	71,00	84,00
Tier 5	73,0	192,00	79,00	38,00	55,00	66,00
Tier 6	89,0	92,00	56,00	42,00	66,00	60,00
Tier 7	56,0	x	222,00	167,00	114,00	223,00
<b>x</b>	<b>66,9</b>	<b>126,6</b>	<b>87,1</b>	<b>69,1</b>	<b>81,6</b>	<b>85,1</b>
<b>sD</b>	<b>22</b>	<b>97,1</b>	<b>60</b>	<b>46</b>	<b>21</b>	<b>56,9</b>

Albumin	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
Tier 1	2700,0	1700,0	1600,0	1700,0	2200,0	2700,0
Tier 2	2700,0	1600,0	1600,0	1600,0	2000,0	2300,0
Tier 3	2700,0	1700,0	1700,0	1900,0	2200,0	2500,0
Tier 4	2800,0	x	1600,0	1500,0	2100,0	2700,0
Tier 5	2700,0	2000,0	1800,0	1800,0	2400,0	2300,0
Tier 6	2600,0	2600,0	2800,0	2600,0	2400,0	2800,0
Tier 7	2900,0	x	2600,0	2600,0	1800,0	2200,0
<b>x</b>	<b>2728,6</b>	<b>1928,6</b>	<b>1900</b>	<b>1900</b>	<b>2157,1</b>	<b>2500</b>
<b>sD</b>	<b>95,1</b>	<b>205,9</b>	<b>152,8</b>	<b>141,4</b>	<b>214,9</b>	<b>238</b>

**PLT (Gruppe III)**

<b>ALAT</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	25,0	349,0	1466,0	964,0	1120,0	x
<b>Tier 2</b>	25,0	350,0	1833,0	1187,0	112,0	52,0
<b>Tier 3</b>	53,0	389,0	1271,0	853,0	115,0	38,0
<b>Tier 4</b>	29,0	x	384,0	265,0	227,0	86,0
<b>Tier 5</b>	x	x	811,0	338,0	x	74,0
<b>Tier 6</b>	10,0	338,0	1200,0	331,0	195,0	70,0
<b>Tier 7</b>	29,0	220,0	544,0	232,0	68,0	37,0
<b>Tier 8</b>	35	388	x	x	x	x
<b>Tier 9</b>	44	302,0	x	x	x	x
<b>Tier 10</b>	x	341	x	x	x	x
<b>Tier 11</b>	42	x	1220	x	x	x
<b>Tier 12</b>	46	182	1132,0	x	x	x
<b>Tier 13</b>	34	155	1332	x	x	x
<b>Tier 14</b>	38	169	1397	x	x	x
<b>x</b>	<b>34,3</b>	<b>289,7</b>	<b>1144,1</b>	<b>668,6</b>	<b>294,6</b>	<b>59,5</b>
<b>sD</b>	<b>16,2</b>	<b>108,3</b>	<b>435,2</b>	<b>333,4</b>	<b>396,1</b>	<b>20,2</b>

<b>Bilirubin</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	0,1	x	0,2	0,3	3,7	x
<b>Tier 2</b>	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4	0,2
<b>Tier 3</b>	0,2	0,3	0,2	0,1	x	0,2
<b>Tier 4</b>	0,1	x	0,2	0,2	2,5	x
<b>Tier 5</b>	x	x	0,1	0,2	0,5	3,5
<b>Tier 6</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	2,8	0,2
<b>Tier 7</b>	0,1	0,1	0,1	1,2	2,0	0,1
<b>Tier 8</b>	0,2	0,2	x	x	x	x
<b>Tier 9</b>	0,2	0,2	x	x	x	x
<b>Tier 10</b>	x	0,2	x	x	x	x
<b>Tier 11</b>	0,1	x	0,2	x	x	x
<b>Tier 12</b>	0,2	0,1	0,2	x	x	x
<b>Tier 13</b>	0,1	0,1	0,2	x	x	x
<b>Tier 14</b>	0,2	0,1	0,1	x	x	x
<b>x</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>2</b>	<b>0,8</b>
<b>sD</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,4</b>	<b>2,1</b>	<b>3,2</b>

