

Katharina Lehne
Dr. med.

Entwicklung und Anwendung eines hochstandardisierten Leberperfuisionsmodells zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens der Rattenleber

Promotionsfach: Physiologie
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Nobiling

Teil A: Glucose- und Glycogenbestimmungen

In experimentellen Studien der Leber kann der hepatische Glycogengehalt relevante Auswirkungen auf die Versuchsergebnisse haben. So stellen endogene Glycogenvorräte ein wichtiges Substrat für die ATP-Synthese dar. Unterliegen die Zielparameter einer experimentellen Studie dem Einfluss ATP-konsumierender Prozesse, kommt es zu einer Streuung der Messwerte in Abhängigkeit vom hepatischen Glycogengehalt. Der Glycogengehalt der Leber wiederum wird maßgeblich vom Ernährungszustand des Versuchstieres bestimmt und unterliegt tageszeitlichen Schwankungen.

In Teil A dieser Arbeit sollten zunächst die physiologischen Schwankungen des hepatischen Glycogengehaltes im Tagesverlauf quantifiziert werden. Anschließend sollte geprüft werden, ob eine Standardisierung des Ernährungszustands im Sinne einer weitgehenden Depletion der hepatischen Glycogenreserven durch eine zwölfstündige Nahrungsdeprivation erreicht werden kann.

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley-Ratten, die in drei Versuchsgruppen eingeteilt wurden. Die Tiere der ersten beiden Versuchsgruppen erhielten Futter und Wasser ad libitum. Maximum und Minimum des hepatischen Glycogengehaltes waren am Ende der Aktivitäts- und Wachphase beziehungsweise am Ende der Schlaf- und Ruhephase der Ratten zu erwarten. Dementsprechend wurde den Tieren in Gruppe 1 die Leber um 7:00 Uhr zu Analyse-zwecken entnommen, um das physiologische Maximum des hepatischen Glycogengehaltes zu ermitteln. In Gruppe 2 erfolgte die Leberentnahme um 19:00 Uhr zur Bestimmung des physiologischen Minimums des hepatischen Glycogengehaltes. In einer dritten Versuchsgruppe fand die Leberentnahme nach zwölfstündiger Nahrungsdeprivation um 7:00 Uhr statt. Anschließend wurden die entnommenen Lebern aufbereitet, so dass eine quantitative Glycogenbestimmung mit Hilfe eines optisch-enzymatischen Tests möglich war.

Die Versuchsergebnisse konnten belegen, dass die hepatischen Glycogenvorräte der Ratte starken tageszeitlichen Schwankungen unterliegen. So sankt der hepatische Glycogengehalt zwischen 7:00 und 19:00 Uhr auf unter 4 % des Ausgangswerts ab. Demnach war bei den nachtaktiven Tieren physiologischerweise eine fast vollständige Depletion der hepatischen Glycogenvorräte im Tagesverlauf zu beobachten. Durch zwölfstündige Nahrungsdeprivation konnte eine Standardisierung des Ernährungszustands im Sinne einer weitgehenden Depletion der hepatischen Glycogenreserven erreicht werden. So führten zwölf Stunden Nahrungsentzug vor Leberentnahme zu einer Depletion der Glycogenvorräte auf etwa 1 % der maximalen hepatischen Glycogenspeicherkapazität.

Die beträchtliche Spannweite des hepatischen Glycogengehaltes im Tagesverlauf ist insbesondere für experimentelle Studien, deren Zielparameter dem Einfluss ATP-konsumierender Prozesse unterliegen, von besonderer Relevanz. Sofern die Einzelversuche dieser Studien nicht in einem sehr engen Zeitfenster durchgeführt werden, bewirken starke interindividuelle Schwankungen der Glycogenreserven eine erhebliche Streuung der Messwerte mit entsprechenden Auswirkungen auf das Signifikanzniveau beim statistischen Vergleich zweier Versuchsgruppen. Diese Problematik kann durch eine zwölfstündige Nahrungsdeprivation vor Versuchsbeginn effizient umgangen werden, da der Nahrungsentzug eine Standardisierung der hepatischen Glycogenvorräte im Sinne einer subtotalen Depletion bewirkt und somit eine homogene Ausgangslage in Bezug auf das Substrat zur Energiegewinnung herbeiführt.

