

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
(Prof. Dr. med. M. Ghadimi)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Einfluss der medikamentösen Präkonditionierung
auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden
nach orthotoper Lebertransplantation im Rattenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Rian Lukas Urbach

aus

Saulgau, jetzt Bad Saulgau

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. O. Kollmar

Ko-Referent/in: Prof. Dr. S. Mihm

Datum der mündlichen Prüfung: 20.11.2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Historischer Rückblick	1
1.2 Immunsuppression	1
1.3 Operationsverfahren	2
1.3.1 Piggy-Back-Technik	2
1.3.2 Operationsverfahren zur Erweiterung des Spenderpools.....	3
1.4 Aktueller Stand der Lebertransplantation in Deutschland.....	4
1.4.1 Indikation.....	4
1.4.2 Organmangel	5
1.4.3 MELD-Score	6
1.4.4 Marginale Organe.....	7
1.5 Molekulare Mechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens.....	9
1.5.1 Die frühe Phase	10
1.5.2 Die späte Phase	11
1.5.3 Freie Sauerstoffradikale	11
1.6 Therapeutische Ansätze zur Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens.....	12
1.6.1 Chirurgische Strategien	12
1.6.2 Genterapeutische Ansätze	13
1.6.3 Pharmakologische Strategien.....	14
1.7 Grundlage dieser Studie	17
1.8 Hypothesen	17
1.9 Studienparameter	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere.....	19
2.2 Versuchsgruppen.....	21
2.3 MDDP (multi drug donor preconditioning)	23
2.4 Mikrochirurgische Technik der Lebertransplantation.....	23
2.4.1 Spenderoperation, Explantation	23
2.4.2 Empfängeroperation, Implantation.....	26
2.5 Gewebeentnahme und Fixierung.....	30
2.5.1 Herstellung der Gewebeschnitte, HE-Färbung.....	31
2.6 Histologische Auswertung.....	32
2.7 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	37

2.7.1 Physikalische Grundlagen.....	37
2.7.2 Durchführung	40
2.7.3 Auswertung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie.....	42
2.8 Statistik.....	45
3. Ergebnisse.....	46
3.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	46
3.1.1 Sinusoidales Perfusionsversagen	46
3.1.2 Hepatozelluläre Apoptose.....	47
3.1.3 Intrahepatische Leukozytenretention	48
3.1.4 Sinusoidale Leukostase.....	49
3.1.5 Venuläres Leukozyten-Rollen	50
3.1.6 Venuläre Leukozyten-Adhäsion.....	51
3.2 Histologische Auswertung.....	52
3.2.1 Vakuolisierung.....	52
3.2.2 Grobscholligkeit.....	53
3.2.3 Nekrose.....	54
3.2.4 Gewebestruktur.....	55
3.3 Klinische Chemie.....	56
3.3.1 AST.....	56
3.3.2 ALT	58
3.3.3 LDH	59
3.3.4 γ -GT	60
3.3.5 AP.....	61
3.3.6 Bilirubin	62
3.3.7 Triglyceride	63
3.3.8 LDL	64
3.3.9 HDL	65
4. Diskussion.....	66
4.1 Das Modell - Zusammenfassung	66
4.2 Interpretation der Ergebnisse	68
4.2.1 Pharmakologische Präkonditionierung	68
4.2.2 Aussagekraft der Laborwerte	75
4.2.3 Mikrozirkulation und Histologie	78
4.2.4 Pathomechanismen und epidemiologische Bedeutung.....	81
5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	84
6. Literaturverzeichnis.....	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1a: Verteilung der transplantierten nicht-steatotischen Versuchstiere.....	22
Abbildung 1b: Verteilung der transplantierten steatotischen Versuchstiere.....	22
Abbildung 2: Dosierung der MDDP-Präkonditionierung.....	23
Abbildung 3: Schemazeichnung und Platzierung des Plastiksplints.....	26
Abbildung 4: Anastomose der Vena portae.....	29
Abbildung 5: Anastomose der infrahepatischen Vena cava.....	29
Abbildung 6: Schemazeichnung eines Leberläppchens in funktionelle Zonen.....	32
Abbildung 7a: HE-Schnitt, starke Vakuolisierung.....	33
Abbildung 7b: HE-Schnitt, wenig Vakuolisierung.....	33
Abbildung 8: HE-Schnitt, Grobscholligkeit.....	34
Abbildung 9: HE-Schnitt, Nekrosen.....	35
Abbildung 10a: HE-Schnitt, Gewebestruktur zerstört.....	36
Abbildung 10b: HE-Schnitt, Gewebestruktur intakt.....	36
Abbildung 11: Schemazeichnung zum Aufbau einer Auflichtfluoreszenzapparatur.....	39
Abbildung 12: Verteilung der transplantierten Versuchstiere intravitale Fluoreszenzmikroskopie... 40	
Abbildung 13a: Positionierung des Versuchstiers auf dem Versuchstisch.....	41
Abbildung 13b: Ausgelagerter Leberlappen auf einem Löffel.....	42
Abbildung 14: Momentaufnahme der intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	43
Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopie: Sinusoidales Perfusionsversagen.....	46
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopie: Hepatozelluläre Apoptose.....	47
Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopie: Sinusoidale Leukostase.....	49
Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopie: Venuläres Leukozyten-Rollen.....	50
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie: Venuläre Leukozyten-Adhäsion.....	51
Abbildung 20: Histologie: Vakuolisierung der Hepatozyten.....	52
Abbildung 21: Histologie: Grobscholligkeit der Hepatozyten.....	53
Abbildung 22: Histologie: Nekrose der Hepatozyten.....	54
Abbildung 23: Histologie: Gewebestruktur.....	55
Abbildung 24: Klinische Chemie: AST.....	56
Abbildung 25: Klinische Chemie: ALT.....	58
Abbildung 26: Klinische Chemie: LDH.....	59
Abbildung 27: Klinische Chemie: γ -GT.....	60
Abbildung 28: Klinische Chemie: AP.....	61
Abbildung 29: Klinische Chemie: Bilirubin.....	62
Abbildung 30: Klinische Chemie: Triglyceride.....	63
Abbildung 31: Klinische Chemie: LDL.....	64
Abbildung 32: Klinische Chemie: HDL.....	65

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
Bag-1	<i>BCL2-associated-athanogene 1</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BMI	Body Mass Index
CDC	Center for Disease Control
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DRI	Donor Risk Index
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EDC	<i>extended donor criteria</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HDL	<i>high densitiy lipoprotein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGB1	<i>high-mobility-group-protein B1</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A
HNE	Hydroxynonenal
HSP	Hitzeschockprotein
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
IC	<i>intermitted clamping</i>
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
i.g.	intrastral
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase

INR	International Normalized Ratio
i.p.	intraperitoneal
IPC	<i>ischemic preconditioning</i>
i.v.	intravenös
LDC	Lieber-DeCarlie-Diet
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
Lig.	Ligamentum
LOX	Lipooxygenase
Mac-1	Macrophage 1 Antigen
MDA	Malondialdehyd
MDDP	<i>multidrug donor preconditioning</i>
MELD-Score	<i>Model for end-stage liver disease score</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium-Chlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NAFLD	<i>Non-alcoholic fat liver disease</i>
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>
NHBD	<i>Non heart beating donors</i>
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
STÄKO	Ständige Kommission Organtransplantation
SEC	<i>Sinusendothelial cells</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPG	Transplantationsgesetz
UNOS	United Network for Organ Sharing
V.	Vena

1. Einleitung

1.1 Historischer Rückblick

Nachdem Thomas E. Starzl in über 200 Tierexperimenten Lebertransplantationen durchgeführt hatte, wagte er am 1. März 1963 in Denver (USA) die weltweit erste orthotope Lebertransplantation am Menschen. Der Patient, ein dreijähriger Junge mit kongenitaler Gallengangatresie, verstarb jedoch perioperativ infolge nicht beherrschbarer Blutungen. Auch bei den beiden nachfolgenden Lebertransplantationen konnte aufgrund von Lungenembolien nur eine postoperative Überlebenszeit von 22 beziehungsweise sieben Tagen erreicht werden (Starzl et al. 1963). Schließlich gelang es Thomas E. Starzl 1967, bei einem 19 Monate alten Mädchen mit hepatozellulärem Karzinom die erste Lebertransplantation mit einer deutlich verlängerten Überlebenszeit durchzuführen. Das Mädchen verstarb 13 Monate nach der Transplantation an der bereits metastasierten Tumorerkrankung (Starzl et al. 1968).

In Deutschland wurde die erste Lebertransplantation von A. Gütgemann 1969 in Bonn durchgeführt (Gutgemann et al. 1969). 1972 startete R. Pichlmayr in Hannover das erste deutsche Lebertransplantationsprogramm.

Aufgrund mangelhafter Möglichkeiten der Organkonservierung, wenig entwickelter Operationstechniken und begrenzter Effizienz im Bereich der Immunsuppression waren die Langzeitüberlebensraten bis Ende der Siebzigerjahre jedoch unbefriedigend (Starzl und Demetris 1990).

1.2 Immunsuppression

Neben technischen Entwicklungen, verfeinerten Auswahlverfahren für Organspender, verbesserter Infektionsprophylaxe und besseren Möglichkeiten der Organkonservierung wurde die Erfolgsrate nach Transplantation vor allem durch die Weiterentwicklung der Immunsuppression entscheidend verbessert (Song et al. 2014). Da eine suffiziente Immunsuppression nach einer Organtransplantation von entscheidender Bedeutung ist, gelang der Durchbruch 1978, als Calne zum ersten Mal den Calcineurininhibitor Cyclosporin A verwendete, welcher 1976 aus den norwegischen Pilzspezies *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum* isoliert

worden war. Dies eröffnete ein neues Kapitel in der Geschichte der Lebertransplantation und führte in den folgenden Jahren zu einer Verdoppelung der 1-Jahres-Überlebensrate auf 73% im Vergleich zu den bisherigen Versuchen mit Azathioprin, Cyclophosphamid und Cortison (Calne et al. 1979; Starzl et al. 1989).

Cyclosporin A ist ein Arzneistoff, der die Immunabwehr unterdrückt, indem er indirekt das Enzym Calcineurin inhibiert. Die Bindung von Calcineurin an NF-AT, ein Genregulierendes Protein, wird verhindert und damit die Ausschüttung immunmodellierender Substanzen aus T-Helfer-Zellen, wie Interleukin-2 und γ -Interferon, unterdrückt. Infolgedessen unterbleibt die Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten (Uysal und Dokur 2017).

Eine weitere Verbesserung im Bereich der Immunsuppression wurde gegen Ende der Achtzigerjahre durch Verwendung von Tacrolimus, Mycophenolat-Mofetil, Sirolimus und spezifische Antikörpertherapien (anti-IL-2-Rezeptor, anti-CD3-Antikörper) erreicht. Die vielfältigen Möglichkeiten im Bereich der Immunsuppression ermöglichen heutzutage eine individuelle Therapieempfehlung für den Patienten (Calne et al. 1979; Chang et al. 2000; D'Avola et al. 2017; Meirelles Junior et al. 2015; Ruckert 1992; Starzl et al. 1989; Sterneck et al. 2000).

Als Folge der deutlich verbesserten Überlebensraten wurde 1983 von der US-amerikanischen nationalen Gesundheitsbehörde die Lebertransplantation als validierte Therapie des terminalen Leberversagens eingeführt (Meirelles Junior et al. 2015).

1.3 Operationsverfahren

1.3.1 Piggy-Back-Technik

Neben der konventionellen Operationstechnik, die komplette retrohepatische Vena cava inferior des Empfängers durch die Vena cava inferior des Transplantats zu ersetzen, wurde bereits 1968 von Calne ein Verfahren beschrieben, das den kavalen Rückstrom des Blutes bestehen lässt, um hämodynamische Komplikationen zu vermeiden (Calne und Williams 1968; Song et al. 2014). Diese sogenannte Piggy-Back-Technik wurde erstmals 1988 von A. Tzakis angewandt (Tzakis et al. 1989). Bei diesem Verfahren bleibt die Vena cava inferior des Empfängers in ihrer Kontinuität

erhalten. Die spenderseitige Vena cava inferior wird End-zu-Seit auf eine Lebervene der partiell ausgeklemmten Empfänger-Cava anastomosiert (Nishida et al. 2006).

Der Vorteil dieser Methode liegt vor allem darin, dass die Verwendung extrakorporaler Bypasssysteme, wie sie ursprünglich von Thomas E. Starzl beschrieben worden waren, hinfällig wird. Dadurch können Komplikationen wie renale Hypoperfusion und hämodynamische Instabilität, die auf den verminderten venösen Rückstrom in der anhepatischen Phase zurückzuführen sind, vermieden werden (Schmidt et al. 2008; Song et al. 2014). Die Anastomose der Arteria hepatica propria auf einen Patch des Truncus coeliacus sowie die Anastomose der Vena portae und des Ductus choledochus unterscheiden sich bei der Piggy-Back-Technik nicht von der konventionellen Methode.

Da sich die Piggy-Back-Technik aufgrund geringer Komplikationsraten und kürzerer warmer Ischämiezeit bewährt hat, gehört sie heutzutage in den meisten Transplantationszentren zum Standardverfahren (Schmidt et al. 2008; Tabrizian et al. 2016).

1.3.2 Operationsverfahren zur Erweiterung des Spenderpools

Um der zunehmenden Organknappheit zu begegnen, wurden weitere Operationsverfahren, wie die Split-Leber-Transplantation, die Leberlebendspende und die Domino-Transplantation entwickelt. Die Split-Leber-Operationstechnik, die 1988 erstmals von Pichlmayr beschrieben worden war, ist dadurch gekennzeichnet, dass ein Spenderorgan auf zwei Transplantatempfänger, klassischerweise einen Erwachsenen und ein Kind, aufgeteilt wird (Pichlmayr et al. 1988). Auch die Leberlebendspende, erstmalig 1990 von Strong et al. erfolgreich durchgeführt, basiert auf dem Konzept, nur eine Hälfte der Leber zu transplantieren. Bei der Leberlebendspende wurde dabei ein erhöhtes Morbiditätsrisiko für die Entnahme des rechten Leberlappens gegenüber dem links-lateralen Segment aufgezeigt (Kwon et al. 2003; Song et al. 2014; Umeshita et al. 2003).

Bei der Amyloidose, einer Stoffwechselerkrankung der Leber, kann eine Domino-Transplantation erfolgen. Im Krankheitsverlauf kommt es zu einer Ablagerung von Proteinen im Interstitium verschiedener Körpergewebe. Diese Ablagerungen erreichen dann erst nach 20 bis 30 Jahren einen Krankheitswert. So kann ein Patient mit

Amyloidose durch eine Lebertransplantation mit einer gesunden Leber geheilt werden. Die Leber des an Amyloidose erkrankten Patienten kann dann wiederum in einen anderen Patienten, welcher sehr dringlich eine Lebertransplantation benötigt, transplantiert werden, da sich dort die Erkrankung der Amyloidose erst nach 20 bis 30 Jahren manifestieren wird.

1.4 Aktueller Stand der Lebertransplantation in Deutschland

Auch in Deutschland hat sich im Verlauf der letzten 20 Jahre die Lebertransplantation zu einem Routineverfahren entwickelt. Im Jahr 2015 wurden in 23 Kliniken insgesamt 891 Lebern transplantiert. 1308 Patienten wurden 2015 neu zur Lebertransplantation angemeldet. In den Transplantationszentren werden dabei heutzutage 1-Jahres-Überlebensraten von über 90% erreicht (Tacke et al. 2016).

1.4.1 Indikation

Heute gilt die Lebertransplantation als Standardverfahren in der Therapie von Patienten mit schweren irreversiblen, progredienten Lebererkrankungen, die das Leben des Patienten gefährden. Dabei dürfen weder alternative Therapiekonzepte, noch Kontraindikationen gegen eine Transplantation vorhanden sein ("Bundesärztekammer 2013: Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG" 2013).

Bei Kindern sind es vor allem Stoffwechselerkrankungen und Gallengangsatresien, die zu einer Transplantation führen. Demgegenüber führen bei Erwachsenen das akute Leberversagen, Malignomerkrankungen, chronische Hepatitiden sowie die nutritiv-toxische Leberzirrhose am häufigsten zu einer Transplantation. Typischerweise handelt es sich dabei um eine Alkohol-induzierte Zirrhose, jedoch nimmt auch die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) an Häufigkeit zu (Herzer et al. 2013). Für eine Transplantation infolge einer Alkohol-induzierten Leberzirrhose muss eine Abstinenz von mindestens sechs Monaten nachgewiesen sein.

1.4.2 Organmangel

Die erreichten Fortschritte in Bezug auf die Überlebensraten haben seit den frühen Neunzigerjahren zu einem erheblichen Zuwachs an Transplantationen geführt. Im Jahr 2014 wurden in Deutschland 879 Lebertransplantationen nach postmortalen Organspende und 58 nach einer Lebendspende durchgeführt. 1336 Patienten wurden 2014 neu zu einer Lebertransplantation angemeldet. 2011 und 2010 war die Anzahl der Lebertransplantationen am höchsten, jedoch waren diese in Folge des Transplantationsskandals wieder rückläufig (Tacke et al. 2016).

In der Bundesrepublik Deutschland regelt seit 1997 das Transplantationsgesetz (TPG) die Richtlinien für die Indikationsstellung und Aufnahme eines Patienten auf die Warteliste. Eine Transplantation kommt nur dann in Betracht, wenn sie eine Lebensverlängerung oder Verbesserung der Lebensqualität im Vergleich zur konventionellen Therapie erwarten lässt (Cicinnati et al. 2007; Herzer et al. 2013).

Dem steigenden Bedarf an Organen steht jedoch auch ein zunehmender Mangel an Spenderorganen gegenüber. In der Vergangenheit war es die Aufgabe der jeweiligen Ärzte eines Transplantationszentrums, den passenden Organempfänger bei Verfügbarkeit eines Spenderorgans auszuwählen. In diese Entscheidung gingen Kriterien wie Zustand des Organempfängers, Gewicht, Größe, Alter, Grunderkrankung und logistische Bedingungen ein (Herzer et al. 2013). Die ständige Kommission Organtransplantation hat die Allokationskriterien revidiert. Danach entscheidet heutzutage eine interdisziplinäre Transplantationskonferenz (bestehend aus einem Anästhesisten, Internisten, Chirurgen und einem weiteren unabhängigen Vertreter) nach dem 6+2-Augen-Prinzip über die Listung eines Patienten zur Lebertransplantation in den Transplantationszentren. Um die Organallokation gerecht und transparent zu gestalten, erfolgte 2006 die Einführung der auf dem MELD-Score (*model of end-stage liver disease*) basierten Organallokation (Herzer et al. 2013).

1.4.3 MELD-Score (*model for end-stage liver disease*)

Der MELD Score wurde 2002 durch das United Network for Organ Sharing (UNOS) in den USA eingeführt und 2003 im Eurotransplant-Raum (Deutschland, Österreich, Slowenien, Kroatien, Ungarn, Niederlande, Belgien, Luxemburg) übernommen. Er ist in Deutschland, Belgien und den Niederlanden für Patienten über 16 Jahre die Grundlage für die Organallokation und gibt den Schweregrad einer Lebererkrankung auf der Basis folgender Laborparameter an:

- **Serum-Kreatinin** (in mg/dl)
- **Gesamt-Bilirubin** (in mg/dl)
- **INR** (*international normalized ratio*)

Aus diesen Parametern kann mit der Formel:

$$10 * (0,957 * \log(\text{Kreatinin}) + 0,378 \log(\text{Bilirubin}) + 1,12 \log(\text{INR}) + 0,643)$$

der sogenannte labMELD mit einem Punktwert zwischen 6 und 40 berechnet werden. Der Punktwert korreliert mit der Überlebenswahrscheinlichkeit innerhalb der nächsten drei Monate. Diese beträgt, bei einem Punktwert von 6 fast 100%, während sie bei einem Punktwert von 40 bei nur etwa 1% liegt (Herzer et al. 2013). Dadurch wird erreicht, dass ein passendes Spenderorgan dem jeweilig bedürftigsten Patienten zugeordnet werden kann. Ab einem Punktwert von 15 hat der Patient schon im ersten Lebensjahr einen Überlebensvorteil durch die Transplantation (Herzer et al. 2013).

Für rund 30% der Patienten kann jedoch anhand des labMELD die Dringlichkeit einer Lebertransplantation nicht adäquat beurteilt werden. Um diesem Problem zu begegnen, wurden sogenannte Standardausnahmen definiert, anhand derer dem Patienten ein direkter Punktwert, der sogenannte matchMELD zugeordnet wird. Zusätzlich wurde ein sogenannter HU-Status (*high urgency*) für Patienten eingeführt, die sich in einer akut lebensbedrohlichen Situation mit wahrscheinlichem Tod innerhalb der nächsten Tage ohne Transplantation befinden. Folgende Indikationen können zu einer Anerkennung des HU-Status führen: akutes Leberversagen, akutes Transplantatversagen innerhalb 14 Tagen nach einer Transplantation, akute Dekompensation bei Morbus Wilson oder Budd-Chiari-Syndrom, lebensbedrohliches Lebertrauma und anhepatischer Zustand als Folge eines akuten Leberversagens mit toxischem Lebersyndrom (Adam et al. 2012; Herzer et al. 2013; Kaltenborn et al. 2015; Merion et al. 2011).

1.4.4 Marginale Organe

Um der Diskrepanz zwischen verfügbaren und benötigten Spenderorganen zu begegnen, werden neben der Domino-Transplantation, der Leberlebendspende und der Split-Leber-Transplantation weitere Konzepte verfolgt, um den Spenderpool zu erweitern. Für diese sogenannten marginalen Organe oder *extended donor criteria* (EDC) gibt es keine allgemein anerkannte wissenschaftliche Definition. Vielmehr bezeichnet der Begriff verschiedene Eigenschaften des zu transplantierenden Organs, beziehungsweise des Organspenders (J Pratschke et al. 2008). Unterschiedliche Quellen widersprechen sich hinsichtlich der Kriterien und Grenzwerte.

Von der Bundesärztekammer wurden Kriterien für die Einschränkung der Vermittelbarkeit von Spenderorganen definiert. „Es liegen beispielsweise dann erweiterte Spenderkriterien vor, wenn der Spender unter einer der nachfolgend genannten Krankheiten gelitten hat:

Virushepatitis (jeweils alternativ HBS Ag+, anti-HBC+ oder anti-HCV+), Sepsis mit positiver Blutkultur, Meningitis, maligner Tumor in der Anamnese, Drogenabhängigkeit.

Bisher existieren nur für die Lebertransplantation spezifizierte erweiterte Spenderkriterien. Dies sind alternativ:

Alter des Spenders > 65 Jahre, Intensivtherapie einschließlich Beatmung des Spenders > 7 Tage, Adipositas des Spenders mit BMI > 30kg/m², Fettleber (histologisch gesichert) > 40%, Serum-Natrium > 165 mmol/l (letzter Wert vor der Spendermeldung), SGOT oder SGPT > 3 x normal (letzter Wert vor der Spendermeldung) oder Serum-Bilirubin > 3 mg/dl (letzter Wert vor der Spendermeldung)“ ("Bundesärztekammer 2006: Bekanntmachungen: Richtlinien zur Organtransplantation gemäß § 16 TPG" 2006).

Die Transplantation von marginalen Organen ist für sämtliche EDC-Kriterien mit einer schlechteren Funktion des transplantierten Organs und einem insgesamt schlechteren Outcome für den Transplantatempfänger assoziiert. Insbesondere gilt dies für Lebern mit hohem Verfettungsanteil und Organe von älteren Spendern (Gastaca 2009). Die Erweiterung der Kriterien für in Frage kommende Spenderorgane hat dabei die Sterblichkeit auf der Warteliste und die Wartezeit bis zur Transplantation erheblich verkürzt (Tector et al. 2006). Jedoch stellt die Akzeptanz dieser marginalen Organe

ein ethisches Problem dar, da die zu erwartende Sterblichkeit für den individuellen Organempfänger nicht vorausgesagt werden kann (Pratschke et al. 2009).

Aufgrund des Organmangels, der sich in den letzten Jahren entwickelt hat, erscheint es jedoch nicht sinnvoll, potentielle Spenderorgane im Hinblick auf einzelne EDC-Kriterien abzulehnen. Vielmehr haben sich unterschiedliche Konzepte entwickelt, diese Organe als Transplantat verwenden zu können. Neben dem logistischen Transferziel die kalte Ischämiezeit zu verkürzen, exzellenter präoperativer Patientenbetreuung, optimierter Operationsabläufe und konsequenter Nachsorgekonzepte, sind dabei vor allem die pharmakologische Vorbehandlung von Spender und Empfänger zu nennen.

Um die Bedeutung der Kombination verschiedener EDC-Kriterien evaluieren zu können, wurden verschiedene Berechnungsmodelle, wie beispielsweise das *EDC-scoring system* oder der DRI (*donor risk index*) entwickelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Anstieg der Patientensterblichkeit mit zunehmendem EDC-Score zu verzeichnen ist (Cameron et al. 2006; Feng et al. 2006).

Leberverfettung

Man kann grundsätzlich zwischen mikrovesikulärer und makrovesikulärer Verfettung unterscheiden. Die mikrovesikuläre Verfettung ist histologisch dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkern der Hepatozyten zentral liegt und über 90% der Vakuolen klein erscheinen. Bei der makrovesikulären Verfettung finden sich demnach über 10% große Vakuolen und der Zellkern imponiert an die Zellmembran gedrängt. (Fishbein et al. 1997; Garcia Urena et al. 1998; Markin et al. 1993).

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Leberverfettung und das Ausmaß der Verfettung kann mit Hilfe des BMI und des Spenderalters ermittelt werden (Rinella et al. 2001). Angesichts der stetigen Zunahme von Adipositas in der Bevölkerung der Industrienationen muss davon ausgegangen werden, dass sich auch das Ausmaß der Leberverfettung in der Bevölkerung ausbreiten wird. Somit wird zukünftig der Nutzbarmachung marginaler Organe, insbesondere von Fettlebern, eine herausragende Bedeutung zukommen (Mensink et al. 2005).

Als Ursache für das verschlechterte Outcome von Fettlebern nach einer Transplantation werden verschiedene Pathomechanismen diskutiert. So führt die Verfettung der Hepatozyten zu einem vergrößerten Zellvolumen und damit zu einer

relativen Lumenabnahme der Sinusoide, was wiederum eine Hypoxie bedingt. Zusätzlich wird durch die Lumenabnahme eine adäquate Perfusion mit der jeweiligen Konservierungslösung vermindert. Die Schäden, die bei der Reperfusion an Sinusendothelzellen (SEC) und Hepatozyten entstehen, führen zu einer Ausschwemmung von Fettsäuren in die Sinusoide und behindern damit zusätzlich die Mikrozirkulation (Koneru und Dikdan 2002; Seifalian et al. 1998).

1.5 Molekulare Mechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden ist charakterisiert durch sinusoidale Vasokonstriktion aufgrund der Beteiligung von SEC und Epithelzellen der postsinusoidalen Venulen sowie durch die Entstehung eines intrazellulären Ödems der Hepatozyten. Zusätzlich kommt es zu einer Einwanderung neutrophiler Granulozyten, Aktivierung von Kupferzellen, Thrombozytenaggregation und schließlich zu Veränderungen des kapillären Blutflusses. Die Folge sind Zellschädigung und Organdysfunktion (Moussavian et al. 2011).

Die gestörte Mikrozirkulation ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die geschädigten SEC ihr Zytoskelett verändern, sich in das sinusoidale Lumen hineinwölben und vermehrt Adhäsionsmoleküle präsentieren, was wiederum zu einer Leukozytenemigration führt. Während die meisten SEC die Phase der Ischämie, abgesehen von den Veränderungen des Zytoskeletts, lebendig überstehen, gehen sie während der Reperfusion in großer Anzahl unter und verursachen ein Leck in der Endothelbarriere, das zu einer Thrombozytenaggregation führt (Cywes et al. 1993; Selzner et al. 2003; Sindram et al. 2000). Die Folge davon ist eine zusätzliche Einengung des sinusoidalen Lumens, eine Störung der Mikrozirkulation und damit eine relative Hypoxie (Caldwell-Kenkel et al. 1988; Kupiec-Weglinski und Busuttill 2005; Marzi et al. 1991).

Desweiteren führt die NO-Produktion der Thrombozyten in Kombination mit freien Sauerstoffradikalen zu einer Bildung von Peroxynitrit, was wiederum ein starker Induktor von Apoptose der Sinusepithelzellen ist (Gow et al. 1998).

Der durch Ischämie verursachte Sauerstoffmangel verhindert in den Mitochondrien die oxidative Phosphorylierung. Dies verursacht einen intrazellulären ATP-Mangel. Die Folge ist eine verminderte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, was zunächst zu einer

intrazellulären Akkumulation von Natriumionen führt und als Folge dessen auch die intrazelluläre Calciumhomöostase stört. Das Resultat ist eine Membranstabilität mit intrazellulärem Ödem und unter Umständen auch der Zelltod. Obwohl die Zellschädigung, die durch den Sauerstoffmangel verursacht wird, einen signifikanten Schaden anrichtet, wiegt der Zellschaden, der nach der Reperfusion entsteht, noch schwerer. Nach der Wiedereröffnung des hepatischen Blutflusses setzt eine massive, akute Entzündungsreaktion ein, die für die entscheidende Ursache des hepatischen Zellschadens nach der Reperfusion verantwortlich gemacht wird (Jaeschke 2003).

Der Ischämie-/Reperfusionsschaden kann, wie im Folgenden aufgeführt, in eine frühe und eine späte Phase unterteilt werden.

1.5.1 Die frühe Phase

In der frühen Phase des Ischämie-/Reperfusionsschadens verursacht die stressbedingte Zellschädigung nach Einsetzen der Reperfusion eine Freisetzung verschiedener Moleküle wie HMGB1, Hitzeschockproteine sowie RNA und DNA Fragmente, sogenannter DAMPs (*damage-associated molecular patterns*), die eine Entzündungsreaktion initiieren und aufrechterhalten können (Jaeschke 2011). Diese DAMPs interagieren mit membranständigen Toll-like-Rezeptoren (TLR-9 und TLR-4) der Kupfferzellen und führen zu deren Aktivierung. Kupfferzellen können als leberspezifische Makrophagen angesehen werden, die im sinusoidalen Spaltraum angesiedelt sind. Sie generieren reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die wiederum direkte zytotoxische Wirkung auf die Hepatozyten und SEC haben können, wie auch indirekt über die Rekrutierung verschiedener Entzündungsmediatoren zu einer Immunantwort führen (Jaeschke 2003).

Die Bindung von HMGB1 an den TLR-4 Rezeptor führt neben einer direkten Aktivierung von neutrophilen Leukozyten auch zu einer Aktivierung der NADPH-Oxidase (NOX-2), dem wichtigsten Superoxid produzierenden Enzym der Phagozyten. Des Weiteren kommt es zu einer Freisetzung von Cytokinen und Chemokinen, insbesondere TNF- α , IL-1, IL-6 und Komplementfaktoren (C5a), die wiederum Kupfferzellen und neutrophile Leukozyten dazu anregen, ROS zu produzieren und damit eine verstärkte Produktion von Zelladhäsionsmolekülen (CD11b/CD18) auf den neutrophilen Leukozyten und Endothelzellen zu verursachen (Jaeschke 2003, 2011).

1.5.2 Die späte Phase

Die gesteigerte Expression von P-Selektin und L-Selektin sowie ICAM-1 und Mac-1 führt schließlich zu einer verstärkten Interaktion mit dem Gefäßendothel und Emigration der Leukozyten in das Leberparenchym (Jaeschke 2011). Die Akkumulation der Leukozyten im Leberparenchym kennzeichnet den Beginn der späten Phase der Entzündungsreaktion (Lentsch et al. 2000; Teoh und Farrell 2003).