<b>Ammoniak</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	90,0	428,0	295,0	172,0	265,0	x
<b>Tier 2</b>	122,0	383,0	279,0	124,0	176,0	147,0
<b>Tier 3</b>	117,0	650,0	264,0	179,0	122,0	64,0
<b>Tier 4</b>	46,0	x	65,0	96,0	66,0	159,0
<b>Tier 5</b>	x	x	116,0	36,0	x	x
<b>Tier 6</b>	62,0	250,0	95,0	37,0	142,0	124,0
<b>Tier 7</b>	46,0	172,0	153,0	81,0	47,0	98,0
<b>Tier 8</b>	35	492	x	x	x	x
<b>Tier 9</b>	55	691,0	x	x	x	x
<b>Tier 10</b>	x	779	x	x	x	x
<b>Tier 11</b>	46	x	189	x	x	x
<b>Tier 12</b>	71	188	221,0	x	x	x
<b>Tier 13</b>	72	173	259	x	x	x
<b>Tier 14</b>	75	189	212	x	x	x
<b>x</b>	<b>69,7</b>	<b>399,8</b>	<b>195,3</b>	<b>103,6</b>	<b>136,3</b>	<b>118,4</b>
<b>sD</b>	<b>17,2</b>	<b>141,3</b>	<b>16,9</b>	<b>58,2</b>	<b>79,1</b>	<b>38,3</b>

<b>Albumin</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	3000,0	x	1700,0	1800,0	2100,0	x
<b>Tier 2</b>	3000,0	2220,0	1800,0	1800,0	2400,0	2900,0
<b>Tier 3</b>	3000,0	2300,0	1900,0	1900,0	2500,0	2500,0
<b>Tier 4</b>	3000,0	x	2000,0	1900,0	2600,0	2500,0
<b>Tier 5</b>	x	x	1700,0	1900,0	x	2700,0
<b>Tier 6</b>	2700,0	2400,0	1900,0	2200,0	2600,0	2700,0
<b>Tier 7</b>	3000,0	2200,0	1800,0	2200,0	2600,0	2800,0
<b>Tier 8</b>	2600	2100	x	x	x	x
<b>Tier 9</b>	2500	2000,0	x	x	x	x
<b>Tier 10</b>	x	2000	x	x	x	x
<b>Tier 11</b>	2600	x	1600	x	x	x
<b>Tier 12</b>	2400	2100	1700,0	x	x	x
<b>Tier 13</b>	2500	2200	1900	x	x	x
<b>Tier 14</b>	2600	2100	1800	x	x	x
<b>x</b>	<b>2750</b>	<b>2106,7</b>	<b>1828,6</b>	<b>1957,1</b>	<b>2466,7</b>	<b>2683,3</b>
<b>sD</b>	<b>0</b>	<b>90,2</b>	<b>111,3</b>	<b>171,8</b>	<b>196,6</b>	<b>160,2</b>

### PLT-ETA (Gruppe IV)

ALAT	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
<b>Tier 1</b>	10,0	151,0	638,0	371,0	145,0	33,0
<b>Tier 2</b>	29,0	294,0	x	334,0	x	43,0
<b>Tier 3</b>	x	352,0	685,0	559,0	x	x
<b>Tier 4</b>	34,0	130,0	511,0	211,0	43,0	109,0
<b>Tier 5</b>	37,0	x	561,0	288,0	19,0	45,0
<b>Tier 6</b>	26,0	162,0	721,0	x	49,0	41,0
<b>Tier 7</b>	27,0	194,0	604,0	172,0	x	38,0
<b>Tier 8</b>	35	x	745,0	411	x	x
<b>Tier 9</b>	28	423,0	x	x	x	x
<b>Tier 10</b>	41,0	284	811	412	x	x
<b>Tier 11</b>	25	x	655	388	x	x
<b>Tier 12</b>	x	232	412,0	x	97	32
<b>Tier 13</b>	22	176	566	409	x	x
<b>Tier 14</b>	21	201	434	170	91	39
<b>x</b>	<b>27,0</b>	<b>236,4</b>	<b>611,6</b>	<b>322,7</b>	<b>74,3</b>	<b>47,0</b>
<b>sD</b>	<b>0,4</b>	<b>100,8</b>	<b>59,7</b>	<b>74,4</b>	<b>56,8</b>	<b>28,6</b>

Bilirubin	d0 prae	d0 post	d1	d2	d7	d14
<b>Tier 1</b>	0,2	0,1	0,4	0,6	7,3	0,5
<b>Tier 2</b>	0,1	0,1	x	0,5	x	0,3
<b>Tier 3</b>	x	0,1	0,1	0,5	x	x
<b>Tier 4</b>	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	0,5
<b>Tier 5</b>	0,1	x	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Tier 6</b>	0,1	0,1	0,1	x	0,3	0,1
<b>Tier 7</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	x	0,1
<b>Tier 8</b>	0,1	x	0,2	0,2	x	x
<b>Tier 9</b>	0,1	0,1	x	x	x	x
<b>Tier 10</b>	0,1	0,1	0,2	0,2	x	x
<b>Tier 11</b>	0,1	x	0,2	0,2	x	x
<b>Tier 12</b>	x	0,1	0,1	x	0,8	0,2
<b>Tier 13</b>	0,1	0,1	0,2	0,2	x	x
<b>Tier 14</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	2,4	0,6
<b>x</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>1,8</b>	<b>0,3</b>
<b>sD</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>3,6</b>	<b>0,2</b>