Eine solche Standardisierung der hepatischen Glycogenvorräte vor Versuchsbeginn ist auch für Teil B und C dieser Arbeit von großer Bedeutung, in denen ein Modell zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens der Rattenleber entwickelt und anschließend für eine konkrete Fragestellung angewandt wurde. So wird auch das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens maßgeblich von dem für die ATP-Synthese zur Verfügung stehenden Substrat bestimmt. Durch Standardisierung der vorhandenen Substratmenge mittels zwölfstündiger Nahrungsdeprivation kann die Streuung der Messwerte effektiv reduziert werden.

Teil B: Entwicklung eines Leberperfusionsmodells

Die isoliert perfundierte Rattenleber ist ein bewährtes Modell zur Studie von Physiologie und Pathophysiologie der Leber. Durch die Isolation des Organs werden nervale, hormonelle und zirkulatorische Einflüsse des Gesamtorganismus umgangen, wodurch eine gute Standardisierung und Reproduzierbarkeit experimenteller Studien erreicht werden kann.

In Teil B dieser Arbeit sollte ein Perfusionsmodell etabliert werden, welches die nach Lebertransplantation im Organempfänger vorliegenden Bedingungen bestmöglich simuliert und somit eine Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens ex vivo ermöglicht.

Die Modellentwicklung erfolgte in drei Stufen:

Der erste Entwicklungsschritt galt der Validierung des Modells. So sollte sichergestellt werden, dass im Rahmen einer 90-minütigen Perfusion keine relevante Leberschädigung aus den intrinsischen Eigenschaften des Modells resultierte. Hierzu wurden Lebern nach kürzest möglicher kalter Ischämie in dem entwickelten Modell perfundiert, um den Ischämie-Reperfusionsschaden so gering wie möglich zu halten. Zur Beurteilung von Stoffwechsellistung und Organfunktion wurden Sauerstoffverbrauch und Gallefluss quantifiziert. Enzymfreisetzung und histologische Viabilitätsbestimmungen gaben Aufschluss über das Ausmaß einer etwaigen Zellschädigung. Die im Leberperfusionsmodell ermittelten Funktions- und Schädigungsparameter wurden mit physiologischen Daten verglichen, welche der Literatur entnommen wurden.

In einem zweiten Entwicklungsschritt sollte eine Kontrollgruppe mit signifikantem Ischämie-Reperfusionsschaden erstellt werden. Hierzu wurden Lebern nach einer 26-stündigen kalten Ischämie in dem entwickelten Modell perfundiert. Zur Quantifizierung des Ischämie-Reperfusionsschadens wurden die oben genannten Funktions- und Schädigungsparameter mit den Daten der Lebern des ersten Entwicklungsschrittes verglichen.

Im dritten Entwicklungsschritt sollte der Standardisierungsgrad des Modells überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde das eigene Modell mit in der Literatur beschriebenen Perfusionsmodellen verglichen. Aufgrund ihrer weit verbreiteten Bestimmung im Rahmen der isolierten Leberperfusion wurde die Laktatdehydrogenase als Vergleichsparameter gewählt. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurde aus Mittelwert und absoluter Standardabweichung der LDH-Werte die prozentuale Standardabweichung errechnet, welche ein relatives Maß des Standardisierungsgrades darstellt.

Die Versuchsergebnisse des ersten Entwicklungsschrittes zeigten, dass das entwickelte Modell die physiologischen Gegebenheiten hinreichend simuliert, so dass eine 90-minütige Leberperfusion bei guter Organfunktion und ohne relevante zelluläre Schädigung möglich ist. So stimmten Sauerstoffverbrauch und Gallefluss der perfundierten Lebern gut mit physiologischen Werten von Lebern in vivo überein. Eine relevante Zellschädigung oder ein nennenswerter Viabilitätsverlust der Zellen konnte aufgrund der Resultate von Enzymaktivitätsmessungen und histologischen Untersuchungen ausgeschlossen werden.

Im zweiten Entwicklungsschritt gelang es, durch 26 Stunden kalte Ischämie gefolgt von 90 Minuten normothermer Reperfusion einen hochgradigen Ischämie-Reperfusionsschaden zu induzieren. Dieser äußerte sich im Perfusionsmodell zum einen in Form eines stark verminderten Sauerstoffverbrauchs und Galleflusses, woraus sich eine deutliche Einschränkung von Leberfunktion und Stoffwechsellistung ableiten lässt. Zum anderen belegten hochsignifikant erhöhte Enzymaktivitäten im Perfusat eine ausgeprägte Störung der Zellintegrität. Histologische

Untersuchungen bestätigten eine deutlich herabgesetzte Viabilität von Endothelzellen und Hepatozyten.