Aktivierete neutrophile Leukozyten setzen darüber hinaus Elastase, Cathepsin G, Heparanase, Collagenase und catalytische Enzyme frei, die eine direkte zytotoxische Wirkung auf Hepatozyten haben (Teoh und Farrell 2003).

1.5.3 Freie Sauerstoffradikale

Für eine entscheidende Beteiligung an der Organschädigung nach der Reperfusion ischämischer Organe wird das Vorhandensein freier Sauerstoffradikale verantwortlich gemacht (Connor et al. 1992). Schon wenige Minuten nach der Reperfusion sind die freien Radikale im zirkulierenden Blut messbar erhöht. An der Bildung der reaktiven Radikale sind in der frühen Phase des Ischämie-/Reperfusionsschadens vor allem aktivierte Kupferzellen beteiligt (Jaeschke et al. 1992).

In der späten Phase des Ischämie-/Reperfusionsschadens kommt es aufgrund der Wirkung von Cytokinen, Chemokinen und aktivierten Komplementfaktoren auch zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch aktivierte Leukozyten und Sinusepithelzellen. Die Radikale entstehen im Purinstoffwechsel bei der Umwandlung von Hypoxanthin zu Xanthin auf der Basis eines Cytochrom P-450 Metabolismus (Jaeschke 1991, 2003; Jaeschke et al. 1992).

Der oxidative Stress, der durch die ROS verursacht wird, führt unter anderem über DNA-Oxidation, Lipidperoxidation und Enzymdenaturierung zu einer direkten Zellschädigung. Da vor allem die Lipidkomponenten der Zellmembran von dieser oxidativen Schädigung betroffen sind, kommt es zu einer Instabilität der Zellmembran, die unter Umständen zur Lyse der Zelle führt (Derin et al. 2004). Ebenso werden Caspasen aktiviert, die wiederum zur Apoptose der Zelle führen (Klune und Tsung 2010). Auf der Basis dieser Schädigungsmechanismen besteht daher ein Zusammenhang zwischen Ischämiezeit und der Konzentration freier Radikale, die

wiederum mit einem höheren Transplantatversagen korreliert (Lutterova et al. 2001; van As et al. 2002; Zhong et al. 2005).

1.6 Therapeutische Ansätze zur Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Etwa 10% der Fälle von primärem Organversagen nach Lebertransplantation können direkt auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden zurückgeführt werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Schwere des Ischämie-/Reperfusionsschaden mit der Vorschädigung des transplantierten Organs korreliert. Insbesondere bei Fettlebern konnte ein signifikant häufigeres primäres Organversagen nachgewiesen werden. Um den Anteil des primären Organversagens aufgrund des Ischämie-/Reperfusionsschadens insbesondere für marginale Organe zu verringern gibt es verschiedene therapeutische Ansätze (Briceno et al. 2002; Caraceni et al. 2005; Fondevila et al. 2003).

Allen therapeutischen Ansätzen ist gemeinsam, dass sie entweder versuchen eine direkte Protektion zu erreichen, indem Enzyme gehemmt werden, die für eine Schädigung verantwortlich gemacht werden, oder das Ziel haben die Toleranz des Gewebes gegenüber des Ischämie-/Reperfusionsschadens zu erhöhen. Dazu sollen hier drei verschiedene Möglichkeiten, nämlich chirurgische, gentechnologische und pharmakologische Strategien unterschieden werden (Selzner et al. 2003).

1.6.1 Chirurgische Strategien

Ischämische Präkonditionierung

Die Idee der ischämischen Präkonditionierung (IPC) besteht darin, durch eine einmalige Ischämie, oder wiederholte kurze ischämische Phasen mit anschließender Reperfusion ein geringes Stresslevel in der Zelle zu erzeugen. Dadurch wird die Zelle auf die lange Ischämie bei der Transplantation „vorbereitet“ und hat zu diesem Zeitpunkt verbesserte Schutzmechanismen entwickelt (Banga et al. 2005). Technisch wird die hepatische Trias aus Vena portae, Arteria hepatica propria und Ductus choledochus für 15 Minuten abgeklemmt und damit der Blutzufuhr vollständig

unterbrochen. Anschließend wird die Klemme geöffnet, und es schließt sich eine 15-minütige Phase der Reperfusion an (Selzner et al. 2003).

Bei der IPC können dabei eine frühe Phase, deren Wirkung wenige Minuten nach der Reperfusion einsetzt und für wenige Stunden anhält, von einer späten Phase, die etwa 24 Stunden nach Reperfusion beginnt und dann für einige Tage anhält, unterschieden werden (Carini und Albano 2003; Jenkins et al. 1995; Korthuis et al. 2001).

Mit dem Wissen, dass eine unterschwellige Stresssituation eine Reihe von zellulären Anpassungs- und Schutzmechanismen auslöst, um einem erneuten Stressfaktor ähnlicher Art zukünftig angepasster begegnen zu können, werden vor allem Anpassungsreaktionen von Adenosin, NO, oxidativem Stress, einigen Hitzeschockproteinen, insbesondere HSP72 und HSP32 und TNF- α , beobachtet. So kommt es beispielsweise zu einer verminderten Expression von P-Selektin, dessen Produktion von TNF- α getriggert wird (Lesurtel et al. 2009; Selzner et al. 2003).

Intermitted clamping

Gleich wie bei der IPC wird beim *intermitted clamping* (IC) der Blutfluss über das Anbringen einer Klemme an der hepatischen Trias unterbrochen. Im Unterschied zur IPC wird jedoch die bestehende Ischämie durch mehrere kurze Phasen der Reperfusion unterbrochen, da gezeigt werden konnte, dass dies von der Leber besser toleriert wird als eine dauerhafte Ischämie (Belghiti et al. 1999; van Wagenveld et al. 1999). Die zytologischen Anpassungsreaktionen sind beim IC vergleichbar mit der IPC, jedoch liegt der Vorteil dieser Methode darin begründet, dass die intraoperative Ischämiezeit deutlich ausgedehnt werden kann. Da jedoch weder für IPC noch für IC ein Einfluss auf die Morbidität nachgewiesen werden konnte, werden beide Verfahren heutzutage nicht bei der Lebertransplantation angewandt (Gurusamy et al. 2009; Lesurtel et al. 2009; Man et al. 1999).

1.6.2 Gentherapeutische Ansätze

Jüngste Ergebnisse in der Gentherapie haben Anlass zur Hoffnung gegeben, diese Werkzeuge auch für die Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens erfolgversprechend anwenden zu können. So kommen in der Theorie verschiedene Möglichkeiten in Frage. Dazu gehören Manipulation der Keimbahn (beispielsweise durch Oocyteninjektion), Stammzellentransformation mit Rückführung in den Embryo

und das Erreichen von spezifischen Zellen oder Organen, indem Vektoren oder Viren verwendet werden, um ein Gen einzuschleusen. Während die ersten beiden Möglichkeiten keine ethische Akzeptanz in der Bevölkerung gefunden haben, stellt die dritte Möglichkeit durchaus einen therapeutischen Ansatz zur Therapie angeborener und erworbener Krankheiten dar. Bei der Lebertransplantation würde dies jedoch die Präkonditionierung des Spenders mit einem entsprechenden Genprodukt bedeuten. Neben ethischen Problemen ist dabei vor allem entscheidend, dass eine Lebertransplantation zumeist ein akutes Ereignis darstellt (Selzner et al. 2003). Für Leberlebendspenden würde dieses Modell jedoch weiterhin in Betracht kommen.

Ein möglicher Ansatzpunkt der Gentherapie ist beispielsweise die Apoptosekaskade. Hier konnte im Mausmodell sowohl für transgene als auch für Adenovirus-beladene Mäuse gezeigt werden, dass bei einer erhöhten Expression des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2-Proteins, der Ischämie-/Reperfusionsschaden deutlich geringer ausfiel (Bilbao et al. 1999; M Selzner et al. 2002).

Ebenso konnte ein antiapoptotischer Effekt für Bag-1, einem Bcl-2 Bindungsprotein nachgewiesen werden. Darüber hinaus scheint Bag-1 den TNF-Rezeptor R1 in seiner Aktivität einzuschränken, was wiederum den Entzündungsprozess limitiert. So konnten verringerte Entzündungsindikatoren für TNF- α , IL-2, CD25 und Interferon- γ auf Ebene der messenger RNA gezeigt werden (Sawitzki et al. 2002; Selzner et al. 2003; Takayama et al. 1995).

Des Weiteren wurde versucht, die oxidative Stressantwort zu vermindern, indem Proteine wie die mitochondriale und zytosolische Superoxid-Dismutase oder HSP32 angesteuert wurden (Murphy et al. 1991; Zwacka et al. 1998).

1.6.3 Pharmakologische Strategien

Es gibt eine Vielzahl von Pharmaka, die hinsichtlich ihres protektiven Effekts auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden untersucht wurden. Einige davon haben sich nicht nur im experimentellen Modell bewährt, sondern konnten Einzug in den klinischen Alltag finden. So unterschiedlich diese pharmakologischen Strategien auch sind, ist ihnen gemeinsam, dass sie entweder versuchen, einen postoperativen Schädigungsmechanismus positiv zu beeinflussen, oder im Sinne einer Präkonditionierung, ähnlich wie bei den Ansätzen der chirurgischen

Präkonditionierung, ein subletales Stresslevel in den Zellen zu erzeugen, was diese dazu bringt, Schutzmechanismen gegenüber ähnlichem oder gleichem Stress zu entwickeln.

Nachfolgend werden einige Substanzklassen und Pharmaka hinsichtlich ihres protektiven Effekts für den Ischämie-/Reperfusionsschaden dargestellt.

Adenosin-Agonisten und Stickstoffdonatoren

Die Akkumulation von Adenosin während der Ischämie und Reperfusion führt zu einem wirksamen Schutz des entsprechenden Gewebes (Ben-Ari et al. 2005; Parratt 1994). So konnte in der Rattenleber nachgewiesen werden, dass einerseits durch eine Blockade des Adenosinrezeptors A_{2A} und andererseits durch die Metabolisierung von endogenem Adenosin eine Verstärkung des Ischämie-/Reperfusionsschadens resultierte (Peralta et al. 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die von Adenosin erzeugte Protektion auf die Aktivierung der NO-Synthase zurückzuführen ist. Erhöhte Stickstoffspiegel begrenzen den Ischämie-/Reperfusionsschaden an SEC und Hepatozyten erheblich. Infolgedessen bieten sich als Pharmaka sowohl direkte Stickstoffdonatoren wie L-Arginin, NONOate und FK409 an, deren Effekt vor allem für warme Ischämie gezeigt werden konnte, als auch Adenosin-Rezeptor-Agonisten wie beispielsweise GGS-21680 (Selzner et al. 2003).

Antioxidantien

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hat eine entscheidende Bedeutung für die Ausprägung des Ischämie-/Reperfusionsschadens. ROS entstehen hauptsächlich in aktivierten Kupferzellen, jedoch kommt es auch zu einer Freisetzung von ROS aus Hepatozyten, Leukozyten und Monozyten durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1, oder Interferon- γ (Adamson und Billings 1992; Clavien et al. 1993; Jaeschke et al. 1990). Neben der direkten oxidativen Schädigung von RNA und DNA führt vor allem die ROS-bedingte Lipidperoxidation der Zellmembranen zu zellulärer Schädigung. Die resultierende Instabilität und Lyse der mitochondrialen Lipidmembran und die Aktivierung verschiedener Caspasen sind entscheidende Apoptoseinduktoren (Rauen et al. 1999).

Für eine Reihe verschiedener Pharmaka, darunter N-Acetylcystein, α -Tocopherol, Gluthation, Desferroxamin, Ascorbinsäure, Bucillamin, α -Liponsäure, und Idebenine konnte in tierexperimentellen Studien (Duenschede et al. 2007; Seo und Lee 2002) (Amersi et al. 2002; Gondolessi et al. 2002; Park et al. 2003; Schauer et al. 2004; Schutz et al. 1997; Weigand et al. 2001) eine Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens infolge von vermindertem oxidativem Stress nachgewiesen werden, jedoch erhielt keines dieser Medikamente Einzug in die klinische Praxis.

Prostaglandine

Prostaglandine werden hauptsächlich von aktivierten Kupfferzellen während der Reperfusion freigesetzt (Decker 1990). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass sie die hepatische Mikrozirkulation verbessern, die Thrombozytenaggregation hemmen und darüber hinaus einen direkten zytoprotektiven Effekt haben (Araki und Lefer 1980). Diese Wirkung ist bei Prostaglandin E1 und I2 auf eine Hemmung der Radikalfreisetzung aktivierter Leukozyten und eine verminderte Freisetzung von Proteasen zurückzuführen (Fantone und Kinnes 1983; Quiroga und Prieto 1993).

1.7 Grundlage dieser Studie

In vorausgegangenen Studien von Moussavian et al. 2011 und von Heesen et al. 2012, konnte im Ex-vivo-Perfusionsmodell gezeigt werden, dass mit einer Kombination mehrerer Medikamente (MDDP), nämlich Curcumin, Simvastatin, N-Acetylcystein, Erythropoietin, Pentoxiphyllin, Melatonin, Glycin und Methylprednisolon der kalte Ischämie-/Reperfusionsschaden bei Leberexplantaten effektiv, auch bei steatotischen Lebern, reduziert wird. Demzufolge war das Ziel dieser Studie, den Effekt dieser MDDP-Präkonditionierung bei Lebertransplantationen im Rattenmodell in vivo zu analysieren und die Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei Lebertransplantationen mit nicht-steatotischen und steatotischen Lebern im Rattenmodell zu evaluieren. Die von Moussavian et al. 2011 übernommene Vorgehensweise zur MDDP-Präkonditionierung wird in Abschnitt 2.3.1 genau dargestellt. Die von Moussavian et al. 2011 übernommenen Medikamente (Curcumin, Simvastatin, N-Acetylcystein, Erythropoietin, Pentoxiphyllin, Melatonin, Glycin Methylprednisolon) werden im Kapitel „Diskussion“ einzeln vorgestellt und deren protektive Wirkung hinsichtlich einer Minderung des Ischämie-/Reperfusionsschadens diskutiert.

1.8 Hypothesen

1. Mit einer MDDP-Präkonditionierung des Spendertiers wird der Ischämie-/Reperfusionsschaden eines **nicht-steatotischen** Transplantats vermindert.
2. Mit einer MDDP-Präkonditionierung des Spendertiers wird der Ischämie-/Reperfusionsschaden eines **steatotischen** Transplantats vermindert.
3. Eine MDDP-Präkonditionierung des Spendertiers führt zu einer verbesserten Mikrozirkulation des **nicht-steatotischen** Transplantats.
4. Eine MDDP-Präkonditionierung des Spendertiers führt zu einer verbesserten Mikrozirkulation des **steatotischen** Transplantats.

1.9 Studienparameter

1. Ausmaß der Leberschädigung und der Grad der Leberverfettung über die Laborwerte der Transaminasen (AST, ALT), alkalische Phosphatase (AP), Laktatdehydrogenase (LDH), Gamma-Glutamyl-Transferase (γ -GT), Triglyceride, High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL), Bilirubin.
2. Ausmaß der Leberschädigung anhand einer histologischen Beurteilung der transplantierten Lebern mit Auswertung folgender Parameter: Vakuolisierung, Grobscholligkeit, Organintegrität, Nekrose.
3. Beurteilung der Mikrozirkulation mittels intravitaler Mikroskopie mit Auswertung folgender Parameter:
hepatozelluläre Apoptosen, sinusoidales Perfusionsversagen, Leukostase in den Sinusoiden, Leukozytenadhäsion in den postsinusoidalen Venulen, Leukozytenrolling in den postsinusoidalen Venulen.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Sämtliche für diese Studie durchgeführten Tierversuche wurden am 26.02.2013 vor Beginn der Experimente gemäß dem Tierschutzgesetz von der zuständigen Behörde, dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, genehmigt. Das Aktenzeichen für die Genehmigung ist 509.6-42502/3-1. Die Haltung und die Behandlung der Versuchstiere erfolgte nach den nationalen Tierversuchsrichtlinien.

Für sämtliche Experimente wurden männliche syngene Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Versuchstiere wurden bei Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) gekauft. Das Gewicht der insgesamt 340 Versuchstiere betrug 345 ± 50 g, wobei darauf geachtet wurde, dass das Gewicht des Empfängertiers um etwa 10% höher war als das Gewicht des Spendertiers, um die Operation technisch zu erleichtern. Die Versuchstiere mit nicht-steatotischen Lebern wurden zwei Wochen vor der jeweiligen Operation geliefert, damit sich die Tiere an die neue Umgebung gewöhnen konnten und somit das präoperative Stresslevel gering gehalten werden konnte.

Nach ihrer Ankunft wurden die Tiere untersucht und anschließend jeweils vier Tiere pro Käfig in der Tierversuchsabteilung der Universität Göttingen bei einer Raumtemperatur von 22 Grad Celsius und einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser, wobei diesem zwei Tage vor Versuchsbeginn Metamizol zugefügt wurde, um die Versuchstiere an den veränderten Geschmack zu gewöhnen und somit die postoperative Wasseraufnahme zu gewährleisten. Die Versuchstiere für die Experimente mit nicht-steatotischen Lebern erhielten freien Zugang zu Pressfutter (10 mm Pellets, Sniff Special Diet, Soest, Germany). Die Versuchstiere für die Fettleberexperimente wurden vier Wochen vor Versuchsbeginn geliefert, um in diesem Zeitraum eine Verfettung der Leber unter LDC-Diät (Lieber-DeCarlieDiet) (EF Lieber DeCarlie, HF (Regular) for Ethanol application; Purified diet, meal, Sniff Special Diet, Soest, Germany) mit dem Zusatz von Maltodextrin (Maltodextrin 10, Dextroseequivalent 8.0-9.9, Sniff Special Diet, Soest, Germany) zu erreichen.

Aufbereitung und Fütterungsweise der LDC-Diät

Das von der Firma Sniff zubereitete Pulver der LDC-Diät wurde mit Maltodextrin unter der Zugabe von Wasser gelöst und verquirlt. Die flüssige Nahrung wurde anschließend abgefüllt und ggf. maximal bis zu drei Tagen im Kühlschrank aufbewahrt. Die durch die Firma Sniff vorbereiteten und gelieferten Komponenten wurden im Kühlraum des Labors bei 6° C gelagert.

Im Folgenden sind die einzelnen Arbeitsschritte zur Bereitung der LDC-Diät für 1000 Gramm aufgezeigt:

- Abwiegen der Spezialnahrungskomponenten mittels Präzisionswaage (NAME®, Sartorius AG, Göttingen, Germany)
 1. 132,18 g LDC-Pulver (EF Lieber DeCarlie, HF (Regular) for Ethanol application; Purified diet, meal, Sniff Special Diet, Soest, Germany)
 2. 89,6 g Maltodextrin (Maltodextrin 10, Dextrose equivalent 8.0-9.9, Sniff Special Diet, Soest, Germany)
- Abmessen der Wassermenge mittels Messzylinder
778,22 ml Wasser
- Zusammenfügen der abgemessenen Komponenten und Herstellung einer dickflüssigen Lösung unter Einsatz eines handelsüblichen Handmixers.
- Abfüllen der fertigen Nahrung in Aufbewahrungsgefäße, ggf. direkte Fütterung im Tierstall bzw. Lagerung bei 5-7° C im Kühlschrank.

Die flüssige Nahrung wurde täglich zwischen 9.00 und 11.00 Uhr in Laborschalen (Contactoschalen B6®, Medchrom, Heidelberg, Germany) gefüllt und den Tieren in den Käfig gestellt. Die Futtermenge pro Tier wurde mit ca. 100-120 ml täglich veranschlagt, wobei den Tieren die LDC-Diät ad libitum angeboten wurde. (Alwahsh et al. 2014b; Alwahsh et al. 2014a).

2.2 Versuchsgruppen

Die 340 Versuchstiere wurden in 20 Gruppen eingeteilt. Es wurden 162 Lebertransplantationen durchgeführt. Die kalte Ischämie Zeit betrug bei sämtlichen Versuchen 8 Stunden. Von den 162 transplantierten Tieren haben 118 den jeweils festgelegten Studienendpunkt erreicht.

Der Studienendpunkt wurde dabei, abhängig von der jeweiligen Gruppe, auf eine Überlebensdauer von einem Tag, drei Tagen, fünf Tagen und sieben Tagen nach der Transplantation festgelegt.

Transplantatgruppen (Gruppe 1-16)

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die Verteilung der 118 transplantierten Versuchstiere auf 16 Transplantat-Versuchsgruppen (Gruppe 1-16). Dabei zeigt (n) die Anzahl der Versuchstiere für die jeweilige Versuchsgruppe an. **Abb. 1a** bezieht sich dabei auf die Versuchstiere mit nicht-steatotischen Lebern, **Abb. 1b** auf die Versuchstiere mit steatotischen Lebern.

Baseline (Gruppe 17-20)

Zusätzlich zu den transplantierten Versuchstieren wurden vier Gruppen mit jeweils vier Tieren für einen Referenzwert (Gruppe 17-20) gebildet. Bei diesen Baseline-Gruppen erfolgte die Blutentnahme vor der Leberexplantation. Die Leberpräparate wurden nach der Explantation acht Stunden kalter Ischämie ausgesetzt, bevor sie für die histologische Beurteilung fixiert wurden.

Versuchstiere mit **nicht-steatotischen** Lebern:

	Anzahl der Tiere (n)				
Studienende	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	baseline
Control	n=11	n=7	n=9	n=7	n=4
	Gruppe 1	Gruppe 3	Gruppe 5	Gruppe 7	Gruppe 17
MDDP	n=12	n=7	n=10	n=7	n=4
	Gruppe 2	Gruppe 4	Gruppe 6	Gruppe 8	Gruppe 18

Abb. 1a: Verteilung der transplantierten **nicht-steatotischen** Versuchstiere auf die Versuchsgruppen (Gruppe 1-8).

Control: Diese Versuchstiere (Gruppe 1,3,5,7) erhielten vor der Transplantation keine Medikamente.

MDDP: Diese Versuchstiere (Gruppe 2,4,6,8) erhielten eine MDDP-Präkonditionierung gemäß dem Versuchsprotokoll (2.3.1).

Der Studienendpunkt wurde vor der Transplantation auf einen Tag, (Gruppe 1+2), drei Tage (Gruppe 3+4), fünf Tage (Gruppe 5+6), sieben Tage (Gruppe 7+8) festgelegt.

Gruppe 17+18 bilden die Referenzgruppe (baseline).

Versuchstiere mit **steatotischen** Lebern:

	Anzahl der Tiere (n)				
Studienende	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	baseline
Control	n=13	n=5	n=3	n=2	n=4
	Gruppe 9	Gruppe 11	Gruppe 13	Gruppe 15	Gruppe 19
MDDP	n=14	n=5	n=3	n=3	n=4
	Gruppe 10	Gruppe 12	Gruppe 14	Gruppe 16	Gruppe 20

Abb. 1b: Verteilung der transplantierten **steatotischen** Versuchstiere auf die Versuchsgruppen (Gruppe 9-16).

Control: Diese Versuchstiere (Gruppe 9,11,13,15) erhielten vor der Transplantation keine Medikamente.

MDDP: Diese Versuchstiere (Gruppe 10,12,14,16) erhielten eine MDDP-Präkonditionierung gemäß dem Versuchsprotokoll (2.3.1).

Der Studienendpunkt wurde vor der Transplantation auf einen Tag, (Gruppe 1+2), drei Tage (Gruppe 3+4), fünf Tage (Gruppe 5+6), sieben Tage (Gruppe 7+8) festgelegt.

Gruppe 19+20 bilden die Referenzgruppe (baseline).

2.3 MDDP (*multi drug donor preconditioning*)

	Wirkstoff	Handelsname	Dosierung	Teilportion	Körpergewicht Spendertier	benötigtes Volumen
			mg/kg	mg/ml	300	ml
i.g.	Curcumin	Curcumin	50	10	15	1,500
	Simvastatin	Simvastatin	5	4	1,5	0,375
i.p.	N-Acetylcystein	Fluimucil	150	200	45	0,225
	Erythropoietin	EPO	3000	4000	900	0,225
	Pentoxiphyllin	Trental	50	20	15	0,750
	Melatonin	Melatonin	10	8	3	0,375
i.v.	Glycin	Glycin	100	80	30	0,375
	Methylprednisolon	Urbason	5	4	1,5	0,375

Abb. 2: Die Tabelle zeigt beispielhaft den Applikationsort und die gewichtsadaptierte Dosierung der verwendeten Medikamente für ein Spendertier mit 300g Körpergewicht.

i.g.: intragastral; i.p.: intraperitoneal; i.v.: intravenös

Der exakte Zeitpunkt sowie die exakte Durchführung der Applikation der MDDP-Pharmaka wird im folgenden Abschnitt dargestellt.

2.4 Mikrochirurgische Technik der Lebertransplantation

2.4.1 Spenderoperation, Explantation

Der Arbeitsplatz war mit einem Mikroskop für mikrochirurgische Operationen ausgestattet. Eine eisgefüllte Thermoschale zur Kühlung der explantierten Lebern sowie die Medikamente für die Präkonditionierung wurden vor Beginn der Operation vorbereitet. Zunächst wurden die Versuchstiere am Bauch rasiert.

Die Anästhesie erfolgte bei sämtlichen operativen Eingriffen unter Inhalationsnarkose mit Sevofluran (Sevorane®, AbbVie Deutschland GmbH, Ludwigshafen) und 1,5 l/min Sauerstoff. Die Versuchstiere wurden für die Einleitung der Narkose in einen Käfig aus Plexiglas gesetzt, dieser war mit einer Öffnung für die Narkosegaszufuhr, sowie mit einem Luftfilter ausgestattet. Für die Narkose wurde ein stufenlos regulierbarer Verdampfer (Vapor® 2000, Dräger, Lübeck) verwendet.

Die Einleitung der Narkose erfolgte unter 1,5 l/min Sauerstoff und 4% Vol Sevofluran. Nach Einsetzen einer ausreichend tiefen Narkose wurde das Versuchstier in Rückenlage an den Extremitäten mit Pflasterstreifen auf dem Operationstisch fixiert. Aus hygienischen Gründen wurde zusätzlich eine Unterlage (MoliNea® 60 cm x 90 cm, Hartmann, Heidenheim) verwendet. Um die Narkose während der Operation

aufrecht zu erhalten, wurde der Kopf des Versuchstiers in einer Kunststoffröhre (Durchmesser ca. 3 cm) platziert, diese war über einen Absaugkatheter mit dem Narkosegasverdampfer verbunden, um das Gas kontinuierlich im Sinne einer Narkosemaske zuzuführen. Nach der Einleitung wurde die Dosis auf 2% Vol reduziert und die Wirksamkeit der Narkose durch Druck mit einer Pinzette auf die Zehenzwischenräume des Versuchstiers überprüft, wobei die Dosis gegebenenfalls erneut angepasst werden musste. Im Anschluss daran erfolgte die Desinfektion der Operationsfläche des Versuchstiers mit Hautdesinfektionsmittel (kodan®, Tinktur forte farblos, Schülke & Mayr, Zürich) getränkten Kompressen.

Sämtliche Operationen erfolgten in sauberer, nicht steriler Umgebung mit mikrochirurgischen Instrumenten. Die Ligaturen erfolgten mit (Seide 6/0 nicht resorbierbar, geflochten, RESORBA, Nürnberg).

Zu Beginn wurden bei den MDDP-Spendertieren für die Präkonditionierung gewichtsadaptiert zunächst N-ACC, Erythropoietin, Pentoxiphyllin und Melatonin intraperitoneal, danach Glycin und Methylprednisolon in die V. dorsalis penis injiziert.

Die Schnittführung begann mit der Eröffnung des Abdomens mittels medianer Laparotomie vom Bereich der Symphyse bis zum Xiphoid. Daran anschließend wurde das Operationsgebiet beidseits durch laterale Schnitte entlang des Rippenbogens erweitert. Die Bauchwandlappen wurden mit Klemmen seitwärts gezogen, und mit Kanülen (20G Sterican®, B.Braun, Melsungen) am Operationstisch fixiert. Das Xiphoid, von einer Klemme gehalten, wurde nach cranial umgeschlagen, und ebenfalls am Operationstisch fixiert. Im Ergebnis war das Operationsgebiet nun in maximaler Weite einsehbar.

Bei den MDDP-Versuchstieren erfolgte nun die Injektion von Curcumin und Simvastatin, ebenfalls gewichtsadaptiert, in den Magen. Daran anschließend wurde der Darm mit einem stumpfen Wattestäbchen mobilisiert, mit einer NaCl-0,9 %-getränkten Kompresse umwickelt und auf die rechte Seite neben das Versuchstier gelegt.

Im Anschluss daran wurde das Lig. falciforme bis zur suprahepatischen V. cava inferior durchtrennt und die V. infradiaphragmatica sinistra ligiert. Unter stumpfer Präparation erfolgte die Darstellung des Ductus choledochus. Aus einer Venenverweilkanüle 22G (Vasofix® Braunüle®, B.Braun, Melsungen) wurde ein ca. 4 mm langer Stent

hergestellt, dieser wurde beidseitig schräg angespitzt und über eine Inzision in den Ductus choledochus etwa 2 mm weit eingeführt und fixiert. Nun wurde die V. splenica nach doppelter Ligatur nahe ihrer Einmündung in die V. portae durchtrennt. Des Weiteren wurden die subhepatische V. cava inferior sowie die V. renalis dextra unter stumpfer Präparation vom umliegenden Gewebe separiert, um schließlich die V. renalis dextra sowie die V. suprarenalis dextra ligieren zu können.

Daran anschließend wurden 300 Einheiten Heparin (Heparin-Natrium, ROTEXMEDICA, Trittau) über die V. dorsalis penis infundiert und eine Klemme direkt proximal der iliakalen Bifurkation der Aorta sowie eine weitere Klemme subhepatisch an der Aorta angebracht. Die Aorta konnte nun direkt proximal der iliakalen Klemme inzidiert und mit HTK-Lösung (Custodiol® ,Dr. F. Köhler Chemie GmbH, Bensheim) 4° C perfundiert werden. Für die Perfusion wurde eine auf eine Perfusorenpritze aufgesteckte Venenverweilkanüle 18G (Vasofix® Braunüle®, B.Braun, Melsungen) verwendet. Unter vorsichtiger Perfusion wurde nun die V. cava inferior cranial ihrer renalen Zuflüsse durchtrennt. Insgesamt wurden 20 ml HTK-Lösung infundiert. Das freie Blut im Bauchraum wurde währenddessen von Bauchtüchern aufgenommen. Daran anschließend wurde das Diaphragma mit einer Schere durchtrennt, um den Tod des Versuchstiers mit einem Herzschnitt herbeizuführen. Nach Todeseintritt wurde die Narkose beendet. Darauf folgte die Absetzung der V. cava inferior zwischen Leber und Diaphragma sowie der V. renalis dextra. Erneut wurden 10 ml HTK-Lösung über den bestehenden Zugang infundiert. Schließlich wurden V. portae, A. hepatica sowie der Truncus coeliacus möglichst leberfern abgesetzt, um die Gefäßstümpfe für die spätere Anastomisierung nutzen zu können. Infolgedessen konnte die Leber vollständig entnommen und in einer mit HTK-Lösung gefüllten Schale im Kühlschrank bei 4° C über einen Zeitraum von 8 Stunden gelagert werden.