<b>Ammoniak</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	61,0	267,0	226,0	157,0	190,0	288,0
<b>Tier 2</b>	46,0	340,0	x	50,0	x	148,0
<b>Tier 3</b>	x	374,0	154,0	176,0	x	x
<b>Tier 4</b>	61,0	352,0	168,0	162,0	56,0	113,0
<b>Tier 5</b>	93,0	x	175,0	65,0	74,0	106,0
<b>Tier 6</b>	75,0	354,0	178,0	x	44,0	173,0
<b>Tier 7</b>	59,0	282,0	210,0	73,0	x	119,0
<b>Tier 8</b>	42	x	102,0	93	x	x
<b>Tier 9</b>	37	158,0	x	x	x	x
<b>Tier 10</b>	40,0	153	92	101	x	x
<b>Tier 11</b>	51	x	94	98	x	x
<b>Tier 12</b>	x	103	85,0	x	118	388
<b>Tier 13</b>	62	162	89	92	x	x
<b>Tier 14</b>	88	112	92	52	92	112
<b>x</b>	<b>59,6</b>	<b>229,6</b>	<b>138,3</b>	<b>101,4</b>	<b>95,3</b>	<b>180,4</b>
<b>sD</b>	<b>17,4</b>	<b>39,6</b>	<b>28</b>	<b>52,3</b>	<b>51,6</b>	<b>86,5</b>

<b>Albumin</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	2700,0	1300,0	1600,0	1600,0	1900,0	2300,0
<b>Tier 2</b>	3000,0	1100,0	x	1700,0	x	2100,0
<b>Tier 3</b>	x	1300,0	1400,0	1500,0	x	x
<b>Tier 4</b>	2500,0	1500,0	1400,0	1400,0	2300,0	2600,0
<b>Tier 5</b>	2800,0	x	1300,0	1400,0	2300,0	2500,0
<b>Tier 6</b>	2900,0	1400,0	1500,0	x	2300,0	2700,0
<b>Tier 7</b>	2700,0	1300,0	1600,0	1700,0	x	2500,0
<b>Tier 8</b>	x	x	1700,0	2400	x	x
<b>Tier 9</b>	2900	2400,0	x	x	x	x
<b>Tier 10</b>	2900,0	2500	2200	2100	x	x
<b>Tier 11</b>	2800	x	2100	2400	x	x
<b>Tier 12</b>	x	2800	1900,0	x	2900	2900
<b>Tier 13</b>	2700	2600	1800	2100	x	x
<b>Tier 14</b>	2900	2700	1900	2600	2900	2800
<b>x</b>	<b>2800,0</b>	<b>1950</b>	<b>1757,1</b>	<b>1942,9</b>	<b>2442,9</b>	<b>2542,9</b>
<b>sD</b>	<b>175,1</b>	<b>251,7</b>	<b>113,4</b>	<b>127,2</b>	<b>335,9</b>	<b>345,7</b>

### SHAM (Gruppe V)

<b>ALAT</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	23,0	29,0	33,0	29,0	28,0	23,0
<b>Tier 2</b>	23,0	35,0	59,0	32,0	30,0	26,0
<b>Tier 3</b>	20,0	22,0	36,0	25,0	26,0	22,0
<b>Tier 4</b>	24,0	27,0	41,0	43,0	26,0	27,0
<b>Tier 5</b>	23,0	32,0	50,0	31,0	34,0	32,0
<b>Tier 6</b>	19,0	25,0	46,0	34,0	30,0	31,0
<b>Tier 7</b>	21,0	28,0	48,0	37,0	35,0	30,0
<b>x</b>	<b>21,9</b>	<b>28,3</b>	<b>44,7</b>	<b>33,0</b>	<b>29,9</b>	<b>27,3</b>
<b>sD</b>	<b>1,9</b>	<b>4,3</b>	<b>8,9</b>	<b>5,8</b>	<b>3,6</b>	<b>3,9</b>

<b>Bilirubin</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Tier 2</b>	0,1	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Tier 3</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Tier 4</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Tier 5</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Tier 6</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Tier 7</b>	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>x</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>
<b>sD</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>