Im dritten Entwicklungsschritt zeigte der Vergleich des eigenen Modells mit in der Literatur beschriebenen Perfusionsmodellen, dass das entwickelte Modell gemessen an der prozentualen Standardabweichung der LDH-Werte den höchsten Standardisierungsgrad aufwies. Zudem war die prozentuale Standardabweichung in 75 % der Vergleichspublikationen mehr als doppelt so hoch wie im eigenen Modell. Auf die außerordentliche Bedeutung der Standardisierung des hepatischen Glycogengehaltes durch Nahrungsdeprivation wurde bereits in Teil A der Arbeit eingegangen. Als weitere relevante Faktoren zur Standardisierung des Leberperfusionsmodells wurden die standardisierte Tierhaltung, die einheitliche Versuchsdurchführung unter Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmik, die präzise Konstanthaltung der Perfusionstemperatur, die ausreichende Oxygenierung des Perfusionspuffers sowie die Verwendung einer Luftfalle und eines Filtersystems erachtet.

Zusammenfassend ist es gelungen, ein valides, hochstandardisiertes Leberperfusionsmodell zu etablieren, welches exzellente Möglichkeiten zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens bietet, aber auch zur Ergründung zahlreicher anderer physiologischer und pathophysiologischer Prozesse der Leber hervorragend geeignet ist.

Teil C: Anwendung des Leberperfusionsmodells

Die Lebertransplantation ist derzeit der Goldstandard zur kurativen Therapie von Lebererkrankungen im Endstadium. Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist mit einem gehäuftem Auftreten der primären Transplantatdysfunktion assoziiert und trägt daher wesentlich zu Morbidität und Mortalität im Rahmen der Lebertransplantation bei. Der Ischämie-Reperfusionsschaden lässt sich in zwei Phasen einteilen: Während kalter Ischämie führt ein Mangel an Sauerstoff und glycolytischen Substraten zu einer ATP-Depletion mit konsekutiver Störung der Zellhomöostase. Die Reperfusion triggert eine inflammatorische Kaskade, welche mit der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies einhergeht.

In Teil C dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine metabolische Präkonditionierung der Leber mit Fructose zu einer Abschwächung des Ischämie-Reperfusionsschadens führt. Hierbei sollte das in Teil B etablierte Leberperfusionsmodell zur Anwendung kommen.

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley-Ratten. Es wurden zwei Versuchsgruppen aufgestellt: eine Kontrollgruppe und eine Fructosegruppe. Nach zwölfstündiger Nahrungsdeprivation erfolgte in der Fructosegruppe die intravenöse Applikation von 1 ml 300 mM Fructoselösung zur metabolischen Präkonditionierung. In der Kontrollgruppe wurde analog 1 ml Kochsalzlösung als Volumenäquivalent verabreicht. Nach einer zehnminütigen Einwirkzeit wurden die Lebern der Versuchstiere explantiert und für 26 Stunden bei 4 °C in HTK-Lösung gelagert. Im Anschluss an die kalte Ischämie wurden die Lebern 90 Minuten lang bei 37 °C in dem in Teil B dieser Arbeit etablierten Leberperfusionsmodell reperfundiert. Das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens wurde anhand von Berechnungen des hepatischen Sauerstoffverbrauchs, Messungen der Enzymfreisetzung ins Perfusat sowie histologischen Viabilitätsbestimmungen quantifiziert.

Die Versuchsergebnisse konnten eine protektive Wirkung von Fructose hinsichtlich des Ischämie-Reperfusionsschadens belegen. Ein erhöhter Sauerstoffverbrauch der Lebern in der Fructosegruppe wies auf eine bessere Stoffwechsellkapazität im Vergleich zur Kontrollgruppe hin. Auch wurde in der Fructosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant verminderte Enzymfreisetzung sowohl während kalter Ischämie als auch in der Reperusionsphase gemessen. Zudem ergaben histologische Untersuchungen am Ende der Leberperfusion, dass in der Fructosegruppe signifikant weniger avitale Hepatozyten vorlagen als in der Kontrollgruppe. Bei der statistischen Auswertung der avitalen Endothelzellen konnte zwar kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Jedoch waren sämtliche Lageparameter der Fructosegruppe unter den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zu bisherigen Studien, in denen eine protektive Wirkung von Fructose bezüglich anoxischer oder oxidativer Zellschädigung nachgewiesen werden konnte, war Fructose in dieser Arbeit im Sinne einer metabolischen Präkonditionierung ausschließlich vor Eintritt der schädigenden Einflüsse verfügbar. Demnach ist die hepatische Aufnahme von Fructose aus dem Blutkreislauf im Rahmen der Leberexplantation ausreichend, um eine signifikante Organprotektion zu bewirken.