2.4.2 Empfängeroperation, Implantation

Ex-situ-Präparation der Transplantatleber

Zu Beginn musste das Transplantat für die Implantation vorbereitet werden, dazu wurde es in einer Glasschale auf Eis in HTK eingebettet. Zunächst erfolgte die Herstellung eines Plastikstents, um die spätere Anastomose der infrahepatischen V. cava inferior und der V. portae zu ermöglichen. Dazu wurde aus einem Venenverweilkatheter (Angiocath 12G, BD, Mexico) ein etwa 5 mm langer Plastikring abgeschnitten. Dieser Ring wurde nun zirkulär mit einer Klemme eingedrückt, um ein Profil für die spätere Fixierung mit einem Faden zu schaffen. Schließlich wurde der Plastikring, einen Winkel von 30° einschließend, an zwei Stellen etwa 2 mm weit inzidiert. Zwischen den Inzisionen wurde das Plastik abgeschnitten. Der dadurch entstandene Span wurde stehengelassen, um den Stent später mit einer Klemme halten zu können und somit die Handhabung möglich zu machen.

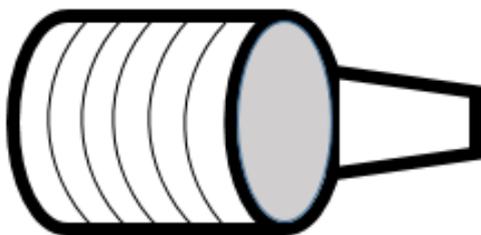


Abb. 3:

Links: Schemazeichnung des Plastikstents. Als Matrizie diente ein Venenverweilkatheter (Angiocath 12G).

Rechts: Das Foto zeigt die Fixierung des Plastikstents an der V. cava inferior der Transplantatleber.

An der subhepatischen V. cava inferior des Transplantats wurde nun eine Klemme lebernah angebracht und deren Stumpf durch den Splint gezogen, zirkulär über dessen Rand gestülpt und schließlich mit einem Faden am Stent fixiert. Ein Abrutschen des Fadens wurde auf Grund des zuvor geschaffenen Profils des Stents verhindert. Dasselbe Verfahren wurde auch bei der V. portae angewendet.

Die subhepatische V. cava inferior sowie die V. portae des Transplantats wurden mit jeweils 10 ml NaCl 0,9% vorsichtig perfundiert. Zur Perfusion diente eine Perfusorspritze mit einer aufgesteckten Venenverweilkanüle. Schließlich wurde die

suprahepatische V. cava inferior des Transplantats rechts und links lateral mit einem Faden (Prolene® 7-0 nicht resorbierbar, ETHICON, Norderstedt) für die spätere Gefäßnaht durchstoßen. Damit war die Vorbereitung des Transplantats abgeschlossen.

Transplantation

Die Schnittführung begann mit medianer Laparotomie von der Symphyse bis zum Xiphoid, allerdings wurde diese, im Gegensatz zur Spenderoperation, nicht lateral erweitert. Stattdessen wurde ein eigens dafür angepasster Haltehaken verwendet, um die Bauchwandlappen seitwärts zu ziehen und die Operationsfläche zu spreizen. Die Haltehaken wurden über ein Gummiband am Operationstisch fixiert. Das Xiphoid wurde, von einer Klemme gehalten, nach cranial umgeschlagen. Die Klemme wurde ebenfalls mit Kanülen im Operationstisch fixiert.

Unter stumpfer Präparation mit einem Wattestäbchen wurden die Bauchorgane mobilisiert, der Darm wurde in eine NaCl-0,9 %-getränkte Kompresse gewickelt und rechts neben das Versuchstier gelegt.

Im Anschluss daran wurde das Lig. falciforme bis zur suprahepatischen V. cava inferior durchtrennt und die V. infradiaphragmatica sinistra ligiert. Weiterhin wurden die subhepatische V. cava inferior sowie die V. portae vom umgebenden Fettgewebe separiert und dargestellt.

Die A. hepatica propria sowie die A. gastroduodenalis wurde unterfahren, doppelt ligiert und durchtrennt. Weiterhin wurde die V. suprarenalis dextra und der Ductus choledochus ligiert und proximal der Ligatur durchtrennt. Die Leber wurde nun vollständig mobilisiert, indem Bänder und Verwachsungen gelöst wurden. Anschließend wurden 10 Einheiten Heparin sowie 4 ml NaCl 0,9% im Sinne eines Volumenersatzes in die V. dorsalis penis infundiert.

Am Versuchstier wurde jetzt die suprahepatische V. cava inferior von einer Gummischlinge unterfahren. Als Gummischlinge diente ein etwa 3 mm breiter Streifen, der zuvor aus dem Saum eines handelsüblichen Einmalhandschuhs gefertigt worden war.

Die infrahepatische V. cava inferior wurde nun cranial der V. renalis abgeklemmt. Im Anschluss daran wurde auch die V. portae abgeklemmt. Dies markierte den Zeitpunkt für den Start der Messung der anhepatischen Zeit. Da währenddessen keine hepatische Metabolisierung des Narkosegases mehr stattfand und das Herzzeitvolumen stark erniedrigt war, wurde die Narkose für die Dauer der anhepatischen Zeit auf 0,5% Vol reduziert.

Die suprahepatische V. cava inferior wurde unter Mitnahme eines schmalen diaphragmatischen Saumes abgeklemmt.

Schließlich wurden die suprahepatische und infrahepatische V. cava inferior, sowie die V. portae möglichst lebernah durchtrennt, wobei die zuvor an der suprahepatischen V. cava angebrachte Gummischlinge der Mobilisation der Leber dienlich war. Die Leber konnte anschließend vollständig entnommen werden.

Das Transplantat wurde jetzt anatomiegerecht im Versuchstier platziert und zunächst die Gefäßnaht, unter Verwendung der bereits am Transplantat angebrachten Fäden, in Form einer „knotenlosen Naht“ der suprahepatischen V. cava inferior, vollzogen. Vor endgültigem Verschluss der Naht wurde NaCl 0,9% über eine Venenverweilkanüle 18G im Bereich der Naht in die V. cava inferior unter leichter Kompression der Leber infundiert, um eine Luftleere der Vene zu erreichen und eine mögliche Luftembolie zu vermeiden. Bei sicherer Luftleere der Vene konnte die Naht schließlich verschlossen werden.

Etwa 6 mm proximal der bereits vorhandenen Klemme wurde jetzt eine zweite Klemme an der V. portae angebracht, um diese zwischen den Klemmen inzidieren zu können. Nun wurde der Stent, welcher zuvor an der infrahepatischen V. cava inferior des Transplantats fixiert worden war gefasst, in die geschaffene Inzision geführt und schließlich mit einem Faden fixiert. Dieser Vorgang fand unter Betropfen der Inzisionsstelle mit NaCl 0,9 % aus einer Perfusorenspritze statt, um eine Luftembolie zu vermeiden. Mit dem Öffnen der beiden Klemmen an der V. portae war die anhepatische Zeit beendet, und die Narkose wurde wieder auf die Ausgangsdosis von 2% Vol erhöht. Anschließend wurde auf die gleiche Weise auch die infrahepatische V. cava inferior mit Hilfe des Splints anastomosiert und die Klemme geöffnet. Die Offenheit der geschaffenen Anastomosen wurde durch den Farbumschlag der jetzt durchbluteten Leber ersichtlich.

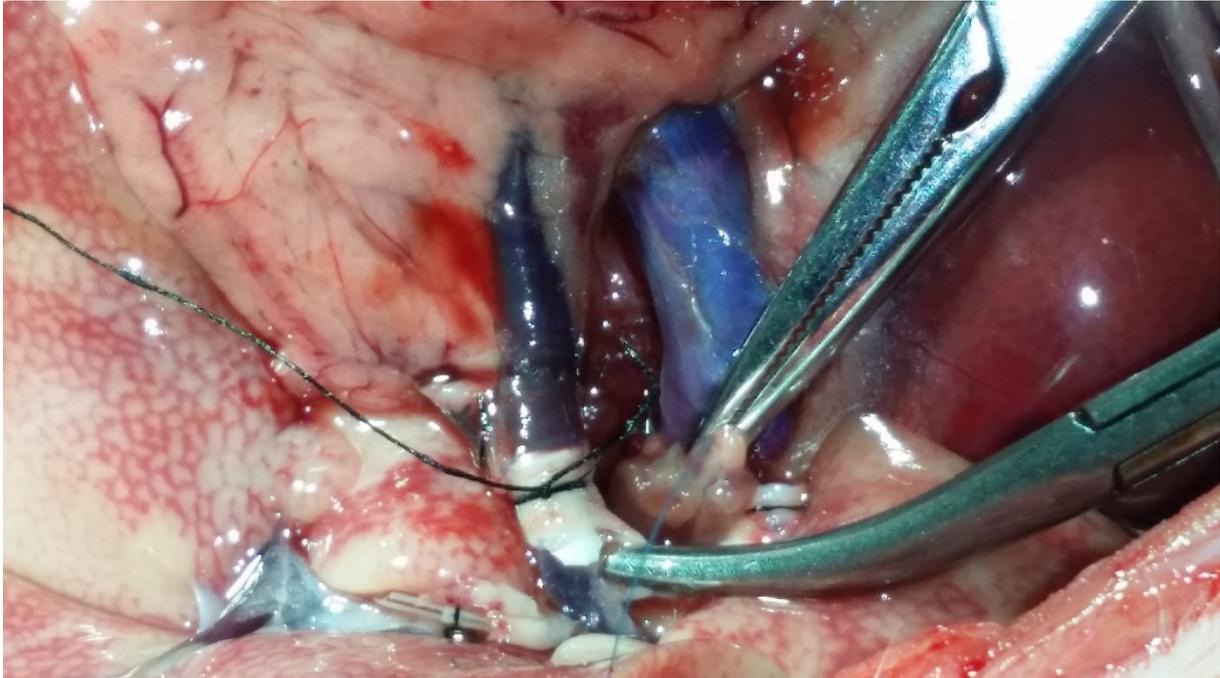


Abb. 4: Das Foto zeigt die suffiziente Anastomose der V. portae. Am linken Bildrand ist die beginnende Reperfusion der Leber mit einem Farbumschlag direkt nach dem Öffnen der Klemme zu erkennen.

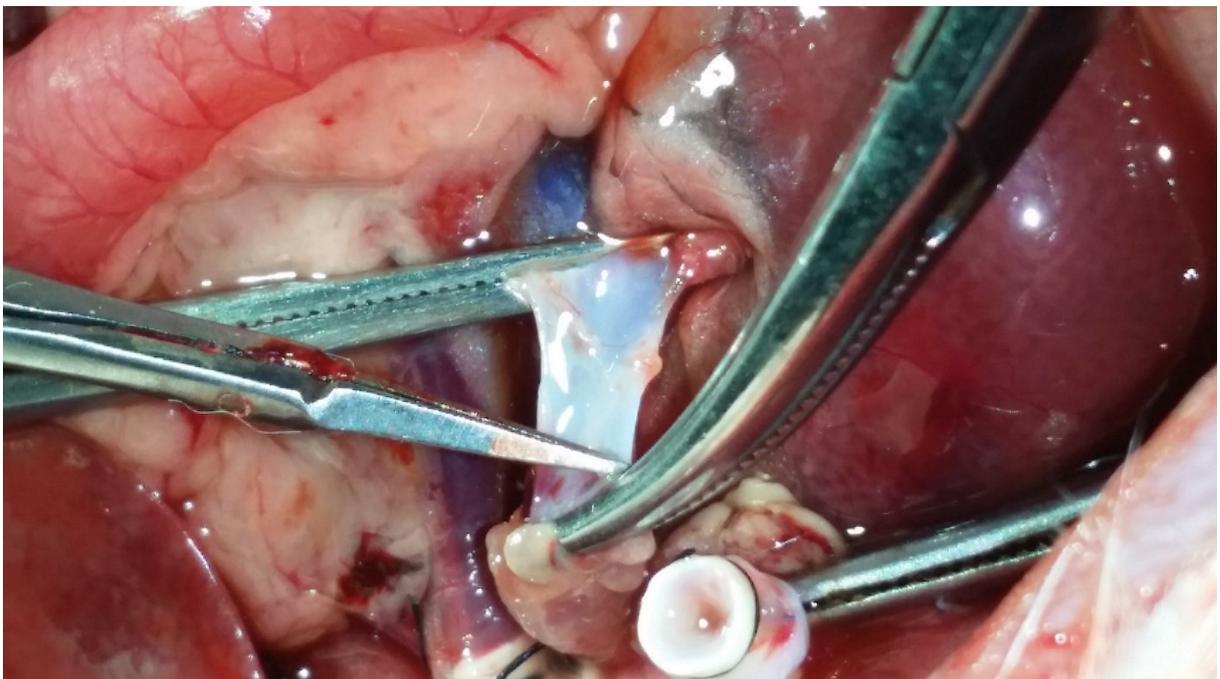


Abb. 5: Die infrahepatische V. cava inferior wird für die Inzision vorbereitet. Der Plastikstent (unten im Foto) kann daraufhin in die Inzision eingeführt und fixiert werden.

Der Bauchraum des Versuchstiers wurde nun mehrmals mit auf 37° C erwärmtem NaCl 0,9% gespült, um das Versuchstier wieder zu erwärmen und eventuelle Blutkoagel auszuspülen.

Die A. hepatica wurde anschließend mit einer Gefäßnaht (Prolene® 7-0 nicht resorbierbar, ETHICON, Norderstedt) anastomosiert. Der zuvor am Transplantat im Ductus choledochus fixierte Stent wurde nun zur Hälfte in den Ductus choledochus des Empfängertiers eingeführt und die entstandene Anastomose mit einem Faden fixiert.

Erneut wurde der Bauchraum mit warmen Wasser gespült und sämtliche Nähte überprüft. Daraufhin erfolgte die Injektion von 0,5 ml Bicarbonat 8,4% (NATRIUMHYDROGENCARBONAT 8,4%, Braun, Melsungen) und 1,5 ml NaCl 0,9% in die V. dorsalis penis, um die während der Operation entstandene Azidose auszugleichen.

Es folgte die Naht der Bauchmuskulatur und die Hautnaht mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 2-0, ETHICON, Norderstedt). Abschließend wurde die Narkose beendet, die Fixierung der Extremitäten gelöst und das Versuchstier in einen Einzelkäfig unter eine Wärmelampe gelegt.

2.5 Gewebeentnahme und Fixierung

Nach Erreichen des individuellen Studienendpunktes von einem, drei, fünf oder sieben Tagen nach der Transplantation wurden die Versuchstiere für die Organentnahme vorbereitet. Die Ausstattung des Arbeitsplatzes und die Einleitung der Narkose entsprachen dabei dem Vorgehen der Spender- und Empfängeroperation. Jedoch wurde für die Aufrechterhaltung der Narkose ein höherer Fluss des Narkosegases von 5 l/min gewählt, um eine tiefe Narkose bei der Organentnahme zu gewährleisten.

Zunächst wurde das Abdomen unter medianer Schnittführung entlang der Transplantationsnarbe eröffnet. Unter stumpfer Präparation der subhepatischen V. cava inferior mit einem Wattestäbchen wurde diese für die anschließende Blutentnahme präpariert. Mit einer Kanüle (25G Sterican®, BRAUN, Melsungen) wurde die maximal mögliche Blutmenge (8-12 ml, abhängig vom Gewicht des Versuchstiers) entnommen. Daran anschließend wurde die Leber entnommen.

Das Blut wurde in heparinisierte Monovetten gefüllt, um anschließend zentrifugiert zu werden. Nach der Zentrifugation (10 min, 22°C, 3000 rpm) wurde das Plasma in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80° C konserviert.

Die entnommene Leber wurde in Würfel mit einer Kantenlänge von etwa 3 mm geschnitten, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend ebenfalls bei -80° C konserviert.

2.5.1 Herstellung der Gewebeschnitte, HE-Färbung

Für die Herstellung der Gewebeschnitte wurde jeweils ein zentraler Würfel des Lobus caudatus inferior bei der Organentnahme in 4%-igem gepufferten Formalin für 24 Stunden fixiert. Diese Gewebewürfel mit einer Kantenlänge von 0,5 cm durchliefen anschließend für die Entwässerung eine aufsteigende Ethanolreihe sowie ein Xylolbad in einem vollautomatischen Einbetteautomaten (Histokinette). Nachdem dieser Durchlauf in 56° C warmem Paraplast geendet hatte, konnten die Gewebeblöcke mit Paraffin in Kassetten eingebettet werden und schließlich mit einem Rotationsmikrotom in Sektionen von 5 µm Dicke geschnitten werden.

Anschließend wurden diese Schnitte auf Objektträger (Super Frost Plus, Microm, Walldorf) aufgebracht und 12 Stunden in einem Wärmeschrank bei 37° C getrocknet. Dabei wurde das Paraffin abgeschmolzen und die Gewebeschnitte für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung vorbereitet. Diese erfolgte an einem Stainix-Färbeautomaten nach folgendem Protokoll:

1. Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe: 100 % EtOH (2 min) 80 % EtOH (2 min)
2. Spülen mit dH₂O (2 min) 3. Anfärben mit Meyers Hämalaun (4 min)
4. Spülen mit dH₂O (1 min) 5. Bläuen mit fließendem Leitungswasser (15 min)
6. Anfärben mit Eosin (7 min) 7. Spülen mit dH₂O (1 min)
8. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe: 80 % EtOH (1 min) 100 % EtOH (1 min) 100 % EtOH (2 min) 9. Xylol (3 min)

Bläuen: Farbumschlag der zuvor durch Hämatoxylin rötlich-braun gefärbten Zellkerne in das typische blau-violett durch Erhöhung des pH-Wertes mittels Spülung mit fließendem Leitungswasser.

2.6 Histologische Auswertung

Für die histologische Analyse wurde ein Durchlichtmikroskop (Olympus BX43) mit aufgesetzter Kamera (Olympus DP21) verwendet.

Aufgrund der Betrachtung des Leberläppchens als funktionelle Einheit nach Rappaport wurde dieses - für die histologische Auswertung von Vakuolisierung, Grobscholligkeit, Gewebeintegrität und Apoptosen - in eine perizentrale, mittzonale und periportale Zone aufgeteilt. Das Präparat wurde unter vierhundertfacher Vergrößerung meanderförmig begutachtet. Von jeder Zone wurde ein Foto gemacht, das als Referenzfeld (*high-power field*) der Größe $190\ \mu\text{m} \times 250\ \mu\text{m}$ für die Auswertung diente. Dieses Vorgehen wurde an fünf repräsentativen Leberläppchen pro Präparat wiederholt, sodass schließlich 15 *high-power fields* pro Präparat entstanden, die anschließend anhand eines semiquantitativen Scores ausgewertet wurden.

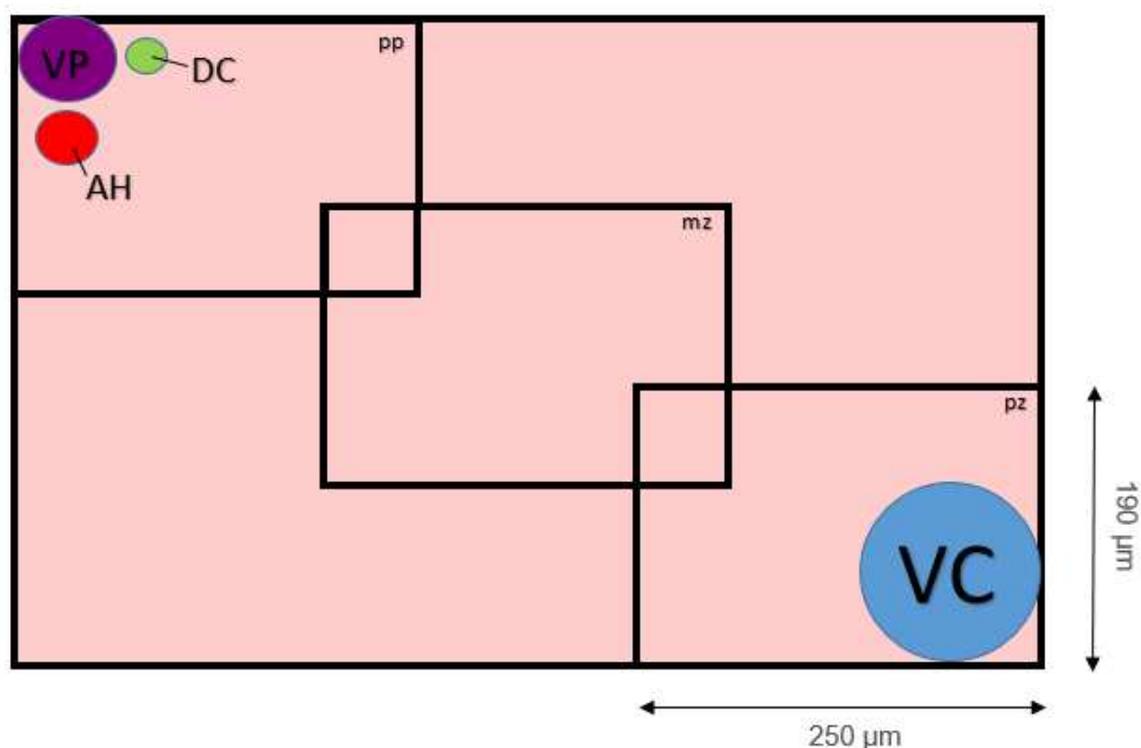


Abb. 6: Die Schemazeichnung zeigt die Aufteilung eines Leberläppchens in funktionelle Zonen nach Rappaport. Links oben: pp=Periportalzone; Zentral: mz=Mittelzone; Rechts unten: pz=Perizentralzone
VP=Vena portae, DC=Ductus choledochus, VC=Vena centralis
Rechts unten ist der Maßstab für ein high-power-field aufgetragen.

Vakuolisierung

Für die Auswertung der Vakuolisierung wurde dem Anteil der vakuolisierten Zellen pro high-power-field semiquantitativ ein Zahlenwert zwischen 1 und 5 zugeordnet:

0-20%	1
20-40%	2
40-60%	3
60-80%	4
80-100%	5

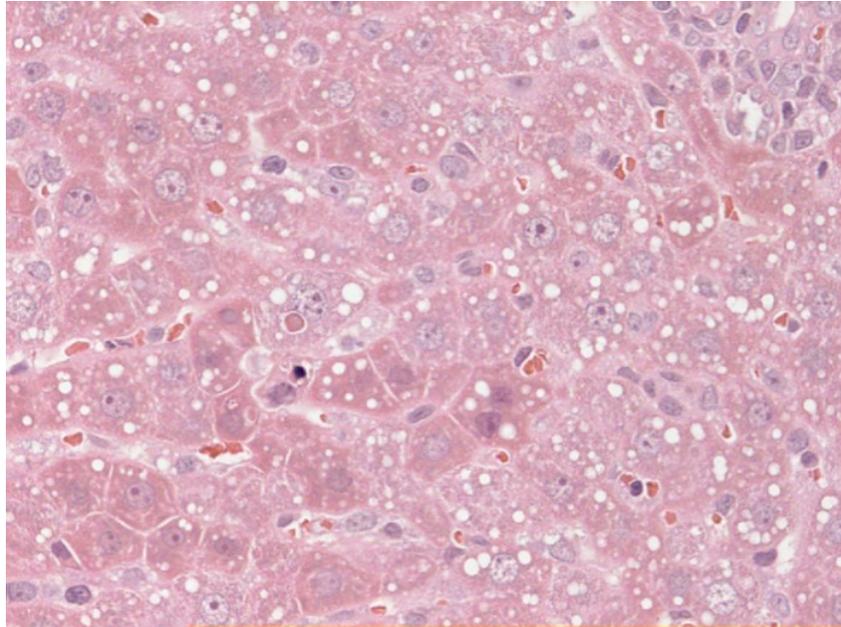


Abb. 7a: Das Foto zeigt ein high-power field aus der Periportalzone. Rechts oben im Foto erkennt man die Gefäßtrias bestehend aus Portalvenenast, Gallengang und arteriellem Gefäß aus der A. hepatica propria. Nahezu alle Hepatozyten sind stark vakuolisiert. Zahlenwert=5

0-20%	1
20-40%	2
40-60%	3
60-80%	4
80-100%	5

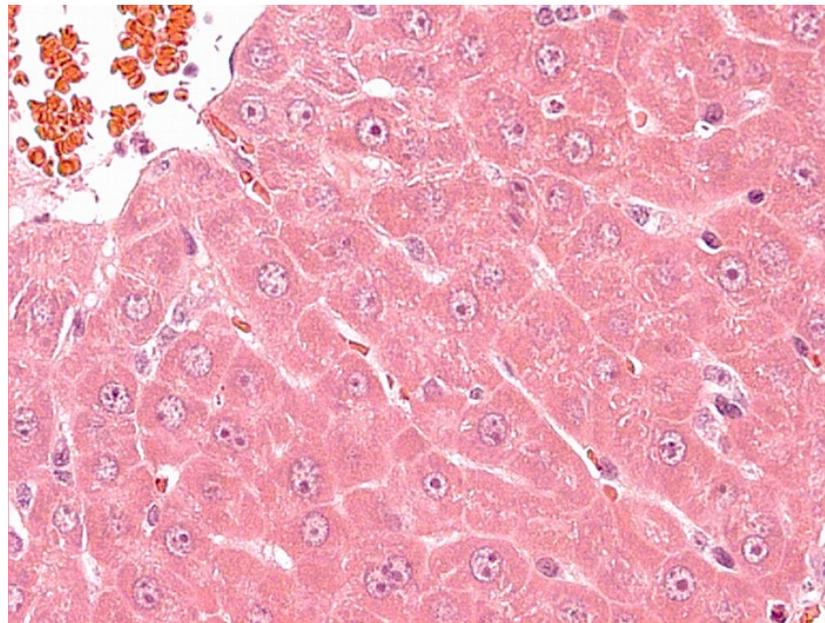


Abb. 7b: Das Foto zeigt ein high-power field aus der Perizentralzone. Links oben im Foto erkennt man die Zentralvene des Leberläppchens. Es finden sich wenig vakuolisierte Hepatozyten. Zahlenwert=1

Grobscholligkeit

Für die Auswertung der Grobscholligkeit wurde dem prozentualen Anteil der grobscholligen Zellen eines high-power-fields semiquantitativ ein Zahlenwert von 1 bis 5 zugeordnet.

0-20%	1
20-40%	2
40-60%	3
60-80%	4
80-100%	5

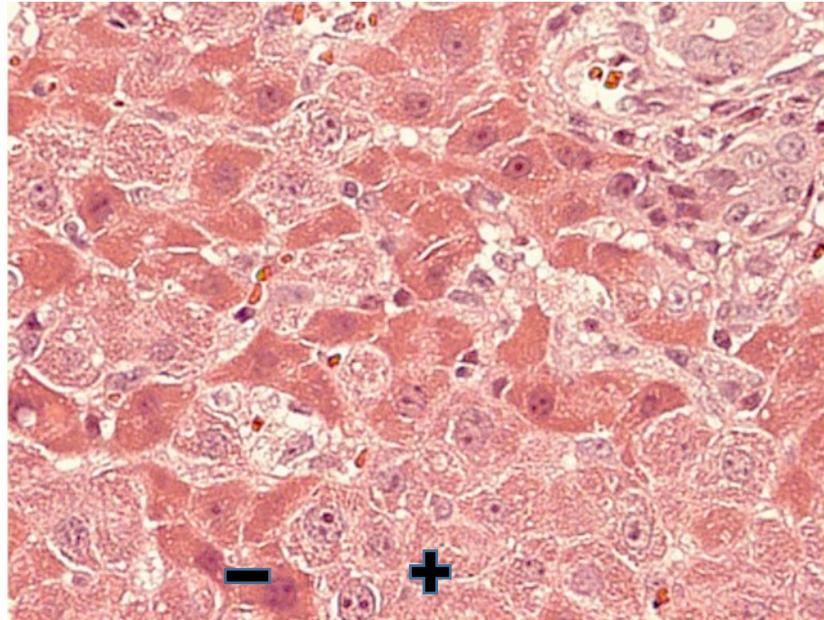


Abb. 8: Das Foto zeigt ein high-power field aus der Periportalzone. Rechts oben im Foto erkennt man die Gefäßtrias aus Portalvenenast, Gallengang und arteriellem Gefäß aus der A. hepatica propria. Stark grobschollige Hepatozyten (+) lassen sich von weniger grobscholligen Hepatozyten (-) anhand der Farbstoffaufnahme differenzieren.

Nekrosen

Für die Auswertung der Nekrosen wurde das gesamte Präparat unter vierhundertfacher Vergrößerung meanderförmig durchsucht und schließlich dem gesamten Gewebeschnitt gemäß dem prozentualen Anteil der Nekrosen ein semiquantitativer Zahlenwert von 1 bis 5 zugeordnet:

0%	1
1-5%	2
5-20%	3
20-50%	4
>50%	5

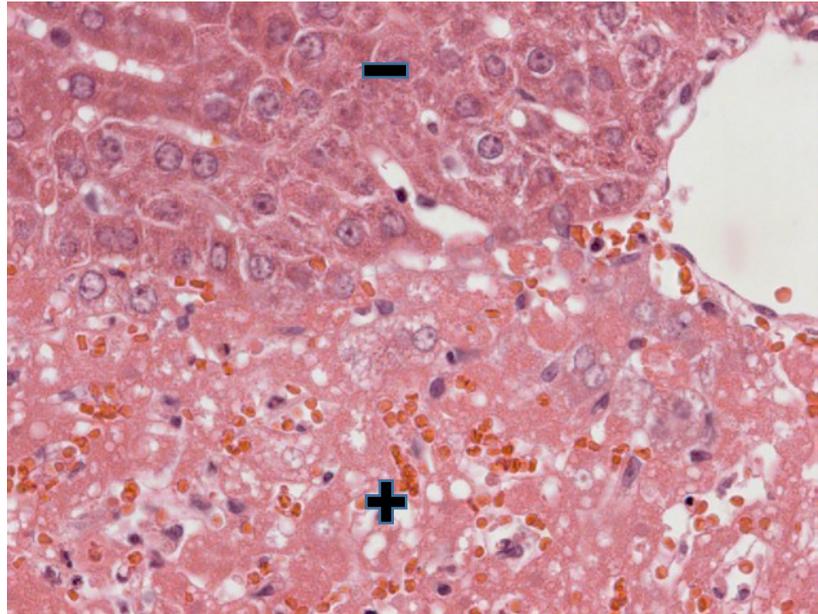


Abb. 9: Das Foto zeigt ein high-power field aus der Perizentralzone. Rechts oben im Foto erkennt man die Zentralvene. In der oberen Bildhälfte sind intakte Hepatozyten (-) und eine histologisch intakte Gewebestruktur zu sehen. Die untere Bildhälfte zeigt ein nekrotisches Areal (+) innerhalb eines Leberläppchens. Zellgrenzen sind nicht mehr zu differenzieren, zusätzlich sind Kernfragmente sichtbar.

Gewebeintegrität

Für die Auswertung der Gewebeintegrität wurde anhand der folgenden Parameter ein Gesamteindruck des Gewebeschnitts erstellt:

- Differenzierung von Zellgrenzen
- Erkennen des funktionellen Aufbaus eines Leberläppchens mit Zentralvene und Portalvene
- Abgrenzbarkeit von Nucleus und Zytoplasma
- Intaktheit der Sinusoide
- Korrelation von entzündlicher Proliferation zu intakten Hepatozyten

Diesem Gesamteindruck wurde ebenfalls anhand eines semiquantitativen Scores ein Zahlenwert zwischen 1 und 5 zugeordnet.

