

ISCHÄMISCHE PRÄKONDITIONIERUNG: EINE NEUE STRATEGIE ZUR VERHINDERUNG VON REPERFUSIONSSCHÄDEN IN DER FETTLIEBER



M. Selzner, N. Selzner, H.A. Rüdiger, P-A. Clavien

Universitätsspital Zürich, Departement für Viszeral- und Transplantationschirurgie, Zürich, Schweiz

Fettlebern haben eine verminderte Toleranz gegenüber Ischämie/ Reperfusionstörungen und entwickeln gehäuft Leberversagen oder Dysfunktionen nach Transplantationen. Ischämische Präkonditionierung (eine kurze Ischämiezeit vor einer längeren ischämischen Schädigung) wurde kürzlich als protektive Strategie bei normalen Lebern beschrieben. Wir testeten die Hypothese, dass ischämische Präkonditionierung die Gewebe-ATP-Spiegel verbessert und die Fettleber vor Reperfusionstörung schützt.

Methoden: Fettleber wurde durch eine cholin-defiziente Ernährung in Mäusen erzeugt. Tiere mit einer Fettleber sowie eine nicht steatotische Kontrollgruppe wurden einer 75 minütigen Ischämie des linken und mittleren Leberlappens (70%) unterzogen. Zusätzlich erhielt eine Mausgruppe 10 Minuten Ischämie und 15 Minuten Reperfusion (ischämische Präkonditionierung) vor der 75 minütigen Ischämiephase. Leberschädigung wurde durch GOT-Freisetzung quantifiziert. Hepatozelluläre Apoptosen wurden durch den TUNEL-Test sowie die Caspase 3-Aktivierung bestimmt und Nekrosen durch H&E-Färbung evaluiert. Zusätzlich wurden ATP-Spiegel im Lebergewebe mittels eines biolumineszenten Assays bestimmt.

Ergebnisse: Nach 4 Stunden Reperfusion hatten Mäuse mit Fettlebern 5-fach höhere GOT-Werte als nicht steatotische Kontrolltiere (15816 vs 10460 U/L; $p < 0.001$). Ischämische Präkonditionierung von steatotischen Mäusen senkte die GOT-Spiegel auf Werte im Bereich der nicht steatotischen Tiere (8300 U/L). Apoptose war die dominante Form des Zellunterganges bei schlanken Mäusen mit 77% TUNEL pos. Hepatozyten, verglichen mit 17% und 4% bei Fettmäusen mit und ohne Präkonditionierung ($p < 0.001$). Die Caspase 3-Aktivität, ein Schlüsselmediator der apoptotischen Signalkette, war 3-fach höher in nicht steatotischen Mäusen als in Tieren mit Fettleber mit oder ohne Präkonditionierung ($P < 0.01$ jeweils). 24 Stunden nach Reperfusion war 85% des Lebergewebes in steatotischen Mäusen nekrotisch, verglichen mit 18% in nicht steatotischen Tieren ($p < 0.01$). Ischämische Präkonditionierung reduzierte die Lebernekrosen auf 30% in Mäusen mit Fettleber ($p < 0.01$). Steatose war assoziiert mit signifikant reduzierten ATP-Spiegeln 4 Stunden und 24 Stunden nach Reperfusion in steatotischen Lebergeweben, verglichen mit normalen Lebern in Kontrollmäusen (1.29 vs 0.76 & 1.06 vs 0.39 $\mu\text{mol}/\text{pg}$; $p = 0.04$ & $p = 0.007$). Ischämische Präkonditionierung erhöhte die ATP-Spiegel zu beiden Zeitpunkten signifikant (1.06 & 0.83 $\mu\text{mol}/\text{pg}$; $p < 0.05$ jeweils).

Schlussfolgerung: Ischämische Präkonditionierung ist ein neuer Mechanismus zur Verhinderung von Reperfusionsschäden in der Fettleber. Der nekrotische Zelluntergang ist mit einer Verbesserung der Gewebs-ATP-Spiegel verbunden.

Einleitung

- Ischämie ist häufig während Leberresektion und Lebertransplantation
- Fettlebern haben eine deutlich verminderte Resistenz gegenüber Ischämie
- Ischämische Präkonditionierung ist eine neue Strategie zur Protektion von normalen Lebern gegen Reperfusionstörungen
- Der Effekt von ischämischer Präkonditionierung auf die Fettleber ist unbekannt

Hypothesen

1. Ischämische Präkonditionierung schützt die Fettleber gegen Reperfusionsschäden
2. Ischämische Präkonditionierung verhindert Apoptosen und Nekrosen nach Leberischämien

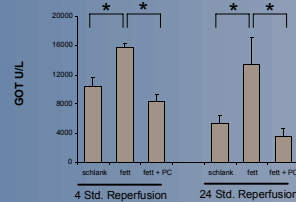
Material und Methoden

- Induktion von Steatose durch cholin-defiziente Ernährung in C57BL/6 Mäusen
- 75 Minuten Ischämie von 70% Lebergewebe
- Quantifizierung von Leberschädigung durch Serum GOT
- Evaluation von Apoptose durch TUNEL-Färbung und Caspase 3-Aktivität
- Bestimmung von Nekrosen durch H&E-Färbung
- Quantifizierung von Gewebe-Energie-Spiegeln durch ATP-Messung