<b>Ammoniak</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	79,0	89,0	53,0	51,0	45,0	48,0
<b>Tier 2</b>	72,0	127,0	78,0	26,0	48,0	36,0
<b>Tier 3</b>	82,0	69,0	27,0	20,0	48,0	45,0
<b>Tier 4</b>	24,0	67,0	24,0	16,0	51,0	27,0
<b>Tier 5</b>	73,0	106,0	31,0	86,0	70,0	56,0
<b>Tier 6</b>	94,0	74,0	18,0	49,0	69,0	71,0
<b>Tier 7</b>	57,0	74,0	47,0	36,0	80,0	79,0
<b>x</b>	<b>68,7</b>	<b>86,6</b>	<b>39,7</b>	<b>40,6</b>	<b>58,7</b>	<b>51,7</b>
<b>sD</b>	<b>12,7</b>	<b>22,5</b>	<b>21,0</b>	<b>24,2</b>	<b>13,9</b>	<b>18,5</b>

<b>Albumin</b>	<b>d0 prae</b>	<b>d0 post</b>	<b>d1</b>	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>
<b>Tier 1</b>	2700,0	2700,0	2400,0	2500,0	2600,0	2600,0
<b>Tier 2</b>	2700,0	2600,0	2200,0	2500,0	2300,0	2500,0
<b>Tier 3</b>	2600,0	2300,0	2400,0	2300,0	2600,0	2700,0
<b>Tier 4</b>	2800,0	2500,0	2500,0	2500,0	2400,0	2500,0
<b>Tier 5</b>	2800,0	2600,0	2400,0	2300,0	2600,0	2700,0
<b>Tier 6</b>	2600,0	2600,0	2300,0	2400,0	2600,0	2600,0
<b>Tier 7</b>	2800,0	2400,0	2400,0	2500,0	2400,0	2500,0
<b>x</b>	<b>2714,3</b>	<b>2628,6</b>	<b>2371,4</b>	<b>2428,6</b>	<b>2500,0</b>	<b>2585,7</b>
<b>sD</b>	<b>90,0</b>	<b>138,0</b>	<b>95,1</b>	<b>95,1</b>	<b>129,1</b>	<b>90,0</b>

### 7.3.2 Ergebnisse Intravitalmikroskopie

Perfusionsrate (%)	SHAM	RES	RES-ETA	PLT	PLT-ETA
1	97,5	94,5	98,1	83,5	90,9
2	97,0	92,6	96,4	79,4	89,9
3	97,6	94,6	94,6	80,9	93,4
4	98,5	94,0	96	80,5	93,9
5	98,0	92,2	94,2	82,7	90,0
6	99,2	94,6	94,6	81,3	95,9
7	99,3	95,3	95,3	80,0	92,5
x	<b>98,2</b>	<b>94,0</b>	<b>95,6</b>	<b>81,2</b>	<b>92,4</b>
sD	<b>0,8</b>	<b>1,1</b>	<b>1,4</b>	<b>1,4</b>	<b>2,1</b>

Leuko.-Geschw. Azinus	SHAM	RES	RES-ETA	PLT	PLT-ETA
1	253,64	491,91	389,9	397,25	334,44
2	189,10	554,00	554	437,84	326,09
3	324,06	721,67	x	411,3	310,50
4	218,08	733,56	x	580,31	324,89
5	263,32	541,52	541,2	643,28	336,87
6	292,07	638,77	338,7	606,04	382,81
7	307,07	628,24	628,3	539,77	363,91
x	<b>263,91</b>	<b>615,67</b>	<b>490,4</b>	<b>516,54</b>	<b>339,93</b>
sD	<b>44,84</b>	<b>84,89</b>	<b>121,2</b>	<b>92,72</b>	<b>23,11</b>

Leuko.-Geschw. (Vene)	SHAM	RES	RES-ETA	PLT	PLT-ETA
1	604,94	1201,15	1094,1	581,56	776,56
2	505,77	1227,95	1227,9	830,15	683,83
3	904,59	1400,59	1400,6	884,95	854,90
4	654,58	1675,91	1675,9	956,46	1099,45
5	685,25	1361,54	1361,5	884,56	917,17
6	1010,54	1658,70	1658,7	902,97	838,87
7	934,37	1518,28	1518,3	1443,57	1032,18
x	<b>757,15</b>	<b>1434,87</b>	<b>1419,6</b>	<b>926,32</b>	<b>886,14</b>
sD	<b>177,04</b>	<b>176,94</b>	<b>215,7</b>	<b>239,21</b>	<b>133,06</b>