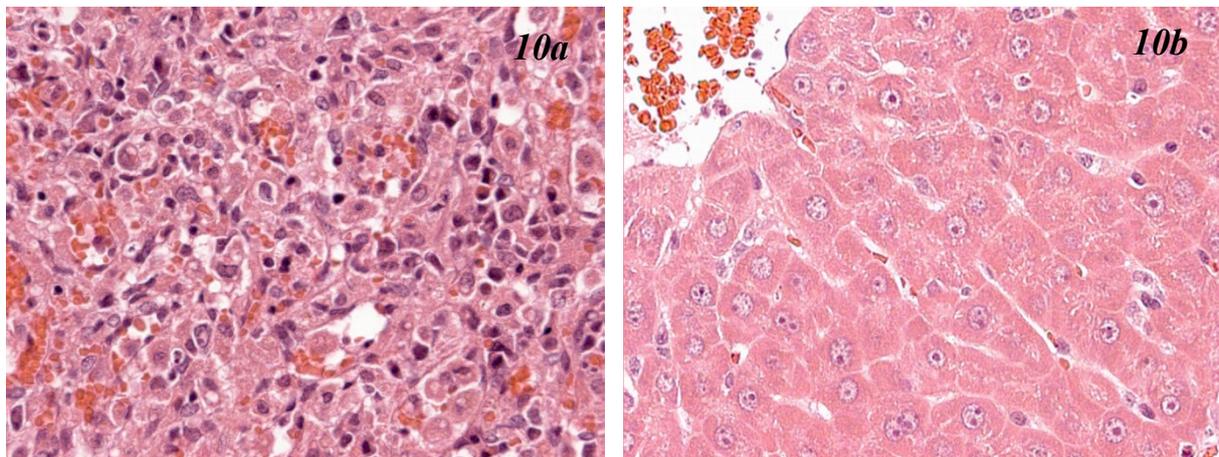


Abb. 10a: Das Foto zeigt ein high-power field aus der Mittelzone. Eine histologisch intakte Gewebestruktur mit abgrenzbaren Zellgrenzen und Sinusoiden ist nicht mehr zu erkennen. Es finden sich Zelltrümmer und entzündliche Proliferation.

Abb. 10b: Das Foto zeigt ein high-power-field aus der Perizentralzone. Links oben im Foto erkennt man die Zentralvene des Leberläppchens.

Die Hepatozyten sind intakt, Zellgrenzen sowie Sinusoide und Zentralvene lassen sich differenzieren.

2.7 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

2.7.1 Physikalische Grundlagen

Die Fähigkeit eines Körpers zu leuchten, wenn er mit Licht angestrahlt wird, bezeichnet man als Lumineszenz. Dabei kann man weiterhin die Phosphoreszenz von der Fluoreszenz unterscheiden. Während bei der Fluoreszenz die Leuchterscheinung nur so lange anhält, wie der Körper angestrahlt wird, leuchtet ein phosphoreszierender Körper weiter, auch wenn er nicht mehr bestrahlt wird.

Die Leuchterscheinung kommt dabei entweder durch das angestrahlte Molekül selbst oder aber durch einen fluoreszierenden Farbstoff, der an ein Molekül gebunden hat, zustande.

Die Fluoreszenzmikroskopie unterscheidet sich von der Hellfeldmikroskopie für den Betrachter vor allem dadurch, dass das Gesichtsfeld zunächst dunkel ist, und nur die angefärbten Strukturen in ihren entsprechenden Fluoreszenzfarben aufleuchten.

Wenn ein Körper mit Licht bestrahlt wird, so absorbiert er die zugeführte Energie. Die Elektronen des bestrahlten Moleküls oder Fluoreszenzfarbstoffes kollidieren mit den einfallenden Photonen und nehmen deren kinetische Energie auf. Dabei werden die Elektronen aus ihrem energiearmen Grundzustand in einen angeregten sogenannten Singulett-Zustand überführt. Die zugeführte Energie versetzt also den angeregten Körper in einen energetisch höheren Zustand. Dabei wird die zugeführte Lichtenergie in andere Energieformen (Rotationsenergie, Schwingungsenergie, Anregungsenergie) umgewandelt und gespeichert.

Da jedoch der stabilste Zustand eines Systems gleichzeitig der energieärmste ist, versucht der jeweilige Körper, diese Energie schnellstmöglich wieder loszuwerden und in seinen stabilen Grundzustand zurückzukehren, indem er die überschüssige Energie in Form von Wärme, chemischer Energie oder elektromagnetischer Energie (Licht) wieder abgibt.

Dieser Vorgang gehorcht der Stokesschen-Regel, die besagt, dass ein gewisser Anteil der eingestrahlten Lichtenergie nicht als Licht zurückgestrahlt wird, sondern in andern Energieformen wie beispielsweise Wärme abgegeben wird.

Demnach sind die emittierten Lichtquanten entsprechend der physikalischen Formel:

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

(λ : Wellenlänge; h : Planck'sches Wirkungsquantum; c : Lichtgeschwindigkeit; E : Energie)

energieärmer und langwelliger als die einfallenden Lichtquanten.

Das Spektrum des emittierten Lichts ist dabei unabhängig von der Anregungswellenlänge. Lediglich die Fluoreszenz-Eigenschaften des angeregten Körpers bestimmen die Wellenlänge des emittierten Lichts. Diese unterschiedlichen Wellenlängen macht man sich bei Fluoreszenzmikroskopie zunutze, um, durch die Verwendung spezieller Filter, das anregende Licht von dem emittierten trennen zu können.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie können grundsätzlich sowohl Durchlicht als auch Auflicht angewandt werden. Aufgrund dessen, dass als Präparat ein intakter Leberlappen diente, wurde diese Studie in Auflichttechnik durchgeführt.

Filteranordnung

Der erste Filter hinter der Lichtquelle ist der sogenannte Anregungsfilter. Dieser isoliert aus dem gesamten Lichtspektrum der Lichtquelle denjenigen Wellenlängenbereich, der spezifisch für die Anregung des jeweiligen Fluorochroms ist. Nachfolgend erreicht das angeregte Licht den dichromatischen Teilerspiegel. Dieser hat die spezielle Funktion, einerseits das anregende Licht vollständig auf das zu mikroskopierende Objekt zu reflektieren und andererseits, das emittierte Fluoreszenzlicht des Objekts vollständig auf den nachgeschalteten Sperrfilter passieren zu lassen. Hierbei kommt es also zu der Auftrennung von anregendem Licht und emittierten Fluoreszenzlicht.

Der im Abbildungsstrahlengang liegende Sperrfilter isoliert schließlich aus den verbleibenden Spektren denjenigen Wellenlängenbereich, der für den jeweilig angewendete Fluoreszenzfarbstoff spezifisch ist. Dadurch wird die Passage von anderem Fluoreszenzlicht und dem reflektierten Licht des Präparats verhindert.

Prinzip der Auflicht-Fluoreszenz

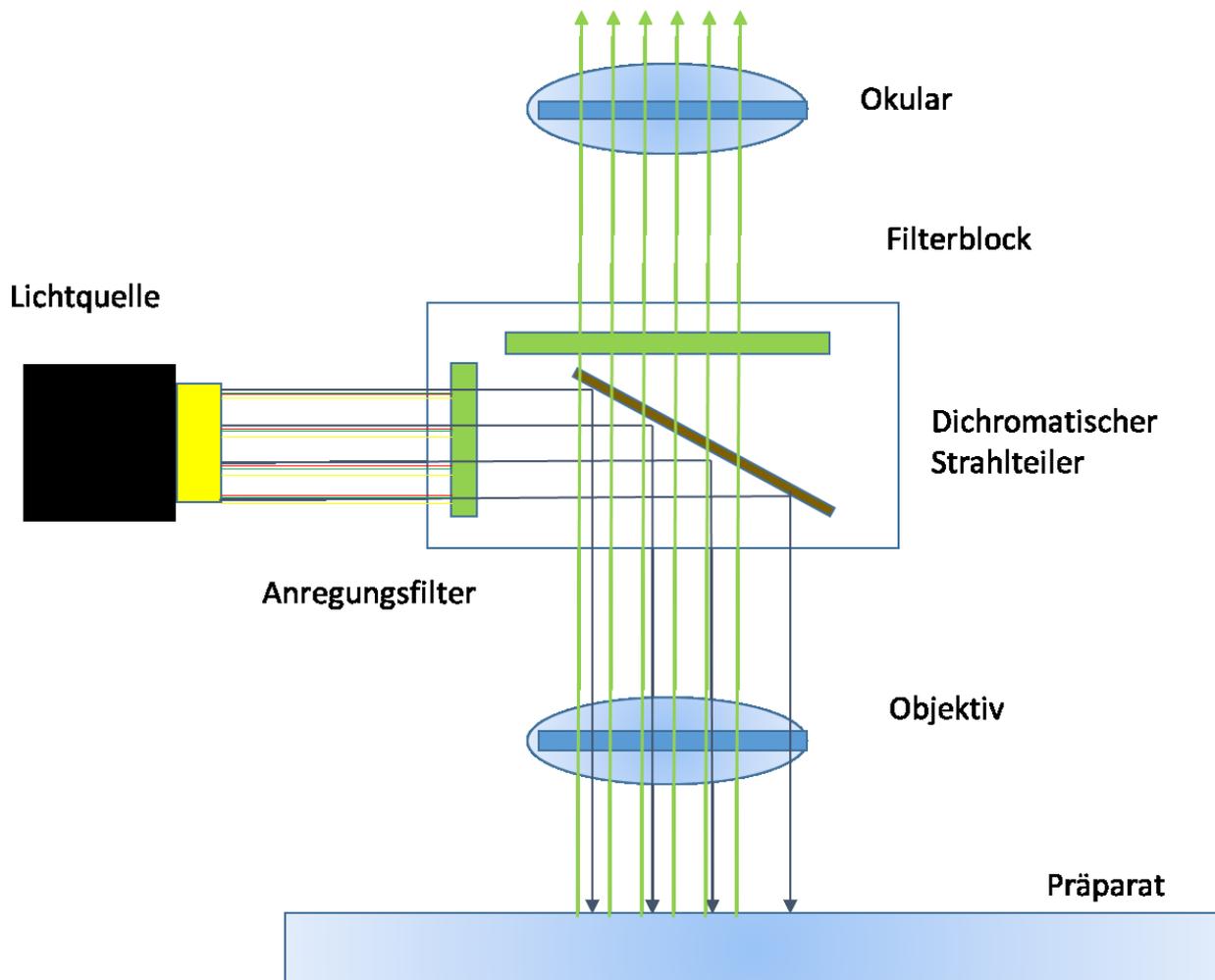


Abb. 11: Schemazeichnung zum Aufbau einer Auflichtfluoreszenzapparatur

Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Natriumfluorescein

Hierbei handelt es sich um ein niedermolekulares Molekül, das von den Hepatozyten aufgenommen wird und sich im Zytoplasma verteilt. Bei einer Wellenlänge von 485 nm hat es sein Absorptionsmaximum. Der Emissionsbereich liegt bei 520-530 nm.

Rhodamin 6G

Rhodamin 6G hat einen anregenden Wellenlängenbereich von 530-560 nm und eine Emissionswellenlänge >580 nm. Es dient zur in-vivo-Färbung von Leukozyten.

Bismenzimid

Bisbenzimid wird von den Hepatozyten aufgenommen und interkaliert dort mit der DNA-Doppelhelix. Dadurch kann das Chromatin fluoreszierend dargestellt werden. Der Anregungsbereich beträgt 330-380 nm, der Emissionsbereich >415 nm.

2.7.2 Durchführung

Versuchsgruppen

Für die Versuche der intravitalen Mikroskopie wurden insgesamt vier Versuchsgruppen entsprechend der Einteilung in **Abb. 1a und 1b** gebildet. Für alle Versuchstiere war der Studienendpunkt Tag 1 nach der Lebertransplantation. Die Versuchstiere wurden in Gruppen mit nicht-steatotischen Lebern und steatotischen Lebern eingeteilt und diese wiederum unterteilt in MDDP präkonditionierte Tiere und Kontrolltiere.

	nicht-steatotisch	steatotisch
control	Gruppe 1; n=5	Gruppe 9; n=7
MDDP	Gruppe 2; n=7	Gruppe10; n=8

Abb. 12: Verteilung der transplantierten Versuchstiere für die Versuche der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Control: Diese Versuchstiere (Gruppe 1,9) erhielten vor der Transplantation keine Medikamente. MDDP: Diese Versuchstiere (Gruppe 2,10) erhielten eine MDDP-Präkonditionierung gemäß dem Versuchsprotokoll (2.3.1).

Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose glich bei den Versuchen der intravitalen Mikroskopie exakt dem Vorgehen bei den zuvor durchgeführten Transplantationen.

Nach der Fixierung auf einer schwenkbaren Platte folgte die Anlage eines zentralen Venenzugangs. Dazu wurde die V. jugularis externa in der Fossa supraclavicularis freipräpariert, doppelt umschlungen und schließlich ein Polyethylenkatheter darin fixiert. Dieser Zugang diente der Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe während der Mikroskopie.

Nach medianer Laparotomie entlang der Transplantationsnarbe wurde die Sicht auf das Abdomen durch einen weiteren Schnitt entlang der Flanken erweitert und die

entstandenen Bauchwandlappen mittels an Magnetständern befestigter Haken cranialwärts aufgespannt und an der schwenkbaren Platte fixiert. Die Platte wurde nun entlang der Längsachse des Versuchstiers um 45° seitwärts geneigt.

Um die Störungen durch Atemexkursion während der Mikroskopie zu verringern, wurde der linke Leberlappen vorsichtig auf einem mit Knetmasse ausmodellierten, in allen Raumebenen frei bewegbaren Teelöffel ausgelagert. Anschließend wurde der ausgelagerte Leberlappen mit einem Deckglas abgedeckt, mit physiologischer Kochsalzlösung superfundiert und schließlich exakt parallel zur Fokusebene unter dem Objektiv ausgerichtet.



Abb. 13a: Positionierung des Versuchstiers auf dem Versuchstisch für die intravitale Auflichtfluoreszenzmikroskopie. Dargestellt ist der auf einem Löffel ausgelagerte linke Leberlappen, der in waagerechter Position unter dem Objektiv des Mikroskops positioniert wird. Über den zentralen Venenkatheter können während der Mikroskopie Farbstoffe appliziert werden.



Abb. 13b: Dargestellt ist der auf einem Löffel ausgelagerte linke Leberlappen, der in waagerechter Position unter dem Objektiv des Mikroskops positioniert wird. Der Leberlappen wird mit NaCl 0,9% superfundiert, um den Kontakt zum aufliegenden Objektträger zu gewährleisten.

Über den zentralen Venenzugang wurden nun die Fluoreszenzfarbstoffe Natrium-Fluoreszein ($2 \mu\text{mol/kg}$), Rhodamin 6G ($1 \mu\text{mol/kg}$) Bisbenzimid ($2 \mu\text{mol/kg}$) nacheinander injiziert. Das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht wurde mit Hilfe einer am Mikroskop befestigten Kamera in Echtzeit an einen Computer übertragen und anschließend mit Hilfe der Mikroskopiesoftware (Carl Zeiss ZEN 2012 blue edition) Videodateien (20 Sekunden) für die spätere Offlineauswertung generiert. Für jedes der Versuchstiere wurden 10 Leberazini und 5 post-sinusoidale Venulen mit allen drei Filtersystemen für jeweils 20 Sekunden aufgezeichnet.

2.7.3 Auswertung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Mikroskopie ermöglicht neben der direkten Darstellung der Morphologie auch eine Beurteilung der Mikrozirkulation während der Perfusion. Unter Verwendung der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe konnten dabei verschiedene mikrozirkulatorische Parameter ausgewertet werden. Anschließend wurden die Videos, die während der Versuche aufgezeichnet worden waren, mit Hilfe der Software CapImage 5.03 (Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Um die einzelnen Leberlobuli voneinander abgrenzen zu können, wurden optimierte Schablonen angefertigt, innerhalb derer wiederum eine periportale, mittzonale und perizentrale

Zone abgegrenzt werden konnten. Somit konnten die zu beurteilenden mikrozirkulatorischen Prozesse auf den von der Schablone vorgegebenen Bereich begrenzt werden. Folgende Parameter wurden hierbei bewertet.

Sinusoidale Perfusion

Um den Anteil des Perfusionsdefizits innerhalb eines Leberlobulus angeben zu können, wurden Aufnahmen mit dem Blaufiltersystem verwendet. Zunächst wurden alle Sinusoide im Bereich der mittleren Zone einer Schablone gezählt und diese mit der Anzahl der nicht-perfundierten Sinusoide ins Verhältnis gesetzt. Somit konnte das prozentuale Perfusionsdefizit errechnet werden.

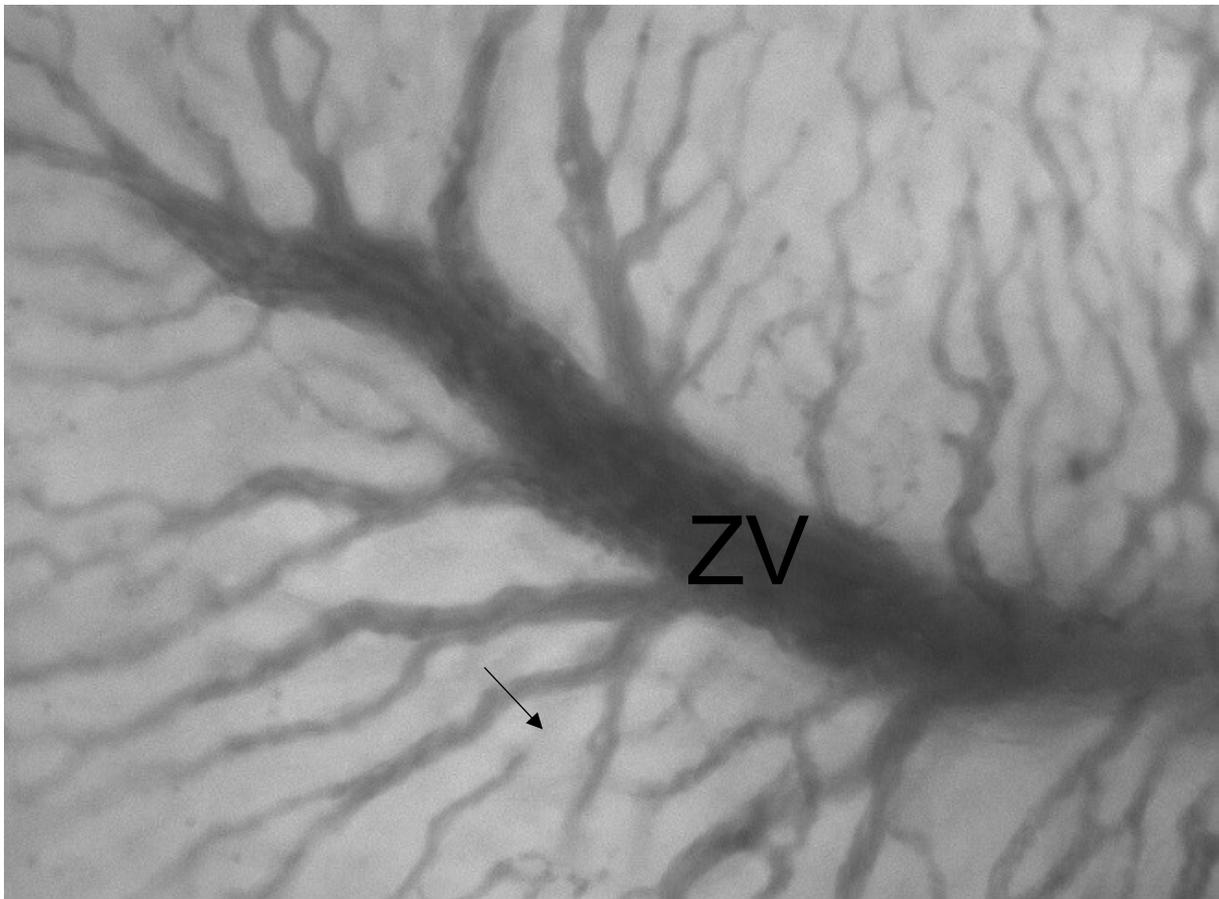


Abb. 14: Dargestellt ist eine Momentaufnahme der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie mit Blaufiltersystem. Der Pfeil markiert einen Lebersinus mit Perfusionsversagen, ZV= Zentralvene.

Gefäßdurchmesser der postsinusoidalen Venulen

Um den Gefäßdurchmesser der postsinusoidalen Venulen messen zu können, wurden ebenfalls die Aufnahmen des Blaufiltersystems verwendet. Unter der

Annahme, dass ein Gefäßabschnitt der Geometrie eines Zylinders angenähert ist, wurde jeweils ein Gefäßabschnitt der Länge $l = 100 \mu\text{m}$ festgelegt. Innerhalb dieses Gefäßabschnitts wurde der Durchmesser an verschiedenen Stellen bestimmt, um schließlich den mittleren Durchmesser des Gefäßabschnitts angeben zu können. Anhand dessen konnte die Mantelfläche des Zylinders, welche in unserem Modell der Endotheloberfläche des Gefäßabschnittes entspricht, mit der Formel

$A = d * \pi * l / 10^6$ [mm²] berechnet werden.

Hepatozelluläre Apoptose

Für die Quantifizierung der hepatozellulären Apoptose wurde das UV-Filtersystem verwendet. Darunter kommt es zu einer Fluoreszenz der mit Bisbenzimid angefärbten Kerne der Hepatozyten. Liegen bei Hepatozyten morphologische Korrelate der Apoptose wie Kernkondensation, Margination, Fragmentation oder sogenannte „*apoptotic bodies*“ vor, so können diese Hepatozyten anhand der verstärkten Fluoreszenz gegenüber anderen Hepatozyten abgegrenzt werden. Die Anzahl der apoptotischen Hepatozyten wurde für die einzelnen Zonen separat bestimmt.

Mikrovaskuläre Leukozytenretention

Um die in vivo mit Rhodamin 6G gefärbten Leukozyten sichtbar zu machen, und damit eine Analyse der Interaktion mit dem Endothel im Sinne einer Leukozyten-Retention zu zeigen, wurde das Grünfiltersystem verwendet. Als in Sinusoiden stagnierende Leukozyten wurden diejenigen definiert, die ihre Position über einen Zeitraum von 10 Sekunden nicht veränderten. Hierbei wurde wiederum eine Gliederung in Zonen mit Hilfe der Schablonen vorgenommen und die jeweilige Anzahl der adhärenen Leukozyten zonal bestimmt.

Für die Bestimmung der adhärenen Leukozyten in den postsinusoidalen Venulen wurde ebenso die Anzahl der Leukozyten, die für einen Zeitraum von 10 Sekunden ihre Position innerhalb eines Gefäßabschnitts von $100 \mu\text{m}$ nicht veränderten, gezählt. Aus der Anzahl der adhärenen Leukozyten und der zuvor errechneten Endotheloberfläche des Gefäßabschnittes konnte schließlich die Anzahl der adhärenen Leukozyten pro mm² Gefäßoberfläche ermittelt werden.

2.8 Statistik

Die Daten, die bei der Auswertung der intravitalen Mikroskopie, der HE- histologischen Analyse und der laborchemischen Serumanalyse erhoben werden konnten, wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft excel 2013) eingetragen, um eine elektronische Datenverarbeitung zu ermöglichen. Anschließend wurden mit Hilfe der Software SigmaPlot (Jandel Corp., San Rafael, USA) Säulendiagramme erstellt. Diese zeigen die absoluten oder prozentualen Mittelwerte mit dem Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts (MW \pm SEM).

Um die erhobenen Daten statistisch auszuwerten, wurden diese zunächst auf deren Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Gleichheit der Varianzen (Levene-Test) überprüft. Dies erfolgte mit der Software SigmaStat® Statistical Software, Version 2.03 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

Es wurden sowohl bei den nicht-steatotischen Versuchstieren, als auch bei den steatotischen Versuchstieren die Kontrollgruppe mit der MDDP-Gruppe verglichen. Dieser Vergleich wird in den folgenden Diagrammen bei Erreichen einer Signifikanz mit “*” gekennzeichnet.

Darüber hinaus wurden sowohl die Kontrolltiere der nicht-steatotischen Gruppe mit den Kontrolltieren der steatotischen Gruppe verglichen, als auch die MDDP-Tiere der nicht-steatotischen Gruppe mit den MDDP-Tieren der steatotischen Gruppe. Dieser Vergleich wird in den folgenden Diagrammen bei Erreichen einer Signifikanz mit “#” gekennzeichnet.

Dazu wurde ein Student's t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Wenn die Voraussetzungen für diesen Test nicht erfüllt waren, wurde stattdessen ein Rangsummentest für unverbundene Stichproben (Mann Whitney-Test) durchgeführt. Die Ergebnisse innerhalb einer Gruppe zu den verschiedenen Studienendpunkten (baseline, Tag1, Tag3, Tag5, Tag7) wurden mittels ANOVA-Test auf signifikante Unterschiede der Varianzen innerhalb dieser Gruppe überprüft. Wenn sich aus den durchgeführten Tests eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ ergab, wurden diese Unterschiede im Ergebnis als signifikant angenommen. Es erfolgte keine weitere Unterscheidung hinsichtlich bestimmter Signifikanzniveaus beim Auftreten signifikanter Unterschiede.

„Fatty“ steht für „steatotische“ Lebern, „non-fatty“ für „nicht-steatotische“ Lebern.

3. Ergebnisse

3.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

3.1.1 Sinusoidales Perfusionsversagen

Nach der Injektion von Natriumfluorescein wurde der prozentuale Anteil der nicht perfundierten Sinusoide innerhalb der Mittelzone nach Rappaport mit Hilfe der Intravitalmikroskopie quantifiziert.

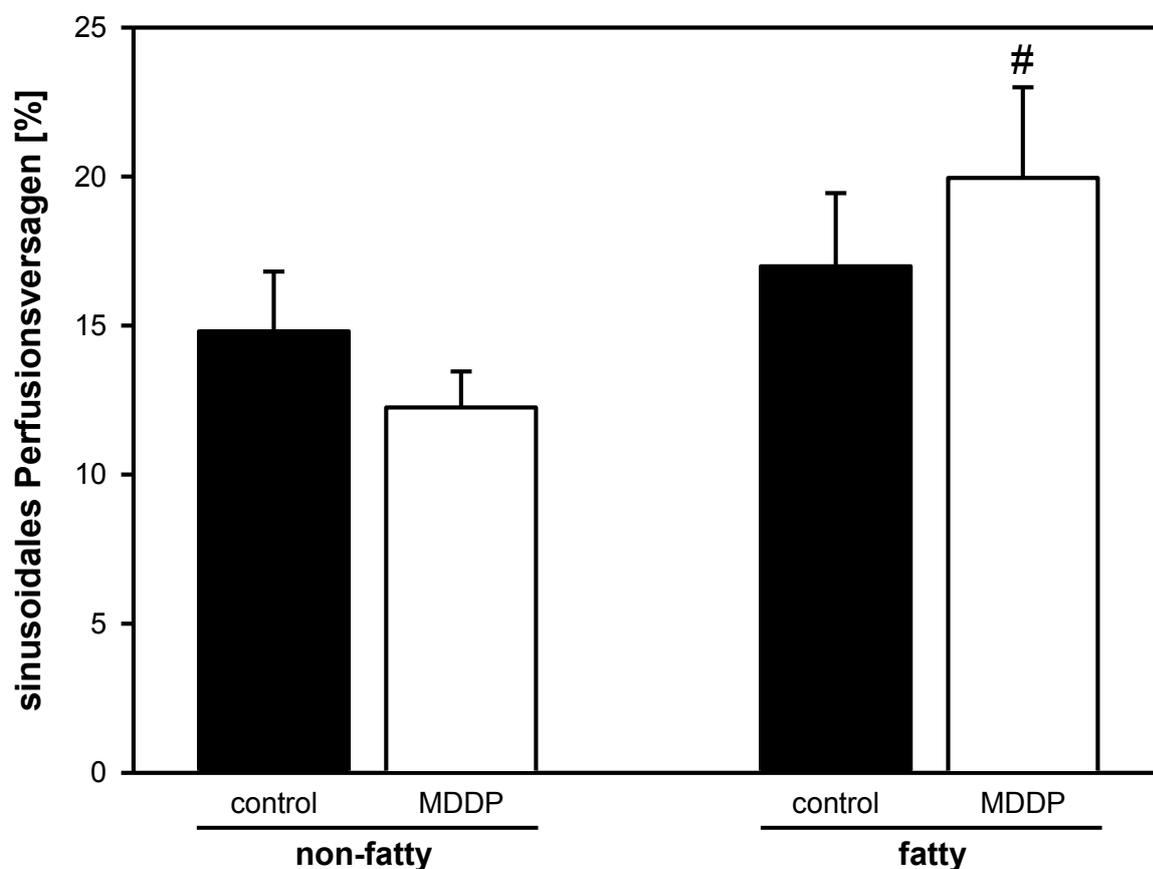


Abb. 15: sinusoidales Perfusionsversagen bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (schwarze Säule: control: n=5; weiße Säule: MDDP: n=7) und steatotischen (fatty) Lebern (schwarze Säule: control: n=7; weiße Säule: MDDP: n=8) MW ± SEM, # p<0.05 vs. MDDP non-fatty

Innerhalb der nicht-steatotischen Lebern zeigte sich in der statistischen Analyse nach der MDDP-Präkonditionierung mit 12,26±1,20% nicht-perfundierter Sinusoide nicht signifikant verbesserte Perfusion gegenüber der Kontrollgruppe mit 14,81±2,00% nicht-perfundierter Sinusoide. Bei den steatotischen Lebern war der Unterschied zwischen der MDDP-Gruppe mit 19,95±3,04% und der Kontrollgruppe mit 16,99±2,45% ebenso nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich

zwischen der MDDP-Gruppe der nicht-steatotischen Versuchstiere und der MDDP-Gruppe der steatotischen Versuchstiere.

3.1.2 Hepatozelluläre Apoptose

Die Injektion von Bismenzimid führt nach der Interkalierung des Farbstoffs in die DNA zu einem hellen Aufleuchten des dekondensierenden Chromatins. Dadurch können mittels intravitaler Mikroskopie apoptotische Zellen detektiert werden. Ausgewertet wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen pro Lobulus.

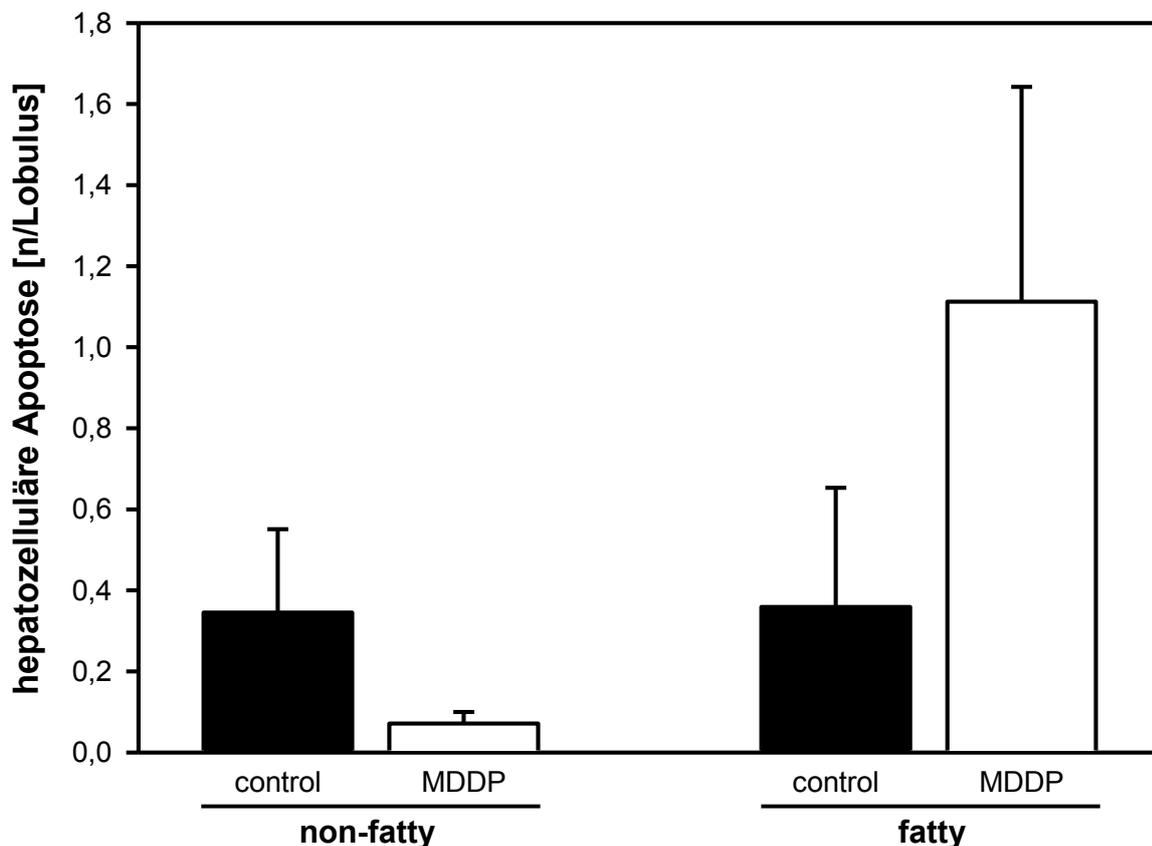


Abb. 16: Hepatozelluläre Apoptose bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (schwarze Säule: control: n=5; weiße Säule: MDDP: n=7) und steatotischen (fatty) Lebern (schwarze Säule: control: n=7; weiße Säule: MDDP: n=8) MW \pm SEM

Während sich in der Gruppe der nicht-steatotischen Lebern in der statistischen Analyse eine nicht signifikant verringerte Anzahl apoptotischer Zellen nach MDDP-Präkonditionierung gegenüber der Kontrollgruppe zeigte, war die Apoptoserate in der Gruppe mit Fettlebern nach einer MDDP-Präkonditionierung gegenüber der Kontrollgruppe deutlich, aber ebenfalls statistisch nicht signifikant gesteigert.