Die protektive Wirkung von Fructose vor einer Schädigung der Leber durch Ischämie und Reperfusion basiert auf zwei Wirkmechanismen:

Zum einen ist Fructose ein gut geeignetes Substrat für anaerobe und aerobe Glycolyse. Somit kann Fructose von den Zellen der Leber sowohl während kalter Ischämie als auch in der Reperfusionsphase zur ATP-Synthese genutzt werden. Der Energieträger ATP wiederum ist essenziell für den Erhalt von Zellhomöostase, -funktion und -viabilität, da die Mehrzahl der zellulären Stoffwechselprozesse direkt oder indirekt ATP-abhängig ist.

Zum zweiten kann Fructose über den Pentosephosphatweg metabolisiert werden. Hierbei fällt NADPH an, welches zur Stabilisierung der zellulären Glutathionhomöostase genutzt werden kann. Einen besonderen Stellenwert hat dieser Mechanismus in der Reperfusionsphase bei Reoxygenierung der Leber. Hier werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet, welche aufgrund ihrer Reaktionsfreudigkeit die komplexen zellulären biochemischen Prozesse empfindlich stören. Glutathion ist ein potentes zelleigenes Reduktionsmittel und kann daher die Zellen der Leber effizient vor oxidativem Stress schützen.

Gegenüber Glucose weist Fructose einige Vorteile auf. So ist die Aufnahme von Fructose unabhängig von Insulin. Überdies wird Fructose vorrangig hepatisch metabolisiert. Glucose hingegen ist aufgrund der zentralen Rolle der Leber für die Regulation des Blutzuckerspiegels ein sehr schlecht geeignetes Substrat für die hepatische ATP-Synthese.

Bekannt Nebenwirkungen von Fructose sind ein transients Abfall der zellulären ATP-Vorräte und das Auftreten einer Laktatazidose.

Wenngleich der ATP-Abfall mit einer vorübergehenden Einschränkung ATP-abhängiger Zellfunktionen einhergeht, weisen die Ergebnisse experimenteller Studien darauf hin, dass die metabolische Kompetenz der Zellen für den Erhalt von zellulärer Integrität, Funktion und Viabilität von größerer Bedeutung ist als ihr absoluter ATP-Gehalt. Die metabolische Kompetenz der Zellen wiederum ergibt sich aus dem verfügbaren Substrat für die ATP-Synthese, so dass die Aufnahme von Fructose zu einer Erhöhung der zellulären Stoffwechselkapazität führt.

Die Frage, inwiefern dem Auftreten einer Laktatazidose nach Fructoseverabreichung im Kontext der Organentnahme zur Transplantation eine klinische Relevanz zukommt, ist aufgrund fehlender Studien zu dieser Thematik derzeit nicht zu beantworten. Bei Patienten mit ausgeglichenem Säure-Basen-Haushalt, normaler Leber- und Nierenfunktion sowie suffizienter Gewebeoxygenierung wird die intravenöse Verabreichung von Fructose in physiologischen Konzentrationen jedoch als unbedenklich erachtet.

In der klinischen Lebertransplantation scheint zur Minderung des Ischämie-Reperfusionsschadens aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede der Patienten mit konsekutiv großer Streuung der hepatischen Funktions- und Schädigungsparameter ein multimodaler Ansatz sinnvoll, der mehrere Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen einbezieht. Die in dieser Arbeit vorgestellte metabolische Präkonditionierung mit Fructose könnte als Bestandteil eines solchen multimodalen Ansatzes zu einer signifikanten Abschwächung des Ischämie-Reperfusionsschadens in der klinischen Lebertransplantation führen und damit maßgeblich zur Reduktion von postoperativer Morbidität und Mortalität beitragen.