Resultate

1. Bestimmung von Leberschädigung

Abb. 2. GOT-Spiegel nach 75 Min. Ischämie und 4 Std. & 24 Std. Reperfusion



Die Leberschädigung wurde durch Serum-GOT-Spiegel 4 Std. und 24 Std. nach Reperfusion bestimmt. Steatotische Lebern hatten signifikant höhere GOT-Spiegel als die schlanken Kontrolltiere. Ischämische Präkonditionierung (PC) reduzierte die GOT-Werte signifikant bis auf die Werte, welche der schlanken Kontrollgruppe entsprachen ($* = p < 0.01$).

2. Evaluation von Apoptose

Abb. 3. Caspase 3-Aktivität nach 75 Min. Ischämie und 4 Std. Reperfusion

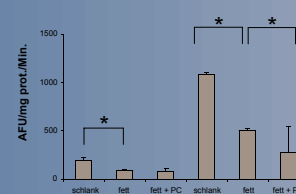


Abb. 4. TUNEL pos. Hepatozyten nach 75 Min. Ischämie und 4 Std. Reperfusion

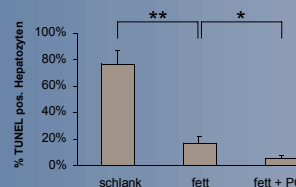
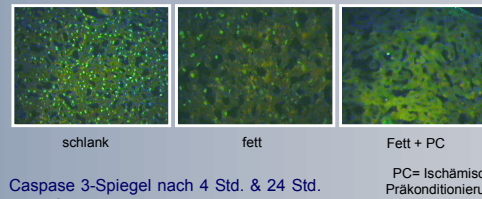


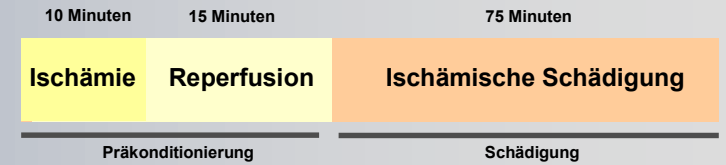
Abb. 5. TUNEL-Färbung nach 75 Min. Ischämie und 4 Std. Reperfusion



Caspase 3-Spiegel nach 4 Std. & 24 Std. Reperfusion. Tiere mit Fettlebern weisen eine verminderte Caspase 3-Aktivität auf im Vergleich zu den schlanken Kontrolltieren. Ischämische Präkonditionierung (PC) reduziert zusätzlich die Caspase 3-Aktivität in steatotischen Lebern ($* = p < 0.05$).

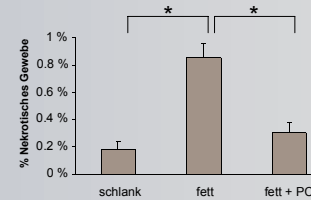
TUNEL-Färbung nach 4 Std. Reperfusion. Fettlebern haben signifikant weniger TUNEL positive Hepatozyten als schlanke Tiere. TUNEL-Färbung wird durch ischämische Präkonditionierung (PC) weiter reduziert ($** = p < 0.01$, $* = p < 0.05$).

Abb. 1. Ischämische Präkonditionierung



3. Quantifizierung von Nekrose

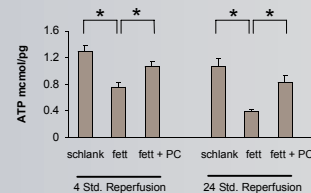
Abb. 6. Nekrose nach 75 Min. Ischämie und 24 Std. Reperfusion



Nekrotisches Lebergewebe nach 75 Min. Ischämie und 24 Std. Reperfusion. In Fettlebern ist ein Grossteil des Lebergewebes nekrotisch, während nur 20% des Lebergewebes in schlanken Tieren nekrotisch verändert ist. Ischämische Präkonditionierung (PC) reduziert signifikant die Menge der Nekrosen ($* = p < 0.01$).

4. Gewebe-Energie-Spiegel nach Ischämie und Reperfusion

Abb. 7. ATP-Spiegel nach Ischämie und Reperfusion



Gewebe-ATP-Spiegel nach 4 Std. & 24 Std. Reperfusion. Schlanke Tiere haben signifikant höhere ATP-Spiegel im Vergleich zu steatotischen Tieren. Ischämische Präkonditionierung erhöht den ATP-Gehalt im Lebergewebe ($* = p < 0.05$).

Zusammenfassung

- Fettlebern haben nach Ischämie und Reperfusion einen prädominant nekrotischen Zelltod
- Ischämische Präkonditionierung hat einen starken protektiven Effekt in Fettlebern
- Ischämische Präkonditionierung schützt gegen Apoptose und Nekrose
- Ischämische Präkonditionierung erhöht die ATP-Spiegel in Lebergewebe