3.1.3 Intrahepatische Leukozytenretention

Mit der Applikation von Rhodamin 6G konnten Leukozyten in vivo gefärbt werden und deren Interaktions- und Adhäsionsverhalten untersucht werden. Sowohl in den Sinusoiden eines Lobulus, als auch in den postsinusoidalen Venulen wurden die Leukozyten gezählt, die sich über einen Zeitraum von 10 Sekunden nicht bewegten und damit als adhärent definiert.

Darüber hinaus wurde in den postsinusoidalen Venulen die Endothel-Leukozyten-Interaktion untersucht, indem über einen Zeitraum von 10 Sekunden innerhalb eines Gefäßabschnittes von 100 µm Länge diejenigen Leukozyten gezählt wurden, die im Sinne einer Endothel-Leukozyten-Interaktion an der Gefäßwand entlang rollten (Leukozyten-Rollen) und somit diesen Gefäßabschnitt passierten.

3.1.4 Sinusoidale Leukostase

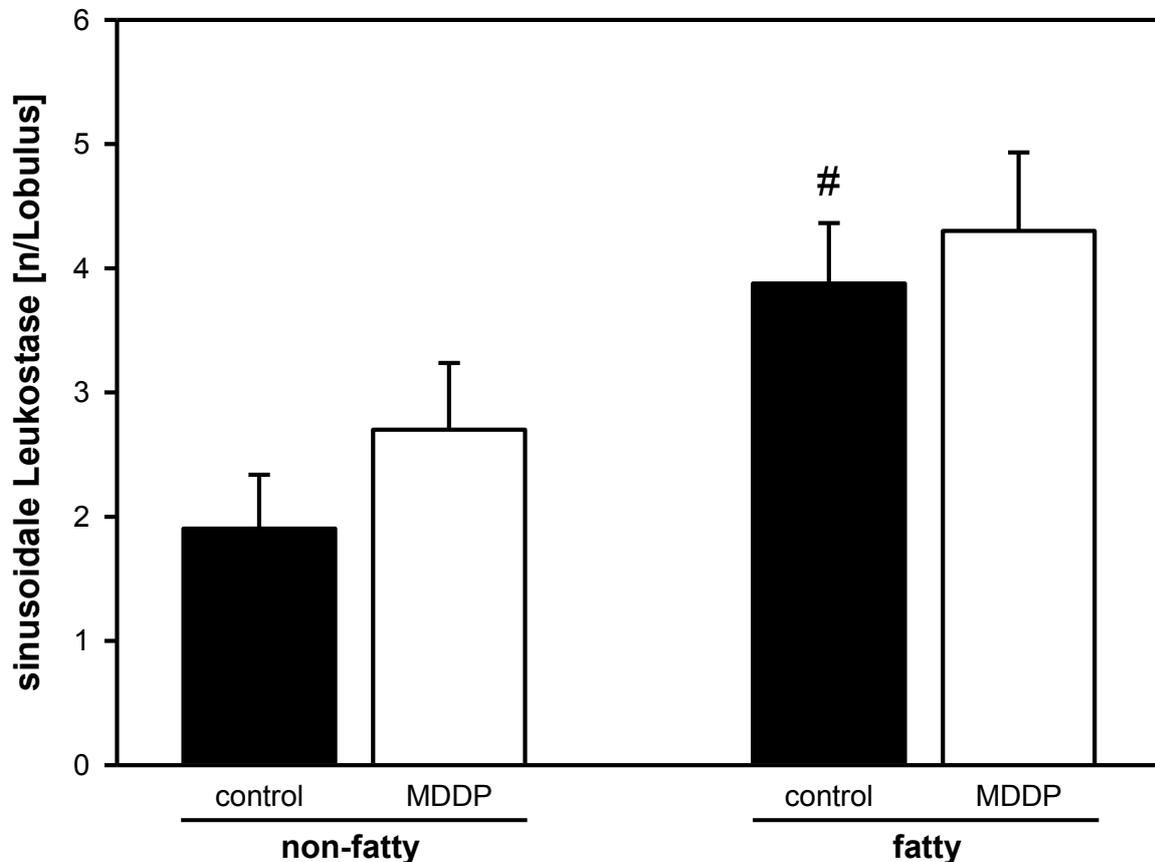


Abb. 17: Sinusoidale Leukostase bei nicht-steatotischen (*non-fatty*) Lebern (schwarze Säule: control: $n=5$; weiße Säule: MDDP: $n=7$) und steatotischen (*fatty*) Lebern (schwarze Säule: control: $n=7$; weiße Säule: MDDP: $n=8$) $MW \pm SEM$, # $p < 0.05$ vs. control non-fatty

Die quantitative Analyse der sinusoidalen Leukostase zeigte nach MDDP-Präkonditionierung einen diskreten, jedoch statistisch nicht signifikanten Anstieg der stagnierenden Leukozyten pro Lobulus sowohl bei nicht-steatotischen Lebern als auch bei steatotischen Transplantaten. Jedoch zeigten sich bei steatotischen Transplantaten der Kontrollgruppe signifikant mehr stagnierende Leukozyten im Vergleich zu nicht-steatotischen Transplantaten der Kontrollgruppe.

3.1.5 Venuläres Leukozyten-Rollen

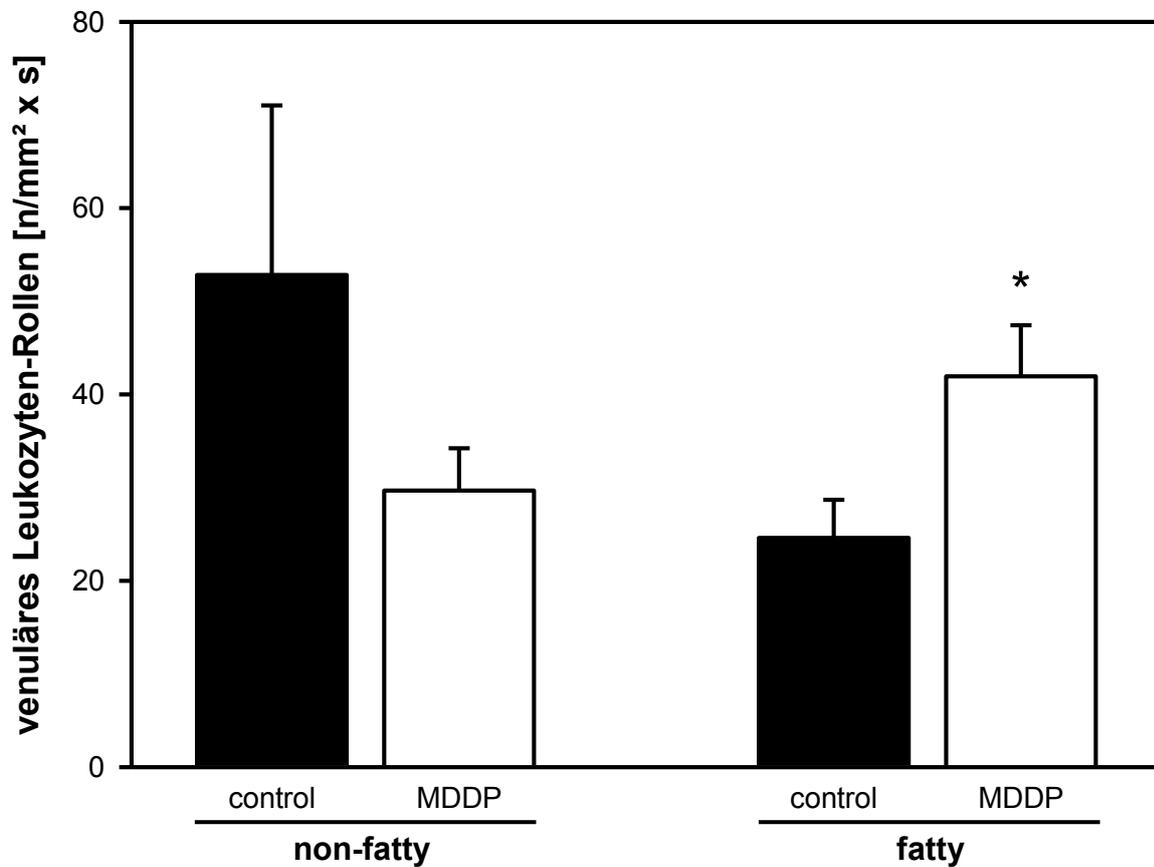


Abb. 18: Venuläres Leukozyten-Rollen bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (schwarze Säule: control: $n=5$; weiße Säule: MDDP: $n=7$) und steatotischen (fatty) Lebern (schwarze Säule: control: $n=7$; weiße Säule: MDDP: $n=8$) $MW \pm SEM$, * $p < 0.05$ vs. control

Die quantitative Analyse der intravitalmikroskopischen Untersuchung des venulären Leukozyten-Rollens zeigte nach MDDP-Präkonditionierung bei nicht-steatotischen Lebern eine deutliche Reduktion rollender Leukozyten pro Quadratmillimeter Endotheloberfläche pro Sekunde. Bei steatotischen Lebern war die Leukozytenzahl mit einer Veränderung von $24,59 \pm 4,09$ bei der Kontrollgruppe auf $41,95 \pm 5,49$ bei der MDDP-Gruppe hingegen signifikant erhöht. Der Vergleich der Kontrolltiere der nicht-steatotischen Gruppe mit den Kontrolltieren der steatotischen Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied.

3.1.6 Venuläre Leukozyten-Adhäsion

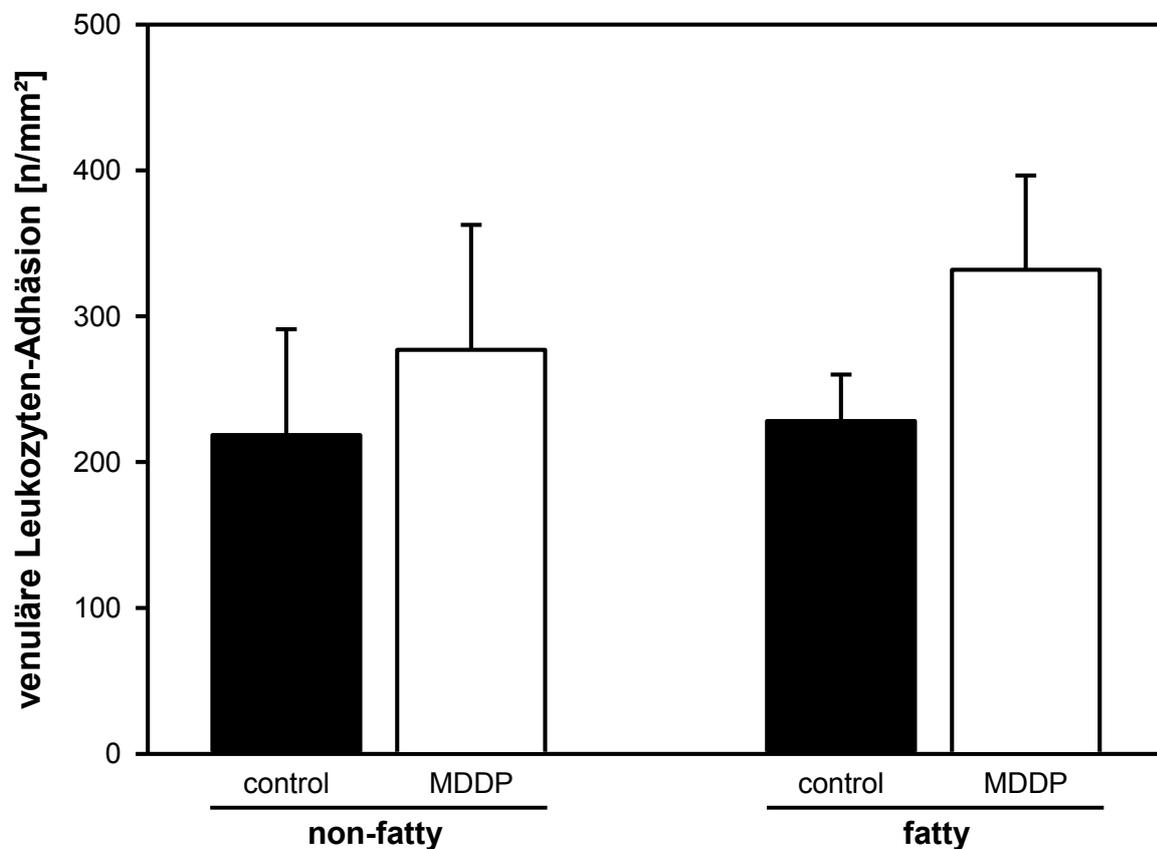


Abb. 19: Venuläre Leukozyten-Adhäsion bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (schwarze Säule: control: $n=5$; weiße Säule: MDDP: $n=7$) und steatotischen (fatty) Lebern (schwarze Säule: control: $n=7$; weiße Säule: MDDP: $n=8$) $MW \pm SEM$

Die Analyse der Leukozyten-Adhäsion in post-sinusoidalen Venulen zeigte sowohl für nicht-steatotische Lebern als auch für steatotische Lebern eine gesteigerte Leukozyten-Adhäsion nach MDDP-Präkonditionierung.

Der Vergleich von Kontroll- und MDDP-Gruppen sowie der Vergleich von steatotischen und nicht-steatotischen Lebern ergab dabei keine Signifikanz.

3.2 Histologische Auswertung

3.2.1 Vakuolisierung

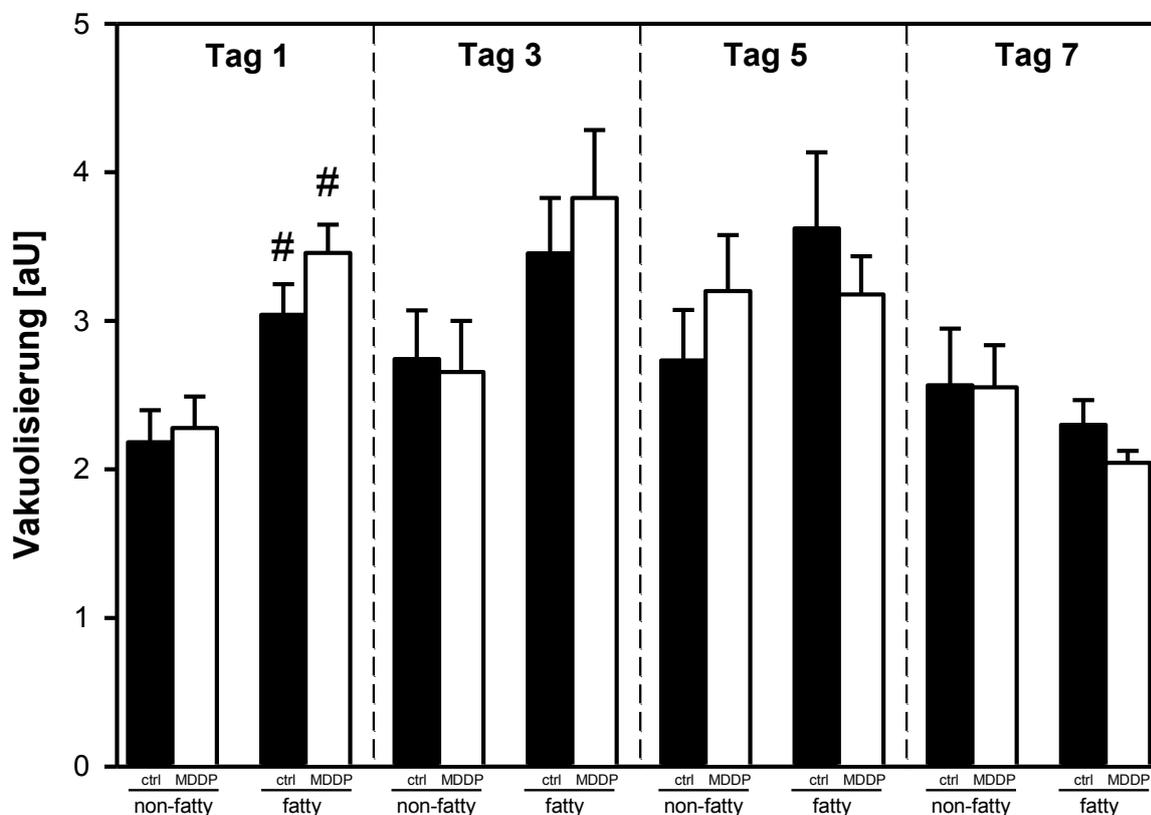


Abb. 20: Vakuolisierung der Hepatozyten bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 10,12,14,16=MDDP=weiß) MW ± SEM. #p<0.05 vs. non-fatty

Die quantitative Auswertung der hepatozellulären Vakuolisierung zeigte im Zeitverlauf nach der Transplantation sowohl bei nicht-steatotischen als auch bei steatotischen Transplantaten eine Zunahme der Vakuolisierung mit einem Maximum am dritten bis fünften Tag nach der Transplantation. Dabei ergaben sich im Vergleich von MDDP-präkonditionierten Gruppen mit den jeweiligen Kontrollgruppen in der statistischen Analyse keine signifikanten Unterschiede. Am Tag 1 nach der Transplantation zeigte sich eine signifikant erhöhte Vakuolisierung bei steatotischen Transplantaten im Vergleich zu nicht-steatotischen Transplantaten sowohl für die MDDP-Gruppe als auch für die Kontrollgruppe.

3.2.2 Grobscholligkeit

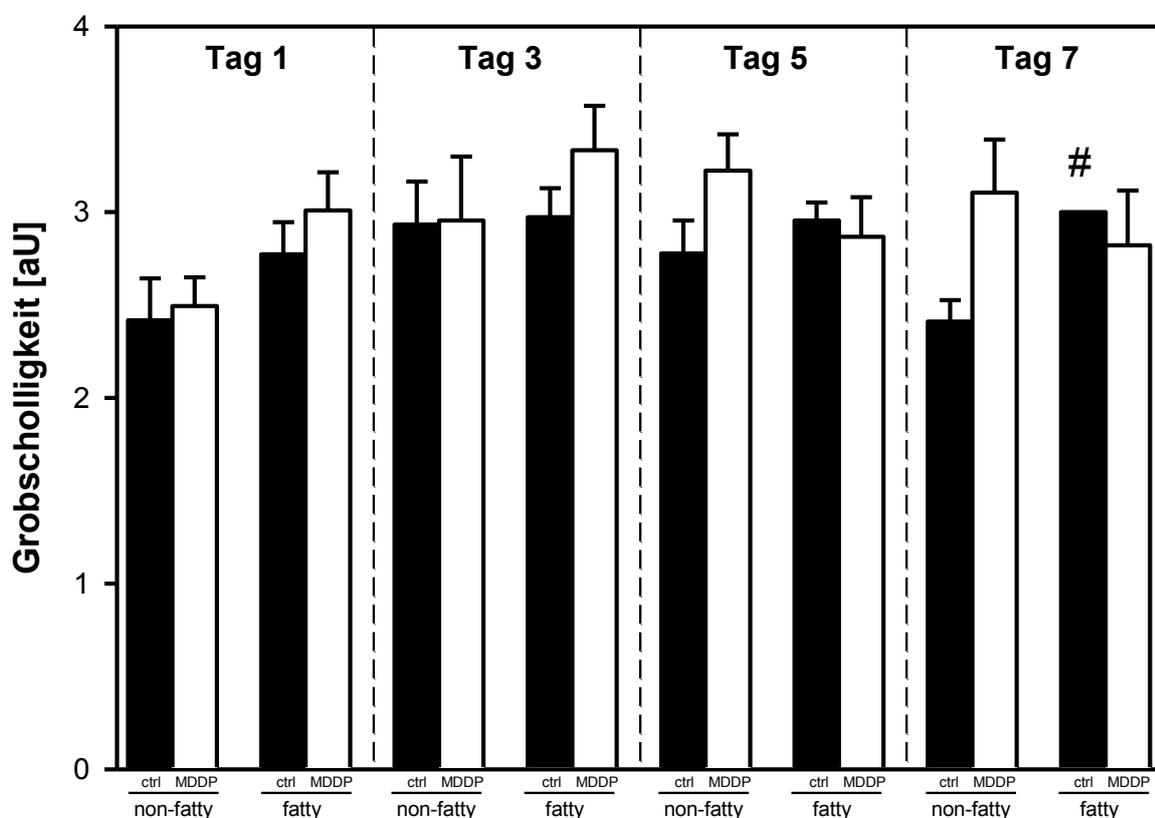


Abb. 21: Grobscholligkeit der Hepatozyten bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 10,12,14,16=MDDP=weiß) MW \pm SEM. # $p < 0.05$ vs. non-fatty

Die Analyse der Grobscholligkeit zeigte für nicht-steatotische und steatotische Lebern sowohl für die Kontrolltiere als auch für die MDDP-präkonditionierten Tiere einen Anstieg, der sein Maximum im Bereich von Tag 3 bis Tag 5 nach der Transplantation erreichte und bis zum Tag 7 wieder reduziert war. Ein signifikanter Unterschied zwischen nicht-steatotischen und steatotischen Transplantaten zeigte sich in der statistischen Analyse lediglich zwischen der Kontrollgruppe der nicht-steatotischen Tiere und der Kontrollgruppe der steatotischen Tiere am Tag 7.

Darüber hinaus zeigten sämtliche Gruppenvergleiche keinen signifikanten Unterschied.

3.2.3 Nekrose

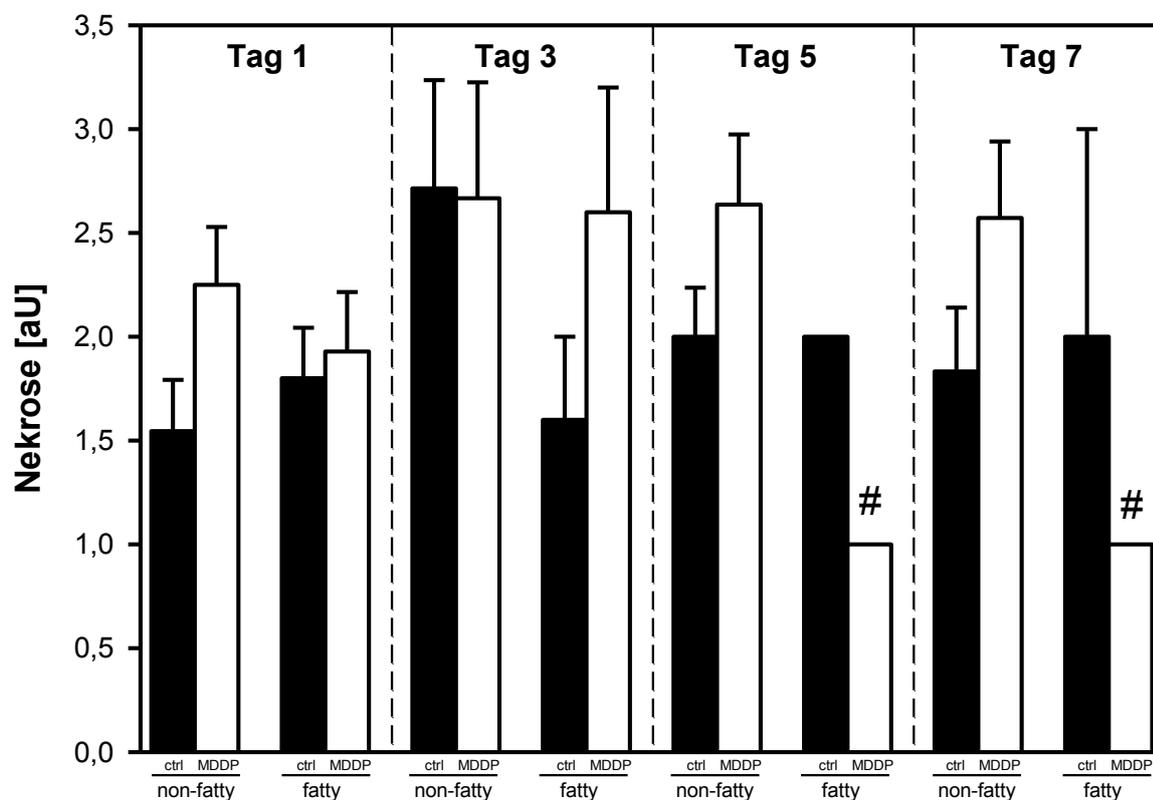


Abb. 22: Nekrose bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 10,12,14,16=MDDP=weiß). MW \pm SEM. # $p < 0.05$ vs. non-fatty

Bei den steatotischen MDDP-Gruppen von Tag 5 und Tag 7 zeigte sich eine signifikant kleinere Ausdehnung der Nekrose gegenüber den jeweils entsprechenden nicht-steatotischen Lebern von Tag 5 und Tag 7 nach MDDP-Präkonditionierung.

Im zeitlichen Verlauf fand sich die größte Ausprägung der nekrotischen Areale am Tag 3 und 5. Am Tag 7 waren diese bereits wieder rückläufig. Insbesondere waren nach der MDDP-Präkonditionierung die nekrotischen Areale ausgeprägter als ohne MDDP-Präkonditionierung.

3.2.4 Gewebestruktur

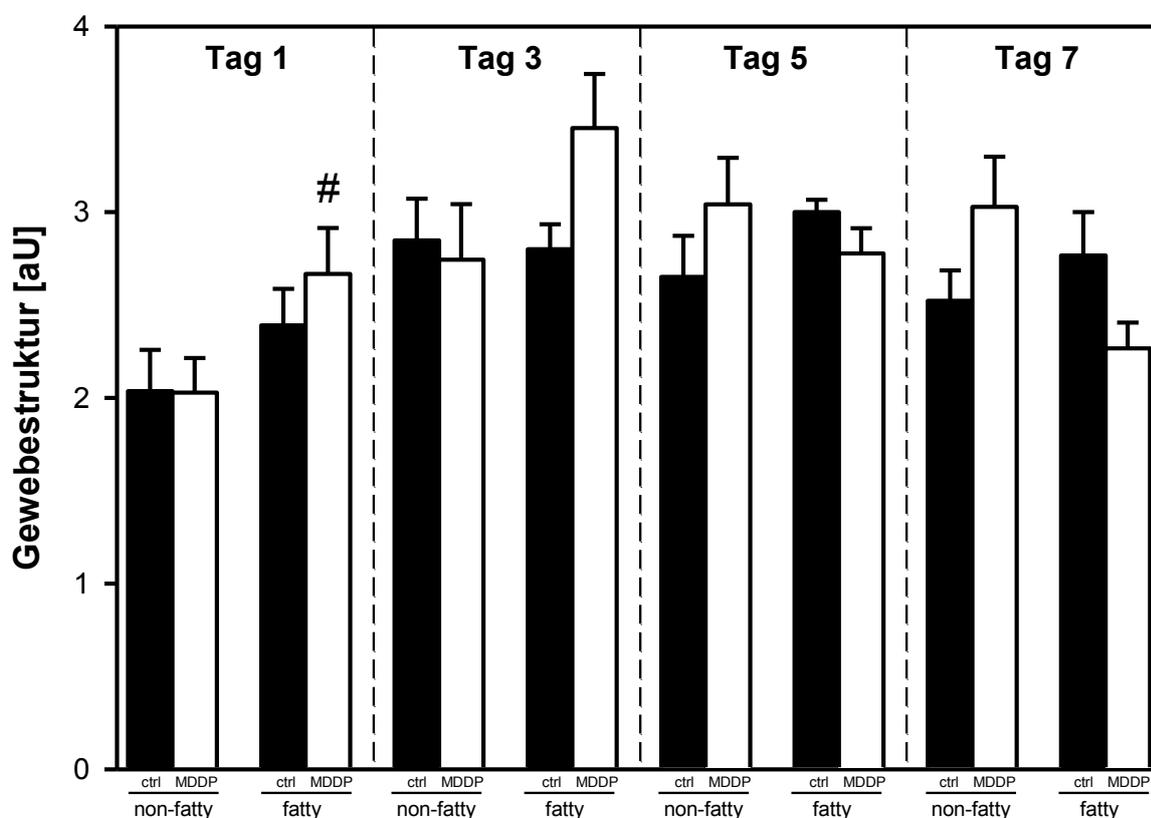


Abb. 23: Gewebestruktur bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 10,12,14,16=MDDP=weiß). MW \pm SEM. # $p < 0.05$ vs. non-fatty.

Die Analyse der Gewebestruktur zeigte nach der Transplantation eine zunehmende Verschlechterung der Organintegrität für alle Versuchsgruppen, die ihr Maximum 5 Tage nach Transplantation erreichte und anschließend wieder regredient war. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und MDDP-präkonditionierter Gruppe fanden sich zu keinem Zeitpunkt. Lediglich am Tag 1 zeigte sich bei MDDP-präkonditionierten Spenderorganen ein signifikanter Unterschied zwischen steatotischen und nicht-steatotischen Transplantaten.

3.3 Klinische Chemie

Die Folgenden Diagramme zeigen graphisch die jeweiligen Werte der klinischen Chemie im Serum. Für die Gruppe: fatty, control, Tag 3, konnten infolge technischer Probleme bei der Auswertung im Labor keine Werte gemessen werden. Diese Gruppe wird dahingehend in den Diagrammen nicht aufgeführt und statistisch nicht berücksichtigt. Die Aussagekraft der Laborwerte wird in der Diskussion besprochen.

3.3.1 AST

Die AST ist in den Mitochondrien der Hepatozyten lokalisiert. Erst bei schweren Gewebeschäden, bei denen es zu einer Zerstörung der mitochondrialen Membran kommt, resultiert eine Freisetzung der AST aus den Mitochondrien und es kommt zu einer Ausschüttung ins Blut. Somit ist die AST gut geeignet, das Ausmaß der hepatozellulären Schädigung zu quantifizieren.