<b>Sinusoidweite periportal</b>	<b>SHAM</b>	<b>RES</b>	<b>RES-ETA</b>	<b>PLT</b>	<b>PLT-ETA</b>
<b>1</b>	6,40	4,71	6,2	3,68	5,28
<b>2</b>	6,24	4,85	5,9	3,92	5,29
<b>3</b>	6,41	4,99	5	3,93	5,38
<b>4</b>	6,48	5,06	5,1	3,86	5,46
<b>5</b>	6,47	5,02	5	3,90	5,36
<b>6</b>	6,45	5,06	5,1	3,91	5,46
<b>7</b>	6,41	5,06	5,1	3,85	5,38
<b>x</b>	<b>6,41</b>	<b>4,96</b>	<b>5,3</b>	<b>3,86</b>	<b>5,37</b>
<b>sD</b>	<b>0,07</b>	<b>0,12</b>	<b>0,5</b>	<b>0,08</b>	<b>0,07</b>

<b>Sticker (Azinus)</b>	<b>SHAM</b>	<b>RES</b>	<b>RES-ETA</b>	<b>PLT</b>	<b>PLT-ETA</b>
<b>1</b>	112,60	194,01	134,9	297,56	235,10
<b>2</b>	119,57	271,65	171	437,06	288,72
<b>3</b>	85,56	202,78	202,8	369,12	242,98
<b>4</b>	69,00	235,98	235,9	450,68	176,79
<b>5</b>	114,78	127,53	127,5	445,10	257,17
<b>6</b>	98,82	196,26	169,2	415,86	199,33
<b>7</b>	84,07	169,62	169,6	371,80	191,53
<b>x</b>	<b>97,77</b>	<b>199,69</b>	<b>173,0</b>	<b>398,17</b>	<b>227,37</b>
<b>sD</b>	<b>17,53</b>	<b>42,53</b>	<b>37,4</b>	<b>51,33</b>	<b>37,00</b>

<b>Sticker/Vene (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>SHAM</b>	<b>RES</b>	<b>RES-ETA</b>	<b>PLT</b>	<b>PLT-ETA</b>
<b>1</b>	104,15	385,99	109	395,56	242,84
<b>2</b>	165,83	368,80	368,8	501,58	326,32
<b>3</b>	153,26	295,02	295	481,92	272,48
<b>4</b>	56,59	194,19	199,2	497,18	136,65
<b>5</b>	139,23	158,54	158,5	626,09	255,90
<b>6</b>	137,26	190,96	190,9	440,14	141,85
<b>7</b>	98,10	135,08	135,1	427,21	311,59
<b>x</b>	<b>122,06</b>	<b>246,94</b>	<b>208,1</b>	<b>481,38</b>	<b>241,09</b>
<b>sD</b>	<b>35,04</b>	<b>94,67</b>	<b>92,5</b>	<b>69,28</b>	<b>69,90</b>

### 7.3.3 Ergebnisse GRBWR

PLT	Gewicht	Lebervol.	GRBWR
1	360	3	0,833
2	270	2,1	0,777
3	272	2,1	0,772
4	266	2,1	0,789
5	258	2,2	0,852
6	248	2,2	0,887
7	236	2,1	0,889
8	284	2,2	0,789
9	232	2,2	0,948
10	312	2,8	0,897
11	252	2,3	0,915
<b>x</b>	<b>271,8</b>	<b>2,3</b>	<b>0,8</b>
<b>sD</b>	<b>36,9</b>	<b>0,3</b>	<b>0,1</b>

PLT-ETA	Gewicht	Lebervol.	GRBWR
1	230	1,9	0,826
2	230	1,9	0,826
3	214	1,9	0,887
4	266	2,1	0,789
5	260	2,2	0,84
6	240	2,2	0,916
7	232	2	0,862
8	342	2,5	0,73
9	262	2,2	0,839
10	214	1,9	0,887
11	220	1,8	0,818
12	220	1,9	0,863
<b>x</b>	<b>244,2</b>	<b>2,0</b>	<b>0,8</b>
<b>sD</b>	<b>35,9</b>	<b>0,2</b>	<b>0,0</b>

RES	Gewicht	Lebervol.	GRBWR
1	218	2	0,917
2	265	2,1	0,792
3	219	1,8	0,821
4	226	1,6	0,707
5	236	2,1	0,889
6	252	2,2	0,873
7	208	1,9	0,913
<b>x</b>	<b>232</b>	<b>2,0</b>	<b>0,8</b>
<b>sD</b>	<b>20,3</b>	<b>0,2</b>	<b>0,1</b>

RES-ETA	Gewicht	Lebervol.	GRBWR
1	168	1,4	0,833
2	168	1,4	0,833
3	188	1,6	0,851
4	168	1,4	0,833
5	184	1,5	0,815
6	188	1,6	0,851
7	188	1,6	0,851
<b>x</b>	<b>178,9</b>	<b>1,5</b>	<b>0,8</b>
<b>sD</b>	<b>10,3</b>	<b>0,1</b>	<b>0,0</b>