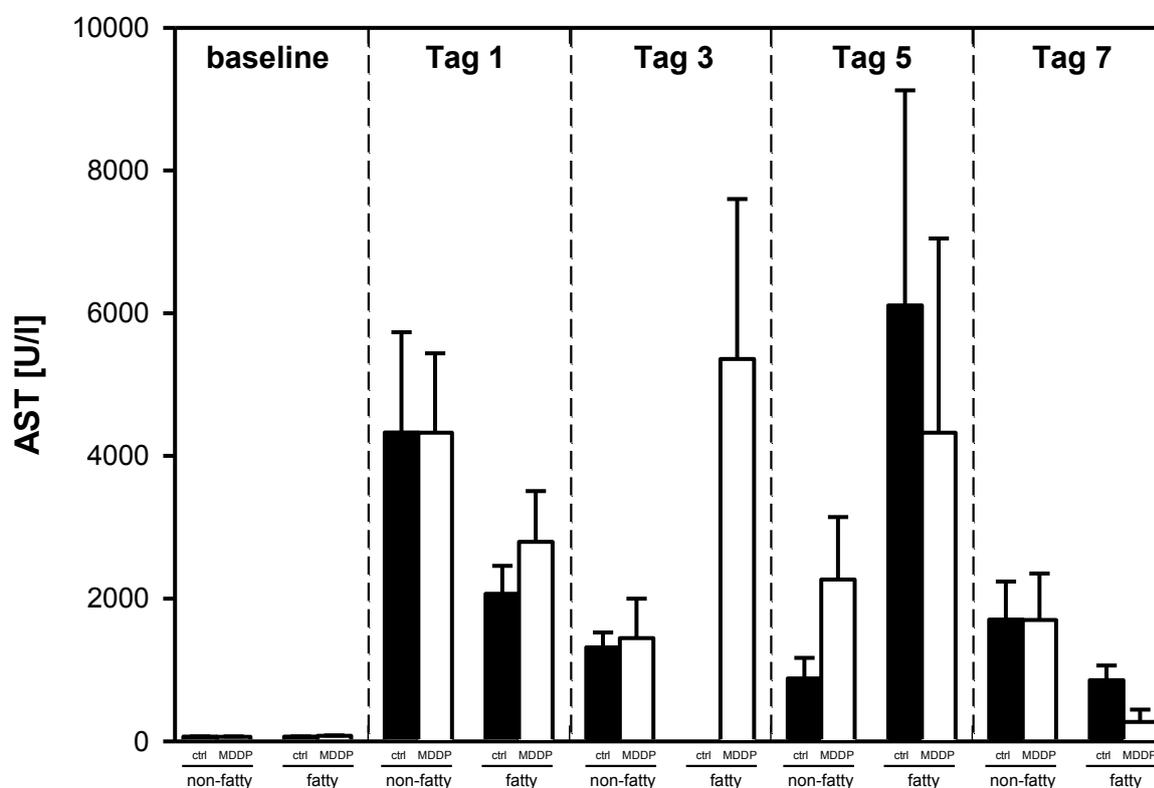


Abb. 24: AST bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß). MW \pm SEM.

Die Analyse der AST im Serum unter *baseline*-Bedingungen zeigte bei allen Gruppen Werte zwischen $64,25 \pm 5,68$ - $76,25 \pm 8,18$ U/l. Nach der Transplantation zeigte sich in der statistischen Analyse ein rasanter Anstieg der AST im Serum auf Werte über 6000 U/l am Tag 5. Vor allem die steatotischen Lebern zeigten zwischen Tag 3 und Tag 5 stark erhöhte AST-Serumspiegel. Am Tag 7 waren die Spiegel bereits wieder abgefallen. Die statistische Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied, weder zwischen Kontrollgruppen und MDDP-Gruppen noch zwischen steatotischen und nicht-steatotischen Versuchstieren.

3.3.2 ALT

Die ALT ist eine leberspezifische Transaminase, die nur im Zytoplasma von Hepatozyten vorkommt. Wird die Zellmembran der Hepatozyten zerstört, kommt es zu einer Ausschüttung der ALT ins Blut. Somit ist die ALT sehr gut geeignet, eine Schädigung von Hepatozyten anzuzeigen.

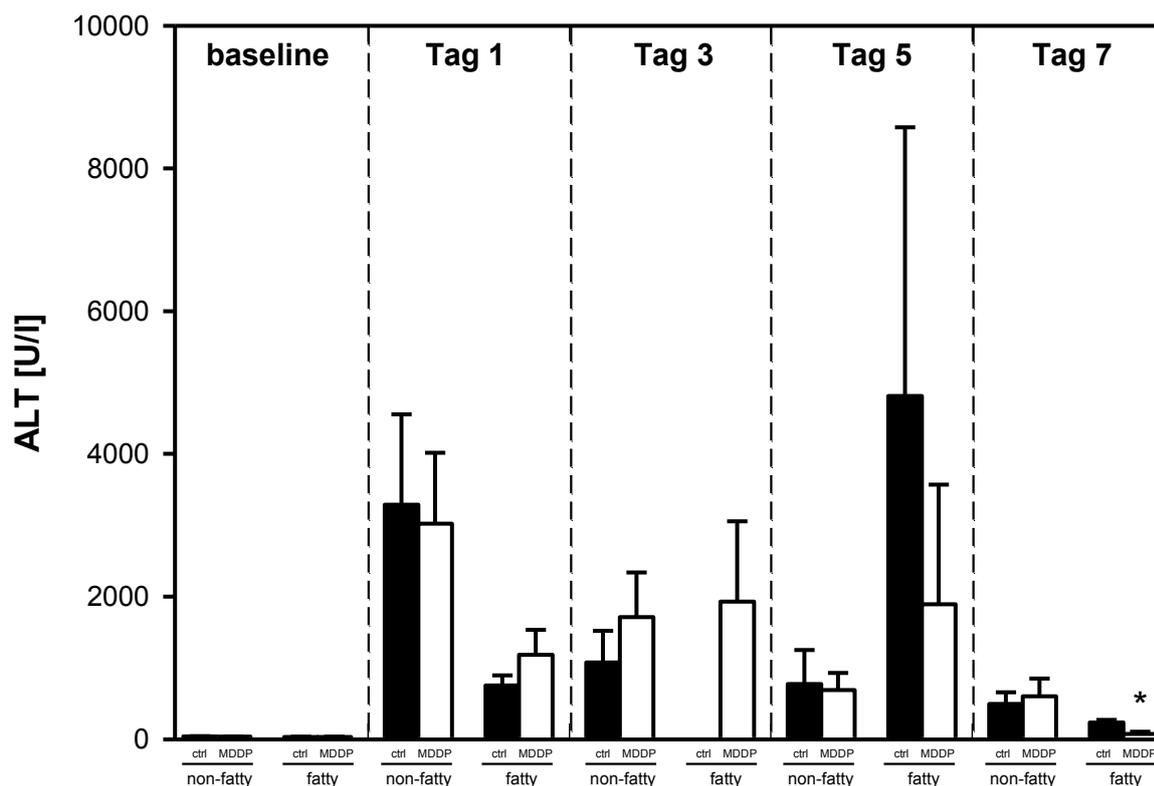


Abb. 25: ALT bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß) MW \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control

Die Analyse der ALT im Serum zeigte deutlich geringere Blutspiegel für die nicht-transplantierten *baseline*-Tiere mit Werten zwischen $33,00 \pm 3,70$ U/l und $39,75 \pm 2,75$ U/l im Vergleich zu den transplantierten Tieren. Ab Tag 1 nach der Transplantation kam es zu einem erheblichen Anstieg der ALT im Serum. Am Tag 7 hatte die ALT im Serum mit einem Minimum von $76,00 \pm 28,50$ U/l fast wieder den Ausgangswert der *baseline* Versuchstiere erreicht, wobei mit der MDDP-Präkonditionierung in der statistischen Analyse ein signifikanter Unterschied zu den Kontrolltieren am Tag 7 gezeigt werden konnte.

3.3.3 LDH

Die LDH kommt im Zytoplasma aller Zellen vor. Bei Zerstörung der zellulären Membran kommt es somit zu einem Anstieg im Blut. Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens ist sie jedoch nicht spezifisch für die Leber.

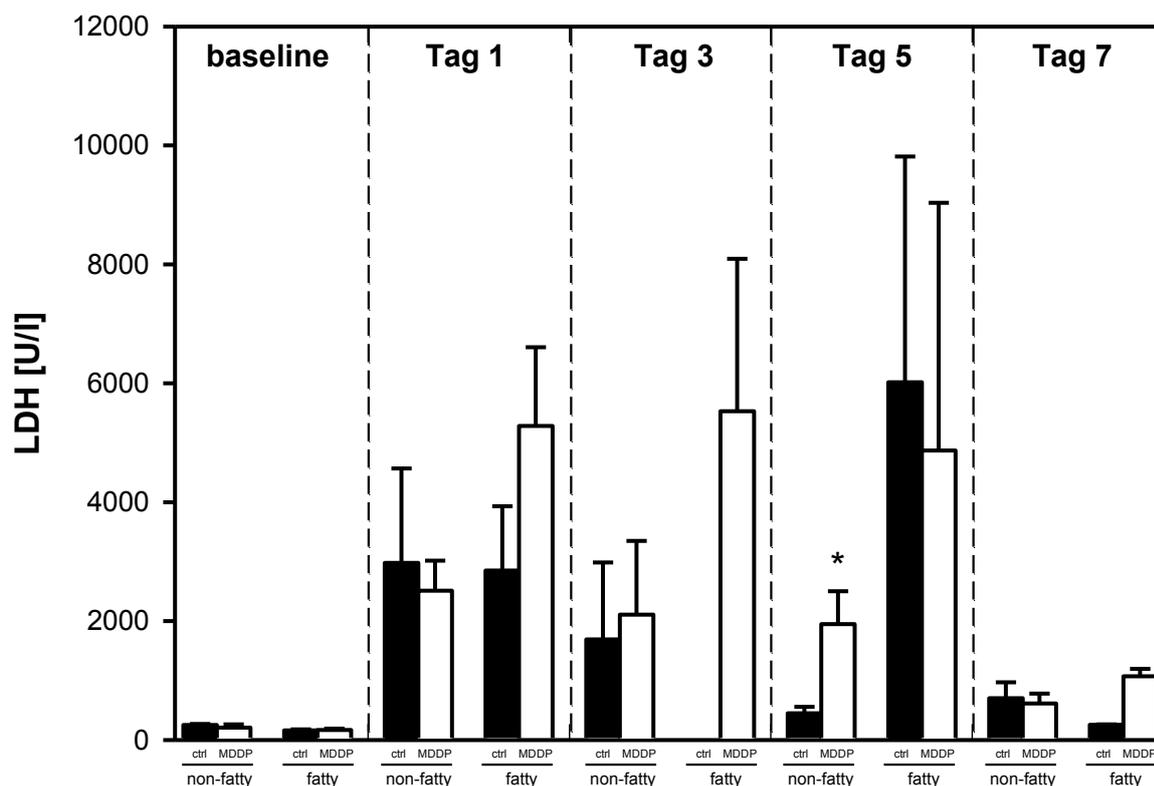


Abb. 26: LDH bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß). MW \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control.

Die LDH-Spiegel der nicht transplantierten *baseline*-Tiere lagen zwischen $160,00 \pm 17,67$ U/l und $252,00 \pm 16,16$ U/l und damit deutlich unter den Spiegeln der transplantierten Tiere. Schon ab Tag 1 kam es zu einem enormen Anstieg der LDH-Werte mit einem Maximum bei $5281,57 \pm 1323,67$ U/l bei Gruppe 10. Ab Tag 3 fielen die Spiegel der LDH wieder und erreichten zwischen Tag 5 und Tag 7 fast wieder die Ausgangswerte der *baseline*-Gruppe. Vor allem die LDH-Werte der steatotischen Tiere stiegen sehr stark an und blieben bis zum Tag 5 auf einem hohen Niveau bestehen. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich in der statistischen Analyse am Tag 5 bei den nicht-steatotischen Tieren zwischen Kontrollgruppe und MDDP-Gruppe.

3.3.4 γ -GT

Die γ -GT ist eine Transferase, die in verschiedenen Geweben vorkommt. Somit ist sie nicht spezifisch für eine hepatozelluläre Schädigung. Die Serumwerte der γ -GT korrelieren sehr gut mit dem Ausmaß der Organschädigung, insbesondere bei toxischen Leberschäden kommt es zu einer Ausschüttung der γ -GT.

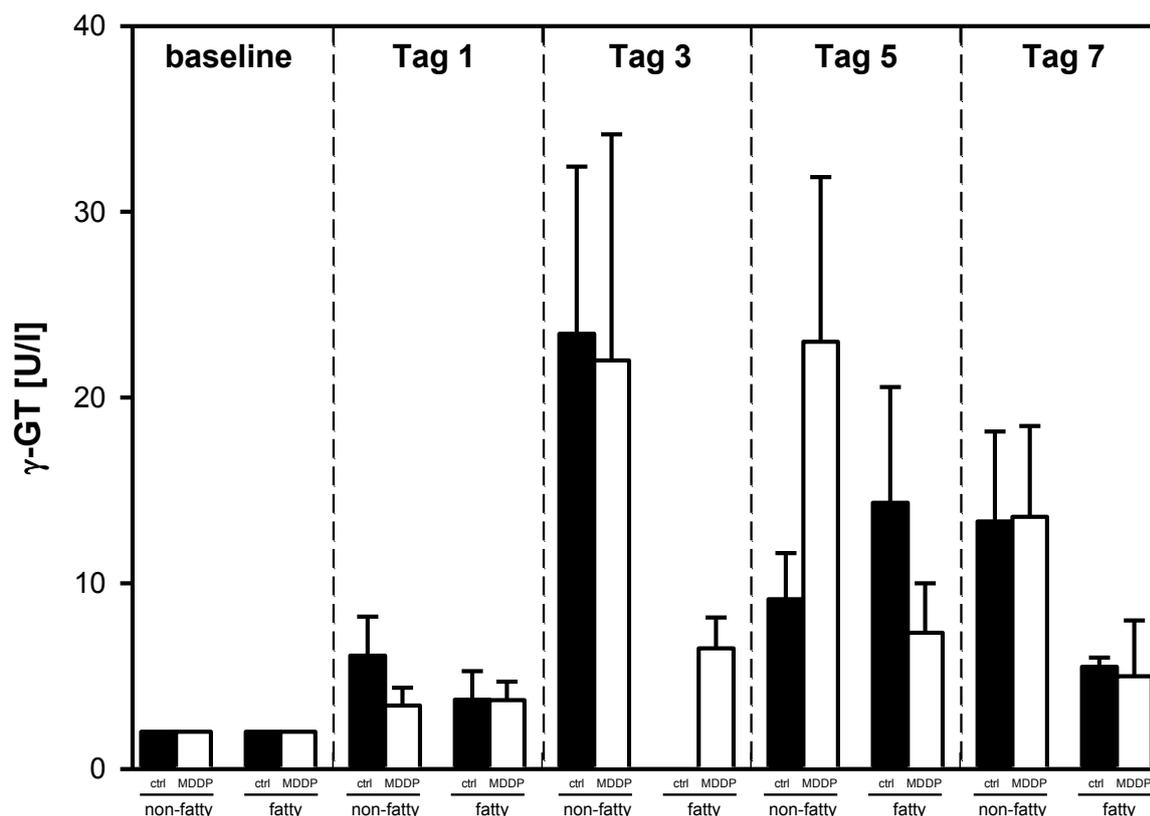


Abb. 27: γ -GT bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß) MW \pm SEM.

Die γ -GT zeigte einen verzögerten Anstieg nach der Transplantation bei allen Versuchsgruppen. Während am Tag 1 sämtliche γ -GT-Werte unter 10U/l ähnlich niedrig wie bei den nicht transplantierten baseline Tieren lagen, zeigte sich vor allem bei den nicht-steatotischen Versuchstieren ein starker Anstieg der γ -GT mit einem Maximum bei 23,43 \pm 9,00U/l bei Gruppe 3. Am Tag 7 waren die Blutspiegel bei allen Gruppen bereits wieder gesunken. Signifikante Unterschiede zeigten sich in der statistischen Analyse weder zwischen steatotischen und nicht-steatotischen Versuchstieren noch zwischen Kontrollgruppen und MDDP-Gruppen.

3.3.5 AP

Die alkalische Phosphatase ist nicht leberspezifisch, jedoch kann sie als klassischer Cholestaseparameter gut herangezogen werden, um diese zu quantifizieren. Dies wird in der Diskussion genauer beschrieben.

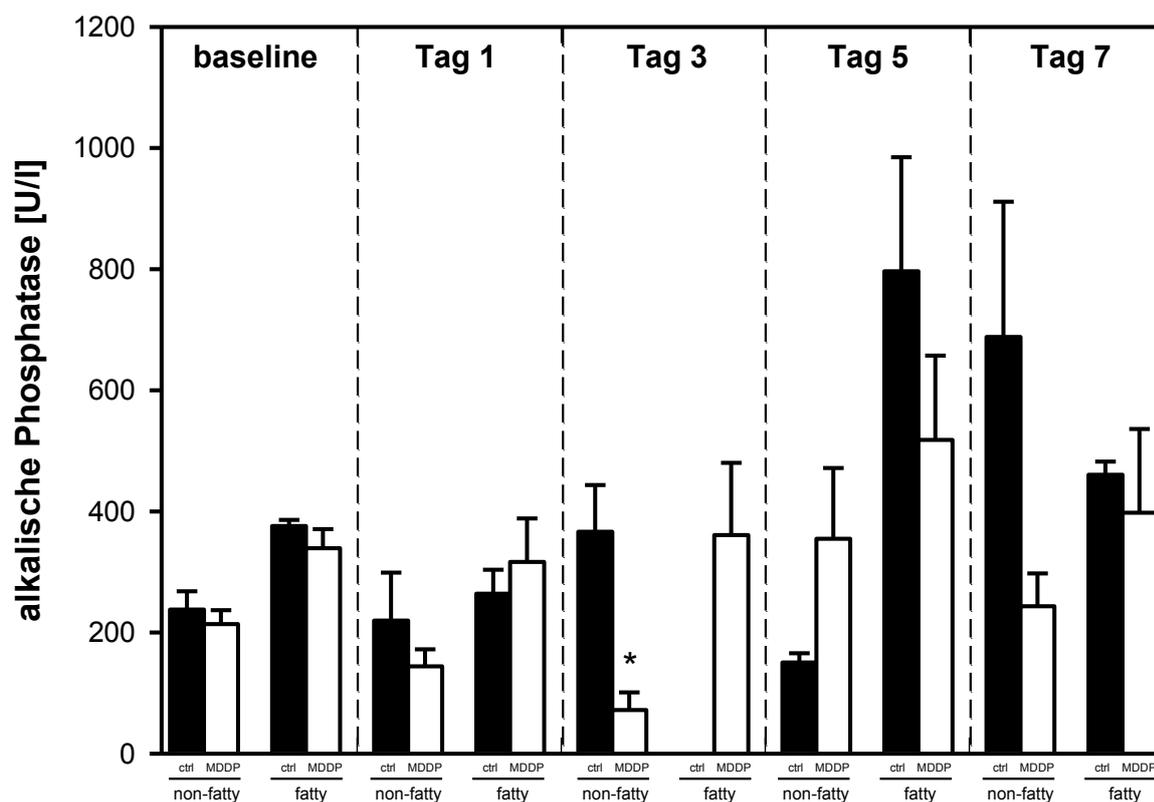


Abb. 28: aP bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß) MW ± SEM. * $p < 0.05$ vs. control

Die Analyse der alkalischen Phosphatase im Serum zeigte einen sehr verzögerten Anstieg. Bei den nicht-steatotischen, MDDP-präkonditionierten Versuchstieren (Gruppe 2 und 4) war an Tag 1 und Tag 3 sogar ein abfallender Blutspiegel zu sehen, der sich an Tag 3 signifikant von der Kontrollgruppe unterscheidet.

Der Maximalwert wurde mit $518,00 \pm 139,23$ von Gruppe 13 am Tag 5 erreicht. Auch an Tag 7 war kein deutlicher Abfall der aP-Werte im Serum zu erkennen.

3.3.6 Bilirubin

Bei Hämolyse, unzureichender hepatischer Konjugationsleistung oder Cholestase kommt es zu einem Anstieg des Bilirubins im Serum. Genaueres dazu folgt in der Diskussion.

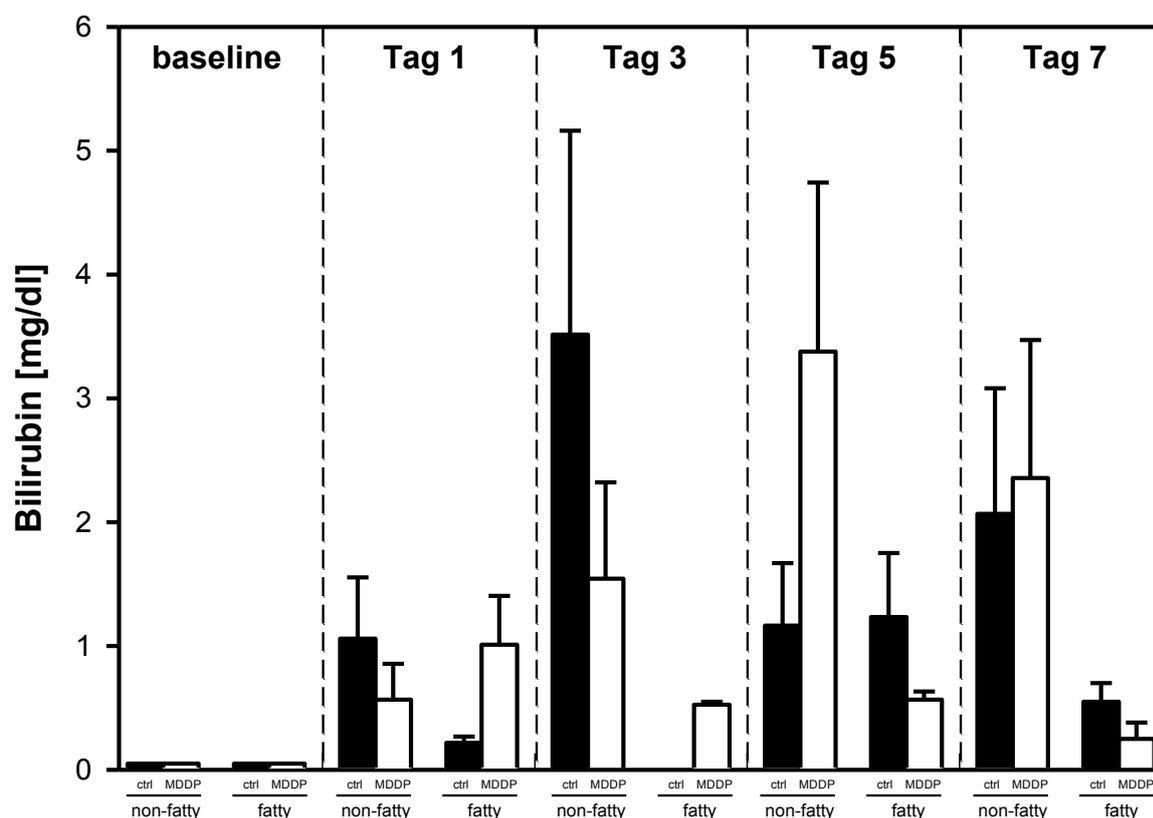


Abb. 29: Bilirubin bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß) MW \pm SEM

Die Analyse des Bilirubins im Serum zeigte bereits an Tag 1 bei allen Versuchsgruppen einen Anstieg des Bilirubins nach der Transplantation. Die höchsten Werte wurden an Tag 3 und Tag 5 erreicht (Gruppe 3 und Gruppe 6). Außerdem zeigte sich, dass der Bilirubinspiegel bei den nicht-steatotischen Versuchstieren weniger stark stieg. Signifikante Unterschiede zeigten sich in der statistischen Analyse weder zwischen steatotischen und nicht-steatotischen Versuchstieren noch zwischen Kontrollgruppen und MDDP-Gruppen.

3.3.7 Triglyceride

Die Triglyceride wurden im Serum bestimmt, um den Einfluss der MDDP-Präkonditionierung auf den Fettstoffwechsel zu zeigen.

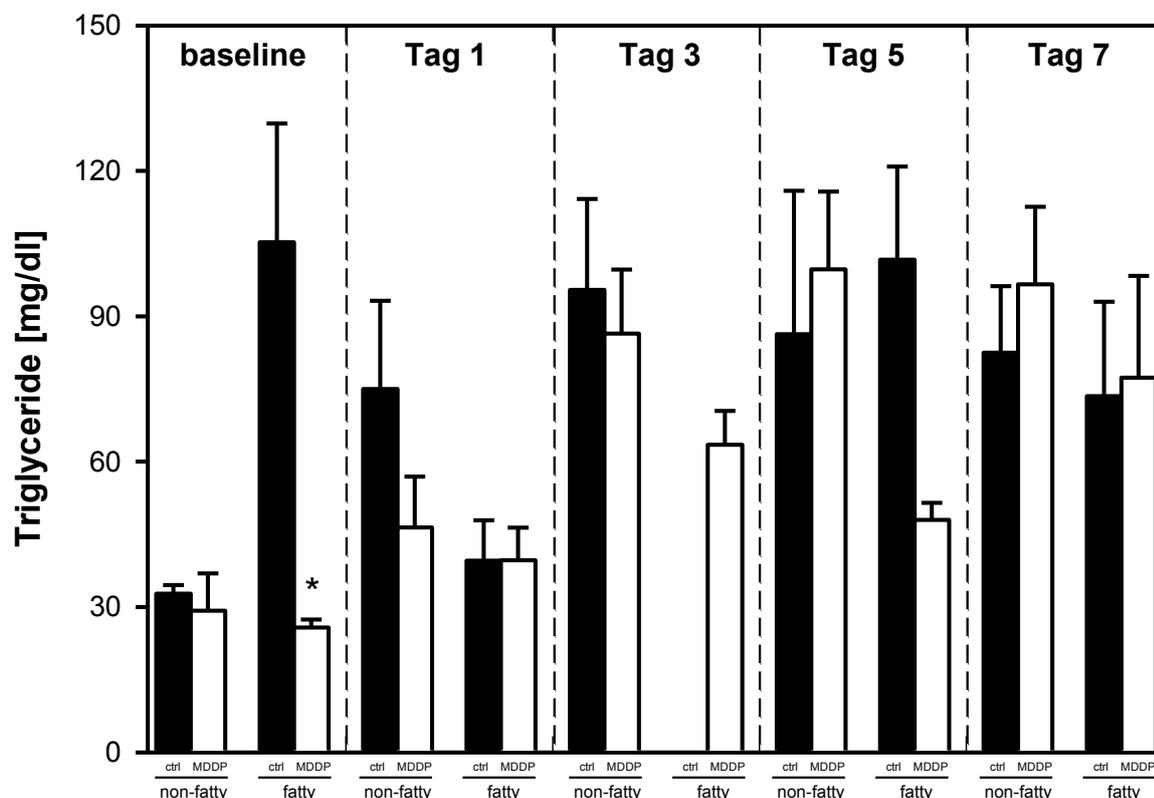


Abb. 30: Triglyceride bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß) MW \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control.

Bei der Analyse der Triglyceride im Serum zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den steatotischen *baseline*-Gruppen (Gruppe 19 und 20).

Sowohl bei den steatotischen Versuchsgruppen, als auch bei den nicht-steatotischen Versuchsgruppen zeigte sich nach der Transplantation ein Anstieg der Triglyceride im Serum, der zwischen Tag 3 und Tag 5 sein Maximum erreichte.

Signifikante Unterschiede zeigten sich in der statistischen Analyse nach der Transplantation weder zwischen steatotischen und nicht-steatotischen Versuchstieren, noch zwischen Kontrollgruppen und MDDP-Gruppen.

3.3.8 LDL

Die LDL wurde im Serum bestimmt, um den Einfluss der MDDP-Präkonditionierung auf den Fettstoffwechsel zu zeigen.

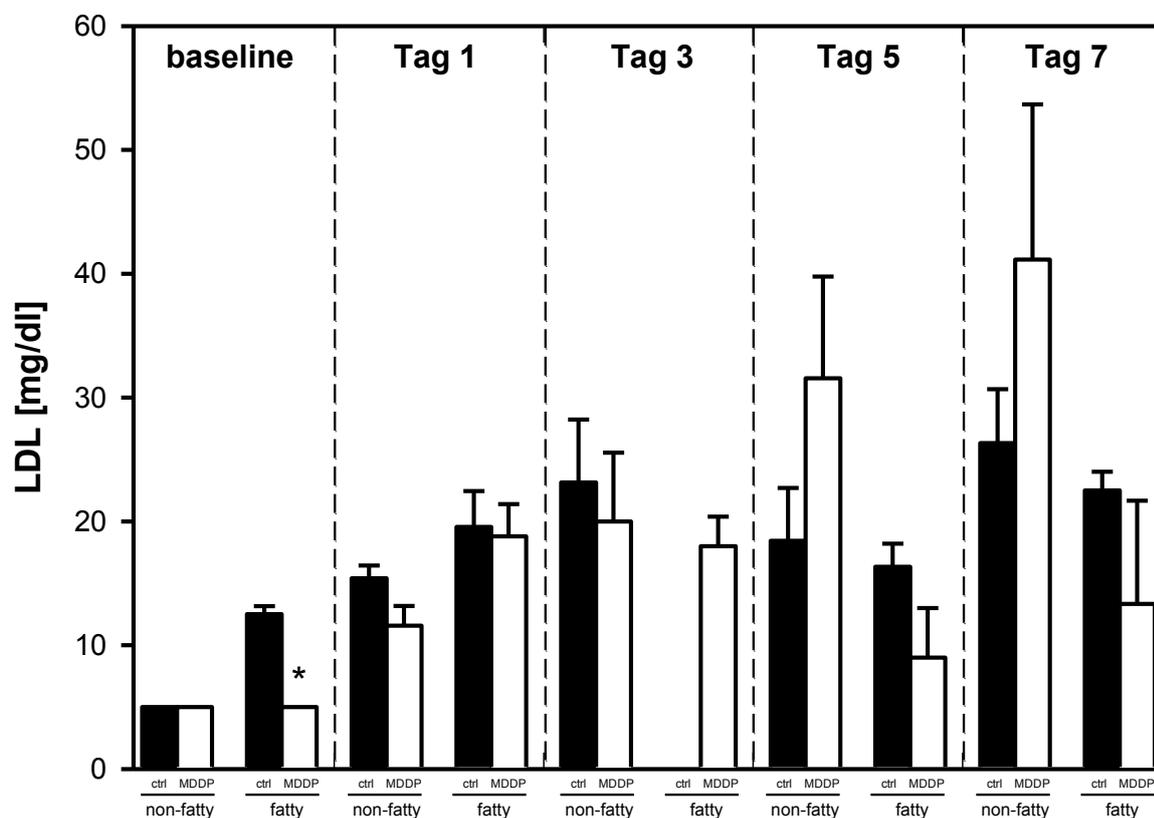


Abb. 31: LDL bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß) MW \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control.

Bei der Analyse der LDL im Serum zeigte sich, dass die MDDP-Präkonditionierung geringere LDL-Werte im Serum bei der steatotischen *baseline*-Gruppe (Gruppe 20) zur Folge hatte. Hier bestand in der statistischen Analyse ein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe (Gruppe 19). Weitere signifikante Unterschiede konnten in der statistischen Analyse nicht gezeigt werden. Die *baseline*-Tiere (Gruppe 17,18,20) zeigten deutlich geringere LDL-Werte als die Versuchstiere nach einer Transplantation. Während die LDL-Spiegel der nicht-steatotischen, präkonditionierten Versuchstiere (Gruppe 2,4,6,8) nach der Transplantation beständig angestiegen waren, blieben diese bei allen anderen Versuchsgruppen nach der Transplantation konstant oder fielen am Tag 5 bis Tag 7 bereits wieder ab.

3.3.9 HDL

Die HDL wurde im Serum bestimmt, um den Einfluss der MDDP-Präkonditionierung auf den Fettstoffwechsel zu zeigen.

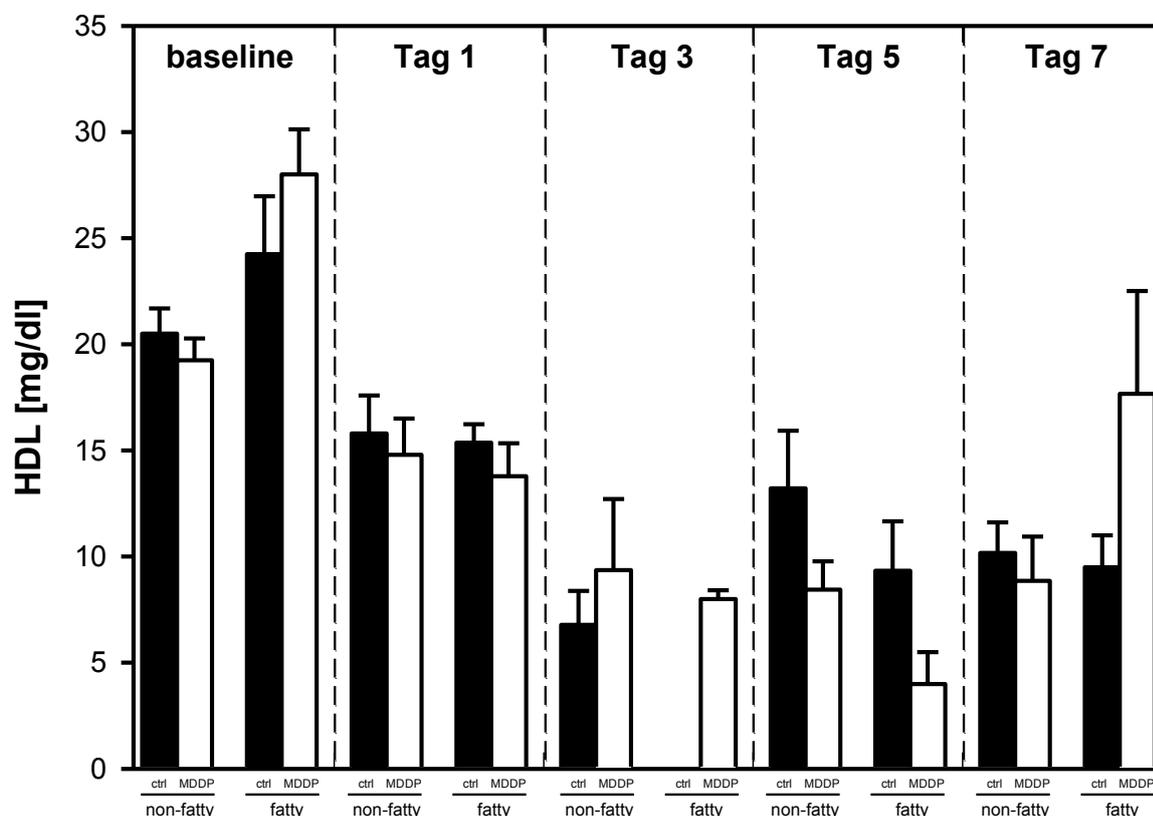


Abb. 32: HDL bei nicht-steatotischen (non-fatty) Lebern (Gruppe 17,1,3,5,7=control=schwarz vs. Gruppe 18,2,4,6,8=MDDP=weiß) und steatotischen (fatty) Lebern (Gruppe 19,9,11,13,15=control=schwarz vs. Gruppe 20,10,12,14,16=MDDP=weiß). MW \pm SEM.

Die Analyse der HDL im Serum zeigte für alle baseline Versuchstiere höhere Werte ($19,25 \pm 1,03$ - $28,00 \pm 2,12$ mg/dl) als die HDL-Werte der Versuchstiere nach einer Transplantation. Der höchste Wert von $17,67 \pm 4,84$ mg/dl wurde nach der Lebertransplantation von Gruppe 20 am Tag 7 erreicht.

Nach der Lebertransplantation fielen die HDL-Spiegel ab, wobei sie ihr Minimum zwischen Tag 3 und Tag 5 erreichten. Bis zu Tag 7 zeigten sich wieder steigende Werte der HDL. Signifikante Unterschiede zeigten sich in der statistischen Analyse nach der Transplantation weder zwischen steatotischen und nicht-steatotischen Versuchstieren, noch zwischen Kontrollgruppen und MDDP-Gruppen.

4. Diskussion

4.1 Das Modell - Zusammenfassung

Um das Verständnis für die nachfolgende Diskussion und Interpretation der Ergebnisse zu erleichtern, wird im Folgenden kurz die Grundlage dieser Studie und das für diese Studie verwendete Modell zusammengefasst. Dadurch soll ein Überblick über die große Anzahl an Versuchsgruppen, die erhobenen Parameter und die eingesetzte Methodik geschaffen werden.

Anhand einer vorangegangenen Studie konnten Moussavian et al. 2011 unter Verwendung eines Ex-vivo-Perfusionsmodells zeigen, dass eine MDDP-Präkonditionierung den Ischämie-/Reperfusionsschaden nach kalter Ischämie vermindert. Dazu wurden die medikamentös präkonditionierten Lebern 24 Stunden in kalter HTK-Lösung gelagert und anschließend maschinell für 60 Minuten über die Pfortader in einem offenen Perfusionsmodell perfundiert (Moussavian et al. 2011).

In unserer Studie wurden 162 Lebertransplantationen an männlichen, syngenen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Dabei galt es zu evaluieren, inwiefern sich die MDDP-Präkonditionierung auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden sowohl bei nicht-steatotischen als auch bei steatotischen Lebern im Rattenmodell auswirkt. Der Einfluss der MDDP-Präkonditionierung auf steatotische Lebern wurde zuvor durch von Heesen et al. 2012, ebenfalls in einem Ex-vivo-Perfusionsmodell evaluiert (von Heesen et al. 2012).

Die medikamentöse Präkonditionierung setzte sich, basierend auf der vorangegangenen Studie von Moussavian et al. 2011, aus Curcumin, Simvastatin, N-Acetylcystein, Erythropoietin, Pentoxiphyllin, Melatonin, Glycin und Methylprednisolon zusammen. Diese Medikamente wurden dem Spendertier vor der Explantation der Leber appliziert. Das Protokoll für das exakte Applikationsverfahren ist dem Abschnitt 2.3 zu entnehmen und entspricht dem Protokoll von Moussavian et al. 2011.

Um die pharmakologische Wirkung in ihrem Verlauf beurteilen zu können, wurden unterschiedliche Studienendpunkte von einem Tag, drei Tagen, fünf Tagen und sieben Tagen nach der Transplantation gewählt. Das Operationsverfahren der Versuchstiere mit steatotischen Lebern entsprach exakt dem Operationsverfahren der Versuchstiere mit nicht-steatotischen Lebern. Zusätzlich wurden Kontrollgruppen aus nicht

transplantierten Tieren für die jeweiligen Spenderorgane gebildet, um einen Vergleichswert zu erhalten. Insgesamt wurden 20 Versuchsgruppen gebildet. Die Leberverfettung wurde mittels einer LDC-Diät erreicht. Das Protokoll für die Herstellung und Fütterung der LDC-Diät ist dem Abschnitt 2.1 zu entnehmen.

Nach der Explantation wurden die Lebern acht Stunden in kalter (4° C) HTK-Lösung gelagert, bevor sie implantiert wurden. In unserem Modell kam eine Gasnarkose mit Sevofluran zum Einsatz. Operationstechnisch wurde für die Anastomose der suprahepatischen Vena cava inferior eine mikrochirurgische Naht, für die infrahepatische Vena cava inferior und die Vena portae eine Cuff-Technik und für den Ductus choledochus und die Arteria hepatica propria eine Splint-Technik angewendet.

Bei Erreichen des jeweiligen Studienendpunktes wurde bei allen Versuchstieren Blut abgenommen und eine Gewebeprobe der Leber für die histologische Auswertung in Formalin konserviert.

Um die Mikrozirkulation, Leukozyteninteraktion und Apoptosevorgänge beurteilen zu können, kam die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Die Fluoreszenzmikroskopie war in unserer Studie nur für Tiere mit einem Studienendpunkt von einem Tag nach der Transplantation durchführbar. Zu späteren Zeitpunkten war das Ausmaß intraabdomineller Adhäsionen so stark ausgeprägt, dass eine Mobilisation der Leber und Durchführung der Mikroskopie nicht mehr möglich war.

Als Floreszenzfarbstoffe kam Natriumfluorescein zum Einsatz, um das sinusoidale Perfusionsversagen zu detektieren, Bismenzimid, um Apoptosen zu erkennen und Rhodamin 6G, um Leukozyten anzufärben und damit die sinusoidale Leukostase, venuläre Leukozytenadhäsion und venuläre Entothel-Leukozyteninteraktion (*leucozyte rolling*) objektivieren zu können.

Im Blut wurden die Werte für AST, ALT, LDH, γ -GT, AP, Bilirubin, HDL, LDL und Triglyceride bestimmt, um das Ausmaß des Ischämie-/Reperfusionsschadens erfassen zu können, die Leberfunktion beurteilen zu können und den pharmakologischen Einfluss der Präkonditionierung sowohl bei steatotischen als auch bei nicht-steatotischen Lebern zu detektieren. Der Blutentnahmezeitpunkt bei den transplantierten Versuchstieren war kurz vor der Organentnahme. Das Blut wurde zentrifugiert und das Serum bei -80° C aufbewahrt.

Darüber hinaus wurden Gewebepräparate in HE-Färbung angefertigt, um den Gewebeschaden objektivieren zu können. Dabei wurden die Parameter Grobscholligkeit, Vakuolisierung, Organintegrität und Nekrose mittels eines semiquantitativen Scores beurteilt.

Bei den Ergebnissen der Histologie und den Blutwerten muss beachtet werden, dass die Versuchsgruppen am Tag 1 nach der Transplantation mit insgesamt 50 Versuchstieren eine deutlich höhere Validität bieten als beispielsweise die Versuchsgruppen am Tag 7 mit insgesamt nur 19 Versuchstieren.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 Pharmakologische Präkonditionierung

Erythropoietin

Erythropoietin ist ein Glykoprotein-Hormon, das hauptsächlich in der Niere, zu einem geringen Anteil jedoch auch in der Leber synthetisiert wird, wobei die Synthese durch Hypoxie verstärkt wird (Perez-Ruixo et al. 2008). Neben der Bekanntheit, die Erythropoietin aufgrund seiner stimulierenden Wirkung auf die Blutbildung in Dopingkandalen erreicht hat, gibt es noch zahlreiche weitere Wirkungen von Erythropoietin. Der protektive Effekt zur Verminderung des Ischämie-/Reperfusionsschadens liegt vor allem in einer antioxidativen und antiapoptotischen Wirkung, die durch eine verminderte TNF-Produktion und erhöhter eNOS-Expression begründet ist (Johnson et al. 2006; Lindenblatt et al. 2007; Liu et al. 2015; Sepodes et al. 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Ausschüttung der Transaminasen als Marker für das Ausmaß des Ischämie-/Reperfusionsschadens nach Vorbehandlung der Spendertiere mit Erythropoietin erheblich geringer ausfiel (Schmeding et al. 2009). Das Ergebnis dieser Arbeitsgruppe nach alleiniger Präkonditionierung mit Erythropoietin konnte in unserer Studie nach MDDP-Präkonditionierung nicht bestätigt werden, da sich kein signifikanter Unterschied der Ausschüttung der Lebertransaminasen zeigte. Vielmehr zeigte sich bei den

Versuchstieren von Tag 1 und Tag 3 sogar eine erhöhte Ausschüttung der Transaminasen nach MDDP-Präkonditionierung.

Darüber hinaus konnte auch eine verbesserte Mikrozirkulation, sowie ein verbessertes Langzeitüberleben nach Präkonditionierung mit Erythropoietin, wie sie von einer Arbeitsgruppe von Squadrito et al. 1999 nachgewiesen wurde, nach der MDDP-Präkonditionierung, wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde, nicht bestätigt werden. In unserer MDDP-Studie zeigte sich das sinusoidale Perfusionsversagen bei den Versuchstieren mit Fettlebern besonders ausgeprägt.

Das Ergebnis unserer MDDP-Studie zeigt eine Verschlechterung der Mikrozirkulation bei Fettlebern und steht damit mit zahlreichen weiteren Studien, welche die Mikrozirkulation bei steatotischen Lebern untersuchten, im Einklang (Bockhorn et al. 2008; Kuroda et al. 2015; Nagai et al. 2013; Squadrito et al. 1999). Eine Verbesserung der Mikrozirkulation nach MDDP-Präkonditionierung, wie sie von der Arbeitsgruppe von von Heesen et al. 2012 gezeigt wurde, konnte in unserer Studie nicht bestätigt werden.

Erklärt werden könnte dies mit einem möglicherweise toxischen Potential der Präkonditionierung, welches aufgrund der simultanen Injektion entsteht. Darüber hinaus sind auch die Wechselwirkungen der einzelnen Medikamente und deren Wirkung nach simultaner Injektion auf den Organismus, insbesondere nach einer Lebertransplantation, noch nicht hinreichend erforscht.

Curcumin

Curcumin ist ein gelber Farbstoff, der natürlicherweise in der Gelbwurzel vorkommt. Neben zahlreichen Anwendungen in der Kosmetik und Lebensmittelindustrie wird er auch in medizinischen Bereichen angewendet. Dabei ist neben seiner antioxidativen Komponente vor allem seine antiinflammatorische Wirkung, vermittelt durch eine Hemmung der entzündungsfördernden Enzyme Cyclooxygenase-2 (COX-2), Lipoxygenase (LOX) und induzierbare NO-Synthase (iNOS) entscheidend (Menon und Sudheer 2007).

Eine Arbeitsgruppe von Shen et al. konnte 2007 im Rattenmodell zeigen, dass der Ischämie-/Reperfusionsschaden nach Präkonditionierung mit Curcumin signifikant geringer ausfiel. Insbesondere wurde eine geringere Ausschüttung der

Lebertransaminasen bei den präkonditionierten Tieren festgestellt. Der protektive Effekt wurde mit einer verstärkten Expression von Hsp70 und antioxidativen Enzymen begründet (Shen et al. 2007).

Ebenso wies eine Arbeitsgruppe von Fan et al. 2014 einen protektiven Effekt auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden von Curcumin infolge einer geringeren Expression von ICAM-1 und NF- κ B mit einer resultierenden geringeren Transaminasenausschüttung im Rattenmodell nach (Fan et al. 2014).

Dieser protektive Einfluss auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden von Curcumin in Kombination mit den weiteren Pharmaka dieser MDDP-Studie konnte nicht bestätigt werden. Die Ausschüttung der Transaminasen zeigte sich, insbesondere bei Versuchstieren mit Fettlebern, nach MDDP-Präkonditionierung erhöht.

Simvastatin

Der HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin hemmt die Reduktion von 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A zu Mevalonat (Gracia-Sancho et al. 2013). Dadurch kommt es zu einer Begrenzung der hepatischen Cholesterinsynthese. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass sich Simvastatin positiv auf okklusive Venenerkrankungen auswirkt, indem es die Proliferation glatter Muskulatur begrenzt, die Thrombozytenadhäsion vermindert, die Endothelfunktion verbessert sowie einen antiinflammatorischen Effekt ausübt (Indolfi et al. 2000; Musial et al. 2001; Schror 1990; Vevera et al. 2016; Yeung und Tsao 2002).

Eine Arbeitsgruppe von Gracia-Sancho et al. 2013 präkonditionierte Ratten mit Simvastatin und untersuchte nach 16 Stunden kalter Ischämie die Mikrozirkulation. Diese stellte sich bei den vorbehandelten Lebern deutlich verbessert dar und steht damit im Einklang mit dem Ergebnis unserer Studie im Sinne eines geringeren Anteils von sinusoidalem Perfusionsversagen bei den nicht-steatotischen Tieren nach der MDDP-Präkonditionierung. Warum sich dieser protektive Effekt bei Spendertieren mit Fettlebern nicht bestätigte, bleibt dabei unklar und sollte Anlass für weitere Studien geben.

Unsere Studie zeigt eine verschlechterte Mikrozirkulation im Sinne eines höheren Anteils von sinusoidalem Perfusionsversagen bei Fettlebern sowohl für Versuchstiere mit MDDP-Präkonditionierung als auch für Tiere ohne MDDP-Präkonditionierung

gegenüber den nicht-steatotischen Versuchstieren. Dieses Ergebnis einer schlechteren Mikrozirkulation bei Fettlebern stimmt mit zahlreichen weiteren Studien überein (Bockhorn et al. 2008; Kuroda et al. 2015; Nagai et al. 2013; Squadrito et al. 1999).

Pentoxifyllin

Pentoxifyllin ist ein Methylxanthinderivat und Phosphodiesterasteinhibitor, der seit Jahren Verwendung in der Behandlung von peripheren Gefäßkrankheiten findet. Nishizawa et al. 1997 konnten in einer Studie zeigen, dass Pentoxifyllin auch den Ischämie-/Reperfusionsschaden vermindert.

Durch eine Pentoxifyllin vermittelte Inhibierung der TNF- α Synthese kommt es zu einer verminderten Aktivierung von Kupfferzellen (Rudiger und Clavien 2002). Darüber hinaus inhibiert Pentoxifyllin die Freisetzung der intrazellulären cyclischen Adenosin Monophosphat Diesterase, was wiederum gesteigerte Spiegel an cyclischen Adenosin Monophosphat zur Folge hat und damit eine Vasodilatation bewirkt (Semmler et al. 1993; Sinha et al. 1995).

Weitere Wirkmechanismen sind die erhöhte Flexibilität roter Blutkörperchen, erniedrigte Viskosität des Blutes und verminderte Thrombozytenaggregation. Sämtliche Effekte haben damit eine verbesserte Mikrozirkulation zur Folge (Gastpar et al. 1977; Ward und Clissold 1987).

Diese Verbesserung der Mikrozirkulation konnte im Rahmen dieser MDDP-Studie nicht gezeigt werden. Insbesondere bei den Versuchstieren mit Fettlebern zeigte sich eine verschlechterte Mikrozirkulation nach der MDDP-Präkonditionierung. Dabei viel das sinusoidale Perfusionsversagen nach MDDP-Präkonditionierung sogar signifikant schlechter aus. Wie bereits beschrieben muss hierfür möglicherweise eine toxische Wirkung der MDDP-Pharmaka auf den vorgeschädigten Organismus des Empfängertiers angenommen werden.

Melatonin

Melatonin ist ein Hormon, das von den Pinealozyten der Epiphyse aus Serotonin synthetisiert wird. Die bekannteste Wirkung ist die Regulation des Tag-Nacht-Rhythmus. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Melatonin darüber hinaus eine antioxidative Wirkung hat und dadurch den Ischämie-/Reperfusionsschaden vermindern kann (Kim und Lee 2008; Korkmaz et al. 2009; Sun et al. 2017).

Insbesondere zeigten sich bei den Ex-vivo-Versuchen von Kim und Lee 2008 nach Präkonditionierung mit Melatonin eine signifikante Reduktion der Ausschüttung von Transaminasen und eine geringere Apoptoserate nach 60-minütiger kalter Ischämie mit anschließender fünfstündiger Perfusion. Während diese verminderte Apoptoserate in unserer MDDP-Studie nach der Präkonditionierung für nicht-steatotische Tiere bestätigt werden konnte, fiel die Apoptoserate bei steatotischen Versuchstieren deutlich erhöht aus. Dies muss wiederum auf einen Apoptose-induzierenden Effekt der MDDP-Präkonditionierung bei Fettlebern zurückgeführt werden. Auch eine verminderte Ausschüttung der Transaminasen nach MDDP-Präkonditionierung konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Glycin

Der nicht-essenziellen Aminosäure Glycin konnte ebenfalls in Studien eine Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschaden nach kalter Ischämie nachgewiesen werden. Die Wirkung liegt in einer verminderten Aktivierung von Kupfferzellen und damit in einer deutlichen Reduktion der Freisetzung von TNF- α begründet (Duenschede et al. 2006). Die Arbeitsgruppe von Duenschede et al. 2006 stellte bei der Versuchsgruppe nach Glycin-Präkonditionierung eine verminderte Apoptoserate fest, wie sie sich auch in unserer MDDP-Studie bei nicht-steatotischen Tieren zeigt. Jedoch fiel die Apoptoserate nach MDDP-Präkonditionierung bei steatotischen Tieren deutlich verstärkt aus.

Eine Verminderung des Ischämie-/Reperfusionsschadens, wie er in den ex-vivo-Versuchen von Moussevian et al. 2011 und von Heesen et al. 2012 sowohl für steatotische als auch für nicht-steatotische Versuchstiere nach MDDP-Präkonditionierung gezeigt werden konnte, bestätigte sich in den In-vivo-Versuchen

dieser Studie nicht, insbesondere bei Betrachtung der Ausschüttung von Lebertransaminasen und der Beurteilung der Mikrozirkulation (Moussavian et al. 2011; von Heesen et al. 2012). Vor allem bei den Versuchstieren mit Fettlebern weisen diese Parameter auf ein toxisches Potential der MDDP-Präkonditionierung hin.

Methylprednisolon

Schon 1975 konnte gezeigt werden, dass eine Präkonditionierung mit Methylprednisolon im Rattenmodell ein deutlich verbessertes Überleben nach hepatischer Ischämie bedingt (Santiago Delpin et al. 1975). Es wird angenommen, dass Methylprednisolon neben einer Verminderung des preservationsbedingten Kupferzellschadens, die lysosomale Zellmembran stabilisiert, oder toxische Substanzen inhibiert, die während der Ischämie freigesetzt werden (Chimalakonda und Mehvar 2004; Wang et al. 1996).

Eine Arbeitsgruppe von Chiappa et al. 2004 zeigte, dass eine Präkonditionierung mit Methylprednisolon bei Ratten zu einer signifikanten Reduktion der Transaminasenausschüttung nach Reperfusion führte, ohne jedoch das Gesamtüberleben der Versuchstiere zu verbessern (Chiappa et al. 2004). Dieses Ergebnis steht damit nicht im Einklang mit dem Ergebnis dieser MDDP-Studie, da die Präkonditionierung die Ausschüttung der Transaminasen nicht vermindern konnte.

Zusammenfassend zeigte sich bei der Betrachtung der verwendeten Medikamente der MDDP-Präkonditionierung, wie sie in dieser Studie durchgeführt wurde, dass die Ergebnisse der vorrausgegangenen Ex-vivo-Studien von Moussevian et al. 2011 und von Heesen et al. 2012 für In-vivo-Versuche nicht bestätigt werden konnten. Während Moussevian et al. 2011 und von Heesen et al. 2012 sowohl für steatotische als auch für nicht-steatotische Versuchstiere im offenen Perfusionsmodell eine deutliche Verminderung des Ischämie-/Reperfusionsschadens feststellen konnte, bestätigte sich dieser protektive Effekt in unserem In-vivo-Modell nicht (Moussavian et al. 2011; von Heesen et al. 2012). Diese Diskrepanz der Ergebnisse wird im Folgenden versucht zu erklären.

Dabei muss zum Verständnis angemerkt werden, dass sich die Modelle dieser Studien zwar bei den verwendeten Pharmaka und deren Dosierung entsprechen, sie sich jedoch in vielen anderen Punkten deutlich unterscheiden: Während bei Moussevian et

al. 2011 und von Heesen et al. 2012 ein Ex-vivo-Modell mit offener Perfusion gewählt wurde, kam bei unserer Studie ein In-vivo-Modell zum Einsatz. Bei In-vivo-Versuchen spielen daher weitere Variablen, wie sie beispielsweise bei der Durchführung der Operation und damit einem Stressfaktor für den Organismus des Empfängertiers auftreten sowie die Wirkungen der Medikamente auf einen vorgeschädigten Organismus und nicht zuletzt die Wechselwirkungen der Medikamente in einem lebenden Organismus eine Rolle. Diese Unterschiede zwischen ex vivo und in vivo Versuchen können demzufolge angeführt werden, um einen Erklärungsansatz für die Divergenz der Ergebnisse zu liefern.

Darüber hinaus unterscheiden sich teilweise die untersuchten Parameter zur Quantifizierung des Ischämie-/Reperfusionsschadens sowie die angewendeten Methoden: Während beispielsweise für die Quantifizierung der Apoptoserate bei Moussevian et al. 2011 die Caspase-3-Aktivität bestimmt wurde, kam in dieser MDDP-Studie eine Quantifizierung mittels Intravitalmikroskopie zum Einsatz.

Nicht zuletzt wurden auch in beiden Studien unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte für die Erhebung der Parameter betrachtet: Während Moussevian et al. 2011 ihre Ergebnisse 1 Minute, 30 Minuten und 60 Minuten nach der offenen Perfusion erhoben, lag das Augenmerk dieser MDDP-Studie in der Langzeitentwicklung nach der Transplantation, sodass die Parameter 1 Tag, 3 Tage, 5 Tage und 7 Tage nach der Transplantation erhoben wurden.

Diese Unterschiede zwischen den unterschiedlichen verwendeten Modellen sowie die Unklarheiten der pharmakologischen Wirkungen und Wechselwirkungen und damit eines potentiell toxischen Potentials der verwendeten Medikamente der Präkonditionierung auf den Empfängerorganismus nach einer Lebertransplantation müssen als Grundlage gesehen werden, um die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien zu verstehen. Darüber hinaus gilt es in zukünftigen Studien diese Variablen und Wechselwirkungen, wie sie bei In-vivo-Versuchen entstehen, zu detektieren und dahingehend den potentiell toxischen Einfluss dieser MDDP-Präkonditionierung beeinflussen zu können.

4.2.2 Aussagekraft der Laborwerte

Die klassischen Laborparameter, welche die Leberfunktion beurteilen, beziehungsweise einen Hinweis auf eine Schädigung der Leber geben sind die γ -GT, AST, ALT, GLDH, LDH, alkalische Phosphatase und Bilirubin (Chiu et al. 2005). Darüber hinaus wurden in unserer Studie die Laborwerte des Fettstoffwechsels (LDL, HDL, Triglyceride) untersucht, um die Auswirkung der LDC-Diät auf den Fettstoffwechsel zu veranschaulichen und insbesondere den Effekt der MDDP-Präkonditionierung auf Versuchstiere mit Fettlebern zu veranschaulichen.

Die ALT (Alanin-Aminotransferase) hat ihre höchste Konzentration im Zytoplasma der Hepatozyten. Dahingehend bewirkt eine Leberschädigung, die zu einer gestörten Integrität der Zellmembran führt, einer Erhöhung der ALT. Demzufolge ist sie spezifisch für nekrotische Leberschäden. Die AST ist hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert. Allerdings kommt sie auch in Herz- und Skelettmuskulatur vor und ist damit nicht spezifisch für die Leber. Wenn bei einer Gewebeschädigung die mitochondriale Membran intakt bleibt, während die Zellmembran des Hepatozyten bereits zerstört ist, kann die AST noch im Normalbereich liegen, während die ALT bereits erhöht ist. Erst bei schwersten Gewebeschäden mit einer Freisetzung der AST aus den Mitochondrien kommt es zu einer deutlichen Erhöhung im Blut. Der de-Ritis-Quotient setzt die AST und ALT miteinander ins Verhältnis. Danach können Aussagen getroffen werden, ob es sich bei der Gewebeschädigung eher um eine akute oder chronische Schädigung handelt, beziehungsweise wie stark das Ausmaß der Schädigung ist (Botros und Sikaris 2013; Chiu et al. 2005; Torkadi et al. 2014).

In der Studie von Moussevian et al. 2011 wurde nach der MDDP-Präkonditionierung die Ausschüttungen der AST und ALT in einem offenen Perfusionsmodell nach 60 minütiger Perfusion bestimmt, um die Leberzellschädigung zu quantifizieren. Diese war nach kalter Ischämie sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die MDDP-Gruppe deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Fettleber.

Auch in unserer MDDP-Studie kam es am Tag 1 nach der Transplantation zu einem starken Anstieg der Transaminasen und zeigt damit eine ausreichend lange Ischämiezeit mit konsekutiver Leberzellschädigung für alle Versuchsgruppen an. Darüber hinaus konnte Moussevian et al. 2011 zeigen, dass die MDDP-Präkonditionierung insbesondere bei steatotischen Versuchstieren zu einer signifikant geringeren Ausschüttung von AST und ALT nach 60-minütiger Perfusion führte.

Unsere MDDP-Studie konnte diesen protektiven Effekt der MDDP-Präkonditionierung im In-vivo-Versuch nicht bestätigen. Bei den steatotischen Versuchstieren kam es im Verlauf sogar zu einer stärkeren Ausschüttung der Transaminasen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

Einen ähnlichen Verlauf der Lebertransaminasen nach einer Transplantation konnte eine Arbeitsgruppe von Schön et al. 2001 zeigen. Hier wurden Schweinelebern normothermisch extrakorporal perfundiert und anschließend transplantiert. Nach der Transplantation zeigte sich ein starker Anstieg der AST am ersten Tag, welcher dann im Verlauf bis zum siebten Tag nach der Transplantation deutlich rückläufig war (Schön et al. 2001). Auch bei unseren Versuchen zeigte sich diese enorme Transaminasenausschüttung am ersten Tag nach der Transplantation, welche dann im Verlauf sogar noch weiter zunahm, jedoch ebenso bis zum siebten Tag nach der Transplantation wieder rückläufig war.

Obwohl die γ -GT (Gamma-Glutamyl-Transferase) ein Enzym ist, das in Leber, Nieren, Bauchspeicheldrüse, Dünndarm, Milz und anderen Geweben vorkommt, ist sie bei einer Erhöhung ein sehr empfindlicher Parameter für eine Schädigung des Lebergewebes und des Gallengangsystems. Dabei korrelieren die Laborwerte mit dem Ausmaß der Leberschädigung. Schon bei einer leichten Leberschädigung erhöht sich die γ -GT. Besonders hohe Werte werden bei Alkoholismus, Vergiftungen und Cholestase erreicht. Auch eine Leberverfettung kann eine Erhöhung der γ -GT bewirken (Pischke et al. 2017; Tang et al. 2007).

In unserer MDDP-Studie zeigte sich ebenfalls ein starker Anstieg der γ -GT, der am Tag 1 nach der Transplantation noch moderat ausfällt und schließlich sein Maximum zwischen Tag 3 und Tag 5 nach der Transplantation findet. Dies zeigt den Verlauf der Leberzellschädigung und gibt insbesondere einen Hinweis für einen potentiell toxischen Effekt der Präkonditionierung für die Leberzellfunktion.

Die alkalische Phosphatase kommt in einer Vielzahl von Geweben wie beispielsweise Dünndarm, Plazenta, Keimzellen, Niere, Knochen und Leber vor. Labormedizinisch hat sie eine Bedeutung für die Beurteilung der Leberfunktion, insbesondere als Cholestaseparameter. Sie ist jedoch ein sehr unspezifischer Parameter, da zu hohe Werte darüber hinaus auch bei Erkrankungen der Schilddrüse oder der Bauchspeicheldrüse, sowie vor allem bei Knochenerkrankungen wie Osteomalazie,

Morbus Paget, Rachitis, Hyperparathyreoidismus, Knochenbrüchen und Knochenmetastasen vorkommen (Rangaswamy et al. 2017; Thapa et al. 2010).

In unserer MDDP-Studie kam es zu einem verzögerten Anstieg der alkalischen Phosphatase mit Maximalwerten zwischen Tag 5 und Tag 7 nach der Transplantation. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem ebenfalls verzögert ansteigendem Bilirubin und deutet auf ein primäres Organversagen, welches sich postoperativ entwickelt, hin. Bilirubin entsteht beim Abbau von Hämoglobin. Es wird an Albumin gebunden als indirektes Bilirubin zur Leber transportiert. Dort wird es konjugiert und als direktes Bilirubin mit der Galle in den Darm ausgeschieden. Somit kommt es bei obstruktiver Cholestase vor allem zu einem Anstieg des direkten Bilirubins, wohingegen bei nicht obstruktiver Cholestase, sowie bei verminderter Konjugationsleistung vor allem das indirekte Bilirubin ansteigt. Da bei der Sektion der Tiere eine Cholestase im Sinne eines posthepatischen Ikterus makroskopisch ausgeschlossen wurde und es im Rahmen der Studie keinen Hinweis auf das Vorliegen eines prähepatischen Ikterus infolge Hämolyse gibt, ist davon auszugehen, dass die erhöhten Bilirubinwerte auf einer intrahepatischen Funktionsstörung beruhen.