SHAM	Gewicht	Lebervol.	GRBWR
1	232,0	7,5	3,2
2	254,0	7,8	3,1
3	213,0	7,1	3,3
4	230,0	7,6	3,3
5	261,0	7,2	2,8
6	278,0	7,8	2,8
7	243,0	7,6	3,1
<b>x</b>	<b>244,4</b>	<b>7,5</b>	<b>3,1</b>
<b>sD</b>	<b>21,8</b>	<b>0,3</b>	<b>0,2</b>

### 7.3.4 Ergebnisse Immunhistochemie

ET-1	Tier 1	Tier 2	Tier 3	x	sD
SHAM	1	1	1	1,0	0,0
RES	2	4	4	3,3	1,2
RES-ETA	2	1	0	1,0	0,8
PLT	4	x	4	4,0	0,0
PLT-ETA	1	4	4	3,0	1,7

ETAR	Tier 1	Tier 2	Tier 3	x	sD
SHAM	1	0	0	0,3	0,6
RES	1	4	x	2,5	2,1
ETTL	1	1	x	1,0	0,0
SPLIT	6	2	1	3,0	2,6
ETA	0	2	1	1,0	1,0

### 7.3.5 Apoptose-Nachweis (ssDNA)

Tier/Feld	SHAM	RES	RES-ETA	PLT	PLT-ETA
1	0	1	1	5	3
2	1	2	2	7	6
3	0	x	1	4	7
4	0	2	0	3	2
5	0	x	2	3	2
6	0	1	0	0	1
7	0	3	1	9	2
8	1	x	0	x	0
9	1	2	0	2	1
10	0	x	0	2	x
11	1	2	1	4	x
12	x	3	2	3	1
13	x	2	0	3	x
14	x	x	1	3	x
15	x	3	1	6	x
16	x	3	2	7	x
17	x	x	3	x	x
18	x	2	0	x	x
19	x	3	2	x	x
20	x	6	3	x	x
21	x	9	3	x	x
22	x	8	x	x	x
23	x	8	x	x	x
24	x	9	x	x	x
<b>x</b>	<b>0,4</b>	<b>3,8</b>	<b>1,2</b>	<b>4,1</b>	<b>2,5</b>
<b>sD</b>	<b>0,5</b>	<b>2,8</b>	<b>1,1</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>

### 7.3.6 ED-1-pos. Zellen/100 Zellen

Tier/Feld	SHAM	RES	RES-ETA	PLT	PLT-ETA
1	1	7	5	20	8
2	1	11	7	21	8
3	2	13	7	9	7
4	0	15	3	14	7
5	0	6	3	16	9
6	0	7	4	13	10
7	1	7	4	12	11
8	3	9	5	11	11
9	5	8	5	15	3
10	1	9	2	17	5
11	0	10	2	17	6
12	0	10	8	15	9
13	1	11	9	11	17
14	1	12	10	12	6
15	2	13	3	9	7
16	2	11	11	21	5
17	1	10	14	9	4
18	1	9	3	9	4
19	1	9	4	10	6
20	3	8	5	10	7
21	3	13	2	13	7
22	3	5	2	13	8
23	1	13	3	15	8
24	1	13	1	15	3
25	0	14	0	16	2
26	0	7	1	16	3
27	1	8	2	12	6
28	2	7	0	12	7
29	1	9	3	7	7
30	1	9	5	20	3
31	3	10	4	13	1
32	3	10	4	13	9
33	1	11	3	16	10
34	1	12	4	15	5
35	1	12	4	12	11
36	0	8	6	12	10
37	0	5	6	13	9
38	0	9	8	17	8
39	2	9	9	19	8
40	2	7	3	9	7
41	4	8	4	20	6
42	1	11	2	21	5
43	1	7	3	18	4
44	1	13	5	17	4
45	2	7	6	14	8
46	1	8	9	15	6
47	1	11	1	16	3
48	1	9	1	15	7
49	2	10	2	14	7
x	<b>1,3</b>	<b>9,6</b>	<b>4,4</b>	<b>14,3</b>	<b>6,8</b>
sD	<b>1,1</b>	<b>2,4</b>	<b>3,0</b>	<b>3,6</b>	<b>2,9</b>

## 7.4 Lebenslauf

<b>Name</b>	Michael Johannes Harks
<b>Anschrift</b>	An der Wöste 6, 48231 Warendorf
<b>Geboren am</b>	22.01.1977 in Warendorf
<b>Familienstand</b>	ledig
<b>Konfession</b>	römisch-katholisch
<b>Nationalität</b>	deutsch
<b>Eltern</b>	Josef Harks und Julia Harks geb. Große Winkelsett
<b>Geschwister</b>	eine Schwester
<b>1983 - 1987</b>	Everwordgrundschule in Warendorf
<b>1987 - 1996</b>	Mariengymnasium in Warendorf
<b>11.06.1996</b>	Abitur am Mariengymnasium in Warendorf
<b>01.08.1996 - 31.08.1997</b>	Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz in Warendorf
<b>Ausbildung im Rahmen des Zivildienstes</b>	Ausbildung zum Rettungssanitäter
<b>WS 1997/98 - SS 2002</b>	Zahnmedizinstudium an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
<b>23.12.2002</b>	Approbation als Zahnarzt
<b>seit dem 04.03.2003</b>	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Poliklinik für Zahnerhaltung der ZMK in Münster

Münster, den 17.03.2005

## 7.5 Danksagung

Ohne die Hilfe vieler Freunde, Kollegen und meiner Familie wäre die Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen. Allen, die mich im Laufe der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben, möchte ich an dieser Stelle Dank sagen.

Als erstes gebührt der Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. H. U. Spiegel, der mir durch entscheidende Fragen immer wieder neuen Anstoß gab und mich durch sein Gespür für Entwicklungspotentiale sowie das Stellen von neuen Herausforderungen hervorragend betreut hat.

Ferner möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung Chirurgische Forschung bedanken, die mich bei der Durchführung des Projektes unterstützt haben.

Dem Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, speziell Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. Herbst und Frau G. Krull sowie dem Institut für Anatomie, speziell Herrn Prof. Dr. med. U. Stratmann und Frau K. Cebulla, danke ich für die hervorragende Aufarbeitung und Präsentation der Histologien.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. med. Martin Langer, der durch seine hervorragenden Zeichnungen entscheidend zur graphischen Veranschaulichung der Operationsmethoden beigetragen hat.

Zum Schluss möchte ich mich ausdrücklich bei meiner Familie bedanken, auf deren Hilfe ich mich nicht nur während des Studiums immer habe verlassen können.

## 7.6 Versuchsgenehmigung



Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
Abt. Chirurgische Forschung  
z.H. Herrn PD Dr. Hans-Ullrich Spiegel  
Waldeyerstr. 1

48149 Münster

DIE  
OBERBÜRGERMEISTERIN

STADT  MÜNSTER

VETERINÄR- UND  
LEBENSMITTELÜBER-  
WACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:  
Frau Heumann  
Zimmer: 106  
Telefon: 02534/971 - 301  
Telefax: 02534/971 - 399

Sprechzeiten:  
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:  
12.03.98 an die Bezirksregierung  
hier eingegangen am 06.04.98

Mein Zeichen (Bitte angeben):  
39/401 a)

Münster, 20. Mai 1998

**TIERSCHUTZGESETZ;**  
**hier: Tierversuch G 13/98**

Sehr geehrter Herr Dr. Spiegel,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von  
**240 Lewis-Ratten.**

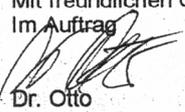
**Folgende Auflagen sind einzuhalten:**

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Pfleger der ZTE zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Prof. Dr. Richter zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen.
5. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.

*Diese Erlaubnis gilt für die Laufzeit des genehmigten Versuches.*

**Bitte beachten Sie, daß der Versuch erst begonnen werden kann, wenn Ihnen die Genehmigung der Bezirksregierung Münster vorliegt.**

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag

  
Dr. Otto  
Städt. Veterinärdirektor

#### Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 36-691
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 010 305 100
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 306 002

(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster
(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster
(BLZ 440 100 46)	Dresdner Bank Münster
(BLZ 400 101 11)	Volksbank Münster eG
(BLZ 480 201 51)	Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0/00	(BLZ 400 400 28)
Kto.-Nr. 0470 005	(BLZ 400 700 80)
Kto.-Nr. 806 485 800	(BLZ 400 800 40)
Kto.-Nr. 4 200 800	(BLZ 401 800 50)
Kto.-Nr. 61 226	(BLZ 400 500 00)

#### Zentrale Verbindungen

☎ Hauptvermittlung	(0251) 492-0
Telefax	(0251) 492-7700
Datex-J	0251492#
E-Mail	Stadtverwaltung@stadt-muenster.de



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

### Gegen Empfangsbekanntnis

Westfälische  
Wilhelms-Universität Münster  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
Abtlg. Chirurgische Forschung  
Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hans-Ulrich Spiegel  
Waldeyerstraße 1

48149 Münster

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: -2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers  
Aktenzeichen  
23.0835.1.0 (G 13/98)

26. Mai 1998

Betr.: Tierschutz;  
**hier:** Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 12.03.1998, hier eingegangen am 31.03.1998

### Genehmigungsbescheid:

Sehr geehrter Herr Dr. Spiegel,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Neufassung vom 17. Februar 1993 (BGBl. I S. 254) in geltender Fassung wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

#### **Auxiliäre Lebertransplantation als Therapie des durch Thioacetamid-induzierten Leberversagens bei der Ratte.**

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr  
Priv.-Doz. Dr. med. Hans-Ulrich Spiegel  
Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
Abtlg. Chirurgische Forschung  
Waldeyerstraße 1  
48149 Münster

Herr  
Dr. med. A. Probst  
Klinik für Unfall- und  
Handchirurgie  
Waldeyerstraße 1  
48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum **31. 05. 2000**.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

240 Ratten.

**Auflagen:**

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig **vor** Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

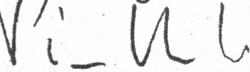
**Rechtsbehelfsbelehrung:**

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



(Dr. Piontkowski)



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

Herrn  
Prof. Dr. med. H.U. Spiegel  
Klinik und Poliklinik für  
Allgemeine Chirurgie  
Abtlg. Chirurgische Forschung des  
Universitätsklinikums Münster  
Waldeyerstraße 1

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers  
Aktenzeichen  
50.0835.1.0 ( G13/98 )

9. Juli 2001

48129 Münster

Betr.: Tierschutz;  
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren  
Tierversuch G 13/98:  
"Auxiliäre Lebertransplantation als Therapie  
des durch Thioacetamid-induzierten Leberver-  
sagens bei der Ratte"  
Bezug: - Ihr Antrag vom 28.05.2001 und Ergänzungen vom 22.  
06.2001, hier eingegangen am 23.06.2001  
- Mein Genehmigungsbescheid vom 26.05.1998 und Ver-  
längerung vom 13.03.2000 - Az.: 23.0835.1.0 (G 13/98)

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Spiegel,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekannt-  
machung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) stimme ich der in den  
o.a. Anträgen beschriebenen Erweiterung des o.g. Versuchsvorhabens  
sowie der Hinzunahme von 40 weiteren Versuchstieren (Lewis-Ratten)  
zu.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Wissing

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300  
e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de | X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle | Telefax (0251) 411-2525  
Konten der Regierungshauptkasse Münster:  
Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520  
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820  
Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie  
Abt. Chirurgische Forschung  
z.H. Herrn Prof. Dr. H.U. Spiegel  
Waldeyerstr. 1  
**48149 Münster**

Veterinär- und Lebensmittel-  
überwachungsamt

MS-Roxel, Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:  
Frau Heumann  
Zimmer: 106  
Telefon: 02534/971 - 301  
Telefax: 02534/971 - 399  
E-Mail:  
Amt\_39@stadt-muenster.de  
Sprechzeiten:  
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:  
28.05./22.06.2001 an die Bezirksregierung  
hier eingegangen am 12.07.2001

Mein Zeichen (Bitte angeben):  
39/401 a)

Münster,  
13.07.2001

### Tierschutzgesetz; Erweiterungsantrag

Tierversuch G 13/98

Versuchsleiter und Antragsteller:  
Prof. Dr. Spiegel

Stellvertreter:  
Dr. Probst, Unfall- u. Handchirurgie

Sehr geehrter Herr Professor Spiegel,

gemäß § 11 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1113) erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von

weiteren 40 Lewis-Ratten für obigen Versuch.

#### Folgende Auflagen sind einzuhalten:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Tierpfleger der ZTE zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Professor Richter von der ZTE zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die Tierversuche, die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen. Diese sind drei Jahre lang nach Abschluss des Versuchsvorhabens aufzubewahren und mir auf Verlangen zur Einsichtnahme vorzulegen.
5. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart- und zahl sowie der Unterbringung sind mir umgehend mitzuteilen.

*Diese Erlaubnis gilt für die Laufzeit des genehmigten Versuches.*

Mit freundlichen Grüßen

i.A.



Dr. Otto  
Städt. Veterinärdirektor

#### Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752	(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700	(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 36-461	(BLZ 440 100 46)	Dresdner Bank Münster
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 010 305 100	(BLZ 400 101 11)	Volksbank Münster eG
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 306 002	(BLZ 480 201 51)	Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0/00	(BLZ 400 400 28)
Kto.-Nr. 0470 005	(BLZ 400 700 80)
Kto.-Nr. 606 465 600	(BLZ 400 800 40)
Kto.-Nr. 4 200 800	(BLZ 401 600 50)
Kto.-Nr. 61 226	(BLZ 400 500 00)

#### Zentrale Verbindungen

☛ Hauptvermittlung (0251) 492-0  
Telefax (0251) 492-7700  
DateX-J \*0251492#  
E-Mail  
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de