Eine Arbeitsgruppe von Vollmer et al. 1994 konnte mittels Intravitalmikroskopie zeigen, dass eine Reduktion des Galleflusses und ein Anstieg der Lebertransaminasen mit einer verminderten Mikrozirkulation der Leber korrelieren. Dies ist auf eine Zellschwellung infolge des Ischämie-/Reperfusionsschadens und insbesondere auf eine verstärkte Vakuolisierung zurückzuführen (Vollmar et al. 1994). Auch in der Studie von Moussevian et al. 2011 wurde ein reduzierter Gallenfluss nach 60-minütiger Perfusion gemessen. Dieser war für die Versuchstiere nach MDDP-Präkonditionierung jedoch höher als ohne pharmakologische Präkonditionierung. Dieser protektive Effekt der MDDP-Präkonditionierung mit verminderter intrahepatischer Zellschwellung und konsekutiv höherem Gallefluss konnte in unserer In-vivo-MDDP-Studie nicht nachgewiesen werden.

4.2.3 Mikrozirkulation und Histologie

Störungen der Mikrozirkulation tragen maßgeblich zur Manifestation von primärem Organversagen bei (Vollmar et al. 1993). Dies ist neben einer Freisetzung von TNF- α infolge Hypoxie auch auf Kongestion und Schwellung der Endothelzellen mit konsekutiv verminderter Mikrozirkulation zurückzuführen (Isaka et al. 2000). Dieser Pathomechanismus ist bei steatotischen Lebern stärker ausgeprägt als bei nicht-steatotischen Lebern und kann auf den höheren Gehalt lipidhaltiger Vakuolen in den Hepatozyten zurückgeführt werden (von Heesen et al. 2012).

Die Beurteilung der Mikrozirkulation nach der Transplantation wurde mittels intravitale Mikroskopie vorgenommen. Anhand des Perfusionsdefizites der Sinusoide konnte hierbei das Perfusionsversagen quantifiziert werden. Die Lebertransplantation führte dahingehend bei einem Untersuchungszeitpunkt von 24 Stunden nach der Transplantation zu massiven Störungen der Mikrozirkulation in allen Versuchsgruppen, jedoch mit unterschiedlich starker Ausprägung. Ursächlich liegt diesem sinusoidalen Perfusionsversagen eine Zellschwellung insbesondere der Sinusepithelzellen infolge des Ischämie-/Reperfusionsschadens zugrunde (Vollmar et al. 1994).

Innerhalb der nicht-steatotischen Lebern zeigte sich nach der MDDP-Präkonditionierung eine geringfügig verbesserte, jedoch nicht signifikant verbesserte Perfusion gegenüber der Kontrollgruppe.

Die steatotischen Lebern zeigten demnach ein stärkeres Perfusionsversagen nach Transplantation, als die nicht-steatotischen Lebern. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ex-vivo-Versuchen der Arbeitsgruppe von von Heesen et al. 2012, die eine stärkere Ausprägung des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei steatotischen Lebern gegenüber nicht steatotischen Lebern zeigten.

In unserer Studie war nach MDDP-Präkonditionierung dieser Perfusionsausfall jedoch signifikant erhöht. Dieses Ergebnis unseres In-vivo-Modells widerspricht daher den Ex-vivo-Versuchen der Arbeitsgruppe von von Heesen et al. 2012, welche einen protektiven Effekt der MDDP-Präkonditionierung auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden bei steatotischen Lebern aufzeigte.

Daher muss bei einem Zeitintervall von 24 Stunden nach der Transplantation davon ausgegangen werden, dass bei steatotischen Lebern die angewendete MDDP-

Präkonditionierung zu einer verschlechterten Mikrozirkulation geführt hat. Dies ist möglicherweise auf ein toxisches Potential der Pharmaka zurückzuführen, welches durch deren simultane Injektion und damit zu potentiellen Wechselwirkungen der Pharmaka nach einer Transplantation entsteht.

Ebenso zeigt die hepatozelluläre Apoptoserate einen potentiell schädlichen Effekt einer MDDP-Präkonditionierung, wie sie in dieser Studie angewendet wurde. Hierbei zeigte sich eine stark erhöhte Apoptoserate bei steatotischen Lebern nach Präkonditionierung gegenüber den nicht präkonditionierten Lebern. Dieser Unterschied erreichte jedoch kein Signifikanzniveau.

Die Arbeitsgruppe von von Heesen et al. 2012 zeigte ebenso eine höhere Apoptoserate bei steatotischen Lebern gegenüber nicht-steatotischen Lebern. Jedoch konnte diese Arbeitsgruppe bei steatotischen Lebern nach MDDP-Präkonditionierung im Ex-vivo-Versuch eine deutlich verringerte Apoptoserate zeigen. Dieses Ergebnis steht daher im Widerspruch zu dem Ergebnis unserer MDDP-Studie, welche ein stark erhöhte Apoptoserate nach MDDP-Präkonditionierung bei steatotischen Lebern zeigte (von Heesen et al. 2012). Daher muss davon ausgegangen werden, dass die simultane Injektion der Medikamente zu einer Apoptoseinduktion 24 Stunden nach einer Transplantation bei Fettlebern führt.

Neben Störungen der Mikrozirkulation führte die Transplantation auch zu einer massiven Entzündungsreaktion. Diese wurde ebenso mittels intravitaler Mikroskopie quantifiziert. Dabei wurden voneinander unabhängig die mikrovaskuläre Leukozytenrekrutierung sowohl in den Sinusoiden, als auch in den post-sinusoidalen Venulen beurteilt.

Die intravitalmikroskopisch gewonnenen Ergebnisse der Leukozytenrekrutierung zeigen einen pro-inflammatorischen Effekt der MDDP-Präkonditionierung. Sowohl in den Sinusoiden als auch in den post-sinusoidalen Venulen war die Leukozytenzahl 24 Stunden nach der Transplantation bei den präkonditionierten Versuchstieren erhöht. Diese Leukozytenrekrutierung betraf sowohl die steatotischen als auch die nicht-steatotischen Lebern. Bei Betrachtung der Endothel-Leukozyteninteraktion (*leukocyte rolling*) bei steatotischen Lebern, zeigte sich sogar eine signifikant erhöhte Anzahl endothelinteragierender Leukozyten nach der Präkonditionierung.

Dieses Ergebnis steht damit im Widerspruch zu dem Ergebnis der Arbeitsgruppen von Moussavian et al. 2011 und von Heesen et al. 2012. Diese Arbeitsgruppen konnten sowohl für nicht-steatotische, als auch für steatotische Versuchstiere eine verminderte Leukozytenrekrutierung nach MDDP-Präkonditionierung im Ex-vivo-Versuch zeigen (Moussavian et al. 2011; von Heesen et al. 2012). Zusätzliche zeigte die Arbeitsgruppe von von Heesen et al. 2012 eine stärkere Leukozytenrekrutierung bei steatotischen Lebern gegenüber nicht-steatotischen Versuchstieren. Dieses Ergebnis hingegen konnte in unserer MDDP-Studie intravitalmikroskopisch bestätigt werden.

Die Ergebnisse der Leukozytenrekrutierung stehen damit in unserer Studie im Einklang mit den zuvor gezeigten Ergebnissen der Mikrozirkulation und Apoptosevorgängen und postulieren somit, dass es nach einer MDDP-Präkonditionierung, wie sie in dieser Studie angewendet wurde, zu einer verstärkten Entzündungsreaktion 24 Stunden nach Transplantation gegenüber den Kontrolltieren kommt. Ebenso geht aus den Ergebnissen der Leukozytenrekrutierung hervor, dass diese Entzündungsreaktion bei steatotischen Lebern ausgeprägter ist, als bei nicht-steatotischen Lebern. Dies wurde auch von der Arbeitsgruppe von von Heesen et al. 2012 gezeigt.

Ebenso untermauern die Ergebnisse der HE-Histologie die vorangegangenen Erkenntnisse. Auch hier zeigten sich 24 Stunden nach der Transplantation deutliche Organschäden. Bei allen untersuchten Parametern (Vakuolisierung, Grobscholligkeit, Nekrose, Organintegrität) zeigten sich nach der MDDP-Präkonditionierung 24 Stunden nach der Transplantation schlechtere Werte im semiquantitativen Score, als bei den Kontrollgruppen. Bei steatotischen Lebern war dieser Effekt noch stärker ausgeprägt, als bei nicht-steatotischen Versuchstieren.

Damit bestätigt auch die histologische Analyse der Gewebepräparate einen schädlichen Effekt der MDDP-Präkonditionierung dieser Studie auf die Organfunktion 24 Stunden nach der Lebertransplantation. Auch die Arbeitsgruppe von von Heesen et al. 2012 konnte histologisch eine ausgeprägtere Organschädigung bei steatotischen Versuchstieren gegenüber nicht-steatotischen Versuchstieren feststellen. Hier stimmen demnach beide Studien überein.

Moussavian et al. 2011 wies jedoch histologisch in seinen Ex-vivo-Versuchen den protektiven Effekt der MDDP-Präkonditionierung nach 60 minütiger Perfusion nach. Dieser protektive Effekt auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden bestätigte sich im

Verlauf nach der Lebertransplantation in unserer In-vivo-Studie nicht. Vielmehr konnte wiederum ein schädlicher Effekt der MDDP-Präkonditionierung für alle histologisch untersuchten Parameter (Vakuolisierung, Nekrose, Organintegrität, Grobscholligkeit) am Tag 1 Nach der Lebertransplantation gezeigt werden.

Darüber hinaus kann anhand der Histologie der zeitliche Verlauf des Ischämie-/Reperfusionsschadens nachvollzogen werden. So zeigen sich für alle untersuchten Parameter (Vakuolisierung, Nekrosen, Grobscholligkeit, Organintegrität) bereits 24 Stunden nach der Transplantation Veränderungen, die für eine erhebliche Schädigung des Organs sprechen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass eine ausreichend lange Ischämiezeit mit konsekutiv histologisch nachweisbaren Gewebereaktionen erzielt wurde. Die Organschäden fanden ihren Höhepunkt zwischen dem dritten und dem fünften Tag nach der Transplantation und waren danach wieder rückläufig, sofern das Versuchstier den Zeitpunkt der maximalen Organschädigung überlebt hatte. Diese Gewebereaktionen nach Ischämie bestätigen das Ergebnis der Ex-vivo-Versuche von Moussevian et al. 2011, sowie zahlreicher weiterer Arbeitsgruppen, welche in ihren Versuchen einen Ischämie-/Reperfusionsschaden erzeugt hatten (Akbari et al. 2017; Tapuria et al. 2016; Teramoto et al. 1993; Wiggers et al. 2017).

4.2.4 Pathomechanismen und epidemiologische Bedeutung

Um die verstärkte Ausprägung des Ischämie/Reperfusionsschadens einer Fettleber nach einer Transplantation zu verstehen muss man den Pathomechanismus der NAFLD (*non alcoholic fat liver disease*) und NASH (*non alcoholic steatohepatitis*) differenziert betrachten. Dabei ist der Pathomechanismus bis heute nicht bis ins Detail geklärt, jedoch gilt eine "Zwei-Schritt-Hypothese" als akzeptiert und verbreitet (Day und James 1998).

Der erste Schritt ist die Entstehung einer steatosis hepatis, verbunden mit einer Zunahme des Gesamtkörperfettanteils und der Entstehung einer Insulinresistenz. Insbesondere bei einer Zunahme des viszeralen Fettanteils kommt es zu einer vermehrten Sekretion insulinresistenzbildender Substanzen, wie Cortisol, Resistin und TNF- α . Dabei verstärkt TNF- α beispielsweise die Lipolyse, die bei einer Insulinresistenz besteht. Somit steigt die Konzentration der freien Fettsäuren im Blut weiterhin und es kommt nach deren intrahepatischen Veresterung zu einer verstärkten Lipideinlagerung in den Hepatozyten. Die Insulinresistenz und Hyperinsulinämie

vermindern die intrahepatische β -Oxidation. Die intrahepatische Lipideinlagerung hat wiederum einer verstärkte Produktion proinflammatorischer Zytokine zur Folge, dies wiederum führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Apoptose und Nekrose (Marchesini et al. 2005).

Die Arbeitsgruppe von von Heesen et al. 2012 zeigte ebenso eine höhere Apoptoserate bei steatotischen Lebern gegenüber nicht-steatotischen Lebern. Unsere Studie zeigte verstärkte Apoptosevorgänge, insbesondere nach MDDP-Präkonditionierung bei steatotischen Lebern. Damit bestätigt unser Ergebnis zwar, dass bei steatotischen Lebern eine erhöhte Apoptoserate besteht. Der protektive Effekt der MDDP-Präkonditionierung auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden, wie er von von Heesen et al. im Ex-vivo-Versuch gezeigt werden konnte, wurde in unserer In-vivo-Studie jedoch nicht bestätigt.

Der oxidative Stress bedingt eine Lipidperoxidation und eine Oxidation ungesättigter Fettsäuren und damit eine Schädigung der mitochondrialen DNA. Darüber hinaus hemmt TNF- α die mitochondriale Atmungskette und infolge dessen die Produktion von ATP. Dieser ATP-Mangel wird mitverantwortlich gemacht, für die geringere Toleranz von Fettlebern gegen Ischämie (McCullough 2006; Mukai et al. 2017).

Die Lipidperoxidation führt zu einer Bildung von Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE). Dies unterhält den inflammatorischen Zustand mittels Chemotaxis von neutrophilen Zellen. Darüber hinaus kommt es zu einer Freisetzung von extrazellulären Matrixproteinen, ausgelöst durch den zytokininduzierten Transforming Growth Factor β (TGF- β). In Folge dessen proliferieren die hepatischen Sternzellen und es kommt zu einer Induktion der Leberzirrhose (Angulo 2002). Dahingehend bestätigen die Ergebnisse unserer Studie, dass die Organschädigung nach einer Lebertransplantation bei steatotischen Lebern erheblich stärker ausfällt, als bei nicht-steatotischen Lebern. Entgegen unserer Erwartungen auf der Grundlage der Ergebnisse von von Heesen et al. 2012 und Moussavian et al. 2011 hatte die MDDP-Präkonditionierung diese Organschädigung nach der Transplantation sogar noch verstärkt und muss dahingehen auf einen potentiell toxischen Effekt der verwendeten Pharmaka, welcher im in-vivo Versuch sich erst im Langzeitverlauf zeigte, zurückgeführt werden. Diese schädliche Wirkung der MDDP-Präkonditionierung zeigte sich bei steatotischen Versuchstieren noch stärker ausgeprägt als bei nicht-steatotischen Versuchstieren.

Die besondere klinische Relevanz von Experimenten mit Fettlebern wird bei Betrachtung der epidemiologischen Daten der Leberverfettung ersichtlich. Die NAFLD (*non alcoholic fat liver disease*) stellt die häufigste Lebererkrankung der Industrienationen dar. So zeigen Autopsien, dass Menschen mit Übergewicht, das heißt einem BMI über 25 kg/m², in etwa 70% der Fälle von einer NAFLD betroffen waren. Sogar knapp 30% der normalgewichtigen Menschen wiesen in Autopsien eine NAFLD auf. Die Prävalenz einer NAFLD bei Patienten mit Diabetes mellitus liegt bei 75% (Neuschwander-Tetri und Caldwell 2003).

Besonders erschreckend ist, dass etwa drei Prozent der Übergewichtigen bereits eine Leberzirrhose aufweisen. Liegt zusätzlich eine Diabetes Mellitus vor, erreicht die Prävalenz der Leberzirrhose sogar Werte bis zu 19% (Neuschwander-Tetri und Caldwell 2003).

Noch deutlicher wird die Bedeutung dieser Studie, wenn man den Zahlen der amerikanischen Gesellschaft „Center for Disease Control (CDC)“ glaubt, welche schätzt, dass im Jahre 2025 etwa 50% der amerikanischen Bevölkerung an Fettleibigkeit, also einem BMI über 30 kg/m², leiden werden. Bezüglich der aktuell angenommenen Prävalenz der NASH (*non alcoholic steatohepatitis*) bei Fettleibigen muss dahingehend davon ausgegangen werden, dass im Jahre 2025 über 25 Millionen Menschen in den USA an einer NASH erkrankt sein werden (Burke und Lucey 2004).

Sollten diese erschreckenden Prognosen auch nur entfernt erreicht werden, so liegt es auf der Hand, welchen Stellenwert steatotische Lebererkrankungen in naher Zukunft erhalten werden und noch viel mehr, welche Bedeutung eine Nutzbarmachung von Fettlebern als Transplantatorgane in Zukunft haben wird.

Die Verwendung marginaler Organe, insbesondere von Fettlebern, ist dahingehend ein elementarer Baustein, wenn es darum geht, dem aktuellen Trend der steigenden Organknappheit und dem Anstieg der Wartezeit entgegenzuwirken. Insbesondere zu Zeiten, in denen die Transplantationsmedizin mit dem Misstrauen und sinkender Orgnspendebereitschaft der Bevölkerung aufgrund von Transplantationskandalen und Debatten zum Thema Hirntod, NHBD (*non hearts beating donors*) und Organspende zu kämpfen hat.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Heute gilt die Lebertransplantation als Standardverfahren in der Therapie von Patienten mit schweren irreversiblen, progredienten Lebererkrankungen, die das Leben des Patienten gefährden. Dabei dürfen weder alternative Therapiekonzepte noch Kontraindikationen gegen eine Transplantation vorhanden sein ("Bundesärztekammer 2013: Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG" 2013).

Aufgrund der herausragenden Fortschritte bezüglich der Überlebensraten nach einer Lebertransplantation, die in den letzten vier Dekaden erreicht wurden, hat die Zahl der transplantierten Lebern beständig zugenommen. Jedoch hat sich aus der hohen Nachfrage auch ein erheblicher Organmangel entwickelt. Um diesem Organmangel entgegenzuwirken und die Zeit auf der Warteliste möglichst kurz zu halten, gibt es verschiedene Ansätze, marginale Organe nutzbar zu machen. Kennzeichnend für diese Organe ist, dass sie anfälliger für eine Schädigung nach einer Transplantation sind. Diese Schädigung gilt es demnach zu minimieren.

Diese Studie hat sich der Fettleber als marginalem Organ angenommen. Aufgrund von zunehmender Adipositas in den Industrienationen muss davon ausgegangen werden, dass auch das Ausmaß der Leberverfettung und damit auch die Prävalenz von NASH und Leberzirrhose in der Bevölkerung zunehmen wird. Demzufolge wird es in Zukunft von besonderem Interesse sein, Fettlebern als marginale Organe nutzbar zu machen und damit den Spenderpool zu erweitern.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass eine MDDP-Präkonditionierung weder bei steatotischen noch bei nicht-steatotischen Lebern im Rattenmodell den Ischämie-/Reperfusionsschaden nach einer orthotopen Lebertransplantation vermindert. Damit stehen die In-vivo-Ergebnisse dieser Studie im Gegensatz zu den Ex-vivo-Versuchen von Moussavian et al. 2011 und von Heesen et al. 2012, welche einen protektiven Effekt der MDDP-Präkonditionierung bezüglich einer Verminderung des Ischämie-/Reperfusionsschadens zeigten. Erklärt werden könnte dies aufgrund eines möglicherweise toxischen Potentials der Medikamente, welches infolge der simultanen Injektion entsteht.

Die Hoffnung, mit einer MDDP-Präkonditionierung, wie sie in dieser Studie angewendet wurde, den Ischämie-/Reperfusionsschaden nach einer

Lebertransplantation zu vermindern, hat sich in dieser Studie nicht bestätigt. Es muss nach den gezeigten Ergebnissen sogar davon ausgegangen werden, dass die Präkonditionierung die Organfunktion sogar verschlechtert hat. Insbesondere bei den steatotischen Lebern war dieser schädigende Effekt besonders ausgeprägt.

Worin dieses toxische Potential im Detail besteht beziehungsweise wie die Diskrepanz der Ergebnisse zwischen ex vivo und in vivo Versuchen zustande kommt, gilt es nun in weiteren Studien zu detektieren. Möglicherweise kann dahingehend in zukünftigen Studien durch Dosisanpassung, Veränderung der Applikationsintervalle oder die Auswahl anderer Medikamente auch bei In-vivo-Versuchen eine Protektion durch eine MDDP-Präkonditionierung erreicht werden.

6. Literaturverzeichnis

Adam R, Karam V, Delvart V, O'Grady J, Mirza D, Klempnauer J, Castaing D, Neuhaus P, Jamieson N, Salizzoni M, et al. (2012): Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol* 57, 675-688

Adamson GM, Billings RE (1992): Tumor necrosis factor induced oxidative stress in isolated mouse hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 294, 223-229

Akbari G, Mard SA, Dianat M, Mansouri E (2017): The Hepatoprotective and MicroRNAs Downregulatory Effects of Crocin Following Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 1702967

Alwahsh SM, Xu M, Schultze FC, Wilting J, Mihm S, Raddatz D, Ramadori G (2014b): Combination of alcohol and fructose exacerbates metabolic imbalance in terms of hepatic damage, dyslipidemia, and insulin resistance in rats. *PLoS One* 9, e104220

Alwahsh SM, Xu M, Seyhan HA, Ahmad S, Mihm S, Ramadori G, Schultze FC (2014a): Diet high in fructose leads to an overexpression of lipocalin-2 in rat fatty liver *World J Gastroenterol* 20, 1807-1821

Amersi F, Nelson SK, Shen XD, Kato H, Melinek J, Kupiec-Weglinski JW, Horwitz LD, Busuttill RW, Horwitz MA (2002): Bucillamine, a thiol antioxidant, prevents transplantation-associated reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8915-8920

Angulo P (2002): Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 346, 1221-1231

Araki H, Lefer AM (1980): Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am J Physiol* 238, H176-181

Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White SA, Prasad KR (2005): Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg* 92, 528-538

Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, Marty J, Farges O (1999): Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Annals of Surgery* 229, 369-375

Ben-Ari Z, Pappo O, Sulkes J, Cheporko Y, Vidne BA, Hochhauser E (2005): Effect of adenosine A2A receptor agonist (CGS) on ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver *Apoptosis*. 10, 955-962

Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE, Mikheeva G, Krasnykh V, Douglas JT, Thomas FT, Thomas JM, Curiel DT (1999): Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by in vivo adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 230, 185-193

Bockhorn M, Fingas CD, Rauen U, Canbay A, Sotiropoulos GC, Frey U, Sheu SY, Wohlschlagler J, Broelsch CE, Schlaak JF (2008): Erythropoietin treatment improves liver regeneration and survival in rat models of extended liver resection and living donor liver transplantation. *Transplantation* 86, 1578-1585

Botros M, Sikaris KA (2013): The de Ritis ratio: the test of time *Clin Biochem. Rev* 34, 117-130

Briceno J, Marchal T, Padillo J, Solorzano G, Pera C (2002): Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 74, 522-526

Bundesärztekammer 2006: Bekanntmachungen: Richtlinien zur Organtransplantation gemäß § 16 TPG (2006): *Dtsch Arztebl International* 103, 3282-

Bundesärztekammer 2013: Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG (2013): *Dtsch Arztebl International* 110, 241-242

Burke A, Lucey MR (2004): Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 4, 686-693

Caldwell-Kenkel JC, Thurman RG, Lemasters JJ (1988): Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation* 45, 834-837

Calne RY, Williams R (1968): Liver transplantation in man. I. Observations on technique and organization in five cases. *Br Med J* 4, 535-540

Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S, et al. (1979): Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 2, 1033-1036

Cameron AM, Ghobrial RM, Yersiz H, Farmer DG, Lipshutz GS, Gordon SA, Zimmerman M, Hong J, Collins TE, Gornbein J, et al. (2006): Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann Surg* 243, 748-753; discussion 753-745

Caraceni P, Domenicali M, Vendemiale G, Grattagliano I, Pertosa A, Nardo B, Morselli-Labate AM, Trevisani F, Palasciano G, Altomare E, et al. (2005): The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *J Surg Res* 124, 160-168

Carini R, Albano E (2003): Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology* 125, 1480-1491

Chang GJ, Mahanty HD, Quan D, Freise CE, Ascher NL, Roberts JP, Stock PG, Hirose R (2000): Experience with the use of sirolimus in liver transplantation--use in patients for whom calcineurin inhibitors are contraindicated. *Liver Transpl* 6, 734-740

Chiappa AC, Makuuchi M, Zbar AP, Biella F, Vezzoni A, Torzilli G, Andreoni B (2004): Protective effect of methylprednisolone and of intermittent hepatic pedicle clamping during liver vascular inflow occlusion in the rat. *Hepatogastroenterology* 51, 1439-1444

Chimalakonda AP, Mehvar R (2004): Effects of duration of ischemia and donor pretreatment with methylprednisolone or its macromolecular prodrug on the disposition of indocyanine green in cold-preserved rat livers. *Pharm Res* 21, 1000-1008

Chiu KW, Chen YS, de Villa VH, Wang CC, Eng HL, Wang SH, Liu PP, Jawan B, Huang TL, Cheng YF, et al. (2005): Characterization of liver enzymes on living related liver transplantation patients with acute rejection. *Hepatogastroenterology* 52, 1825-1827

Cicinnati VR, Yu Z, Klein CG, Sotiropoulos GC, Saner F, Malago M, Frilling A, Gerken G, Broelsch CE, Beckebaum S (2007): Clinical trial: switch to combined mycophenolate mofetil and minimal dose calcineurin inhibitor in stable liver transplant patients--assessment of renal and allograft function, cardiovascular risk factors and immune monitoring. *Aliment Pharmacol Ther* 26, 1195-1208

Clavien PA, Harvey PR, Sanabria JR, Cywes R, Levy GA, Strasberg SM (1993): Lymphocyte adherence in the reperfused rat liver: mechanisms and effects. *Hepatology* 17, 131-142

Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemasters JJ, Mason RP, Thurman RG (1992): Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat--an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation* 54, 199-204

Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ, Strasberg SM (1993): Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat *Hepatology* 18, 635-647

D'Avola D, Cuervas-Mons V, Marti J, Ortiz de Urbina J, Llado L, Jimenez C, Otero E, Suarez F, Rodrigo JM, Gomez MA, et al. (2017): Cardiovascular morbidity and mortality after liver transplantation: The protective role of Mycophenolate Mofetil. *Liver Transpl*

Day CP, James OF (1998): Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 114, 842-845

Decker K (1990): Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192, 245-261

Derin N, Izgut-Uysal VN, Agac A, Aliciguzel Y, Demir N (2004): L-carnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation. *J Physiol Pharmacol* 55, 595-606

Duenschede F, Erbes K, Kircher A, Westermann S, Schad A, Riegler N, Ewald P, Dutkowski P, Kiemer AK, Kempfski O, et al. (2007): Protection from hepatic ischemia/reperfusion injury and improvement of liver regeneration by alpha-lipoic acid. *Shock* 27, 644-651

Duenschede F, Westermann S, Riegler N, Miesner I, Erbes K, Ewald P, Kircher A, Schaefer H, Schneider J, Schad A, et al. (2006): Different protection mechanisms after pretreatment with glycine or alpha-lipoic acid in a rat model of warm hepatic ischemia. *Eur Surg Res* 38, 503-512

Fan Z, Jing H, Yao J, Li Y, Hu X, Shao H, Shen G, Pan J, Luo F, Tian X (2014): The protective effects of curcumin on experimental acute liver lesion induced by intestinal ischemia-reperfusion through inhibiting the pathway of NF-kappaB in a rat model *Oxid Med Cell Longev* 2014, 191624

Fantone JC, Kinnes DA (1983): Prostaglandin E1 and prostaglandin I2 modulation of superoxide production by human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 506-512

Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DebRoy MA, Greenstein SM, Merion RM (2006): Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. *Am J Transplant* 6, 783-790

Fishbein TM, Fiel MI, Emre S, Cubukcu O, Guy SR, Schwartz ME, Miller CM, Sheiner PA (1997): Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation* 64, 248-251

Fondevila C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW (2003): Hepatic ischemia/reperfusion injury--a fresh look. *Exp Mol Pathol* 74, 86-93

Garcia Urena MA, Colina Ruiz-Delgado F, Moreno Gonzalez E, Jimenez Romero C, Garcia Garcia I, Loinzaz Segurola C, Gonzalez P, Gomez Sanz R (1998): Hepatic steatosis in liver transplant donors: common feature of donor population? *World J Surg* 22, 837-844

Gastaca M (2009): Extended criteria donors in liver transplantation: adapting donor quality and recipient. *Transplant Proc* 41, 975-979

Gastpar H, Ambrus JL, Ambrus CM, Spavento P, Weber FJ, Thurber LE (1977): Study of platelet aggregation in vivo. III. Effect of pentoxifylline. *J Med* 8, 191-197

Gondolesi GE, Lausada N, Schinella G, Semplici AM, Vidal MS, Luna GC, Toledo J, de Buschiazzo PM, Raimondi JC (2002): Reduction of ischemia-reperfusion injury in parenchymal and nonparenchymal liver cells by donor treatment with DL-alpha-tocopherol prior to organ harvest. *Transplant Proc* 34, 1086-1091

Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H (1998): Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol* 274, L112-118

Gracia-Sancho J, Garcia-Caldero H, Hide D, Marrone G, Guixe-Muntet S, Peralta C, Garcia-Pagan JC, Abraldes JG, Bosch J (2013): Simvastatin maintains function and viability of steatotic rat livers procured for transplantation. *J Hepatol* 58, 1140-1146

Gurusamy KS, Sheth H, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR (2009): Methods of vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd007632

Gutgemann A, Schriefers KH, Esser G, Lie TS, Paquet KJ, Kaufer C (1969): A case of homologous liver transplantation. *Ger Med Mon* 14, 525-528

Herzer K, Paul A, Gerken G (2013): [Liver transplantation--an update]. *Dtsch Med Wochenschr* 138, 1471-1477

Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, Di Lorenzo E, Esposito G, Pisani A, Leccia A, Cavuto L, Stingone AM, Chieffo A, et al. (2000): Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol* 35, 214-221

Isaka T, Maruno M, Muhammad AK, Kato A, Nakagawa H, Yoshimine T (2000): Ultrastructural changes of the vascular endothelium after intra-arterial administration of tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) in rat gliomas. *J Neurooncol* 46, 145-150

Jaeschke H (1991): Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 79, 115-136

Jaeschke H (2003): Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284, G15-26

Jaeschke H (2011): Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *J Gastroenterol Hepatol* 26 Suppl 1, 173-179

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW (1990): Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *Faseb j* 4, 3355-3359

Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ (1992): Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukoc Biol* 52, 377-382

Jenkins DP, Baxter GF, Yellon DM (1995): The pathophysiology of ischaemic preconditioning. *Pharmacol Res* 31, 219-224

Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, Endre Z, Gobe GC (2006): Delayed administration of darbepoetin or erythropoietin protects against ischemic acute renal injury and failure Kidney. *Int* 69, 1806-1813

Kaltenborn A, Salinas R, Jager MD, Lehner F, Sakirow L, Klempnauer J, Schrem H (2015): Model of End-Stage Liver Disease Score and Derived Variants Lack Prognostic Ability after Liver Transplantation. *Ann Transplant* 20, 441-448

Kim SH, Lee SM (2008): Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 44, 165-171

Klune JR, Tsung A (2010): Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *Surg Clin North Am* 90, 665-677

Koneru B, Dikdan G (2002): Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation* 73, 325-330

Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX (2009): Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 15, 43-50

Korthuis RJ, Gute DC, Cepinskas G, Kvietys PR (2001): Cellular mechanisms of acute versus delayed preconditioning. *Pathophysiology* 5, 35-48

Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW (2005): Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 37, 1653-1656

Kuroda S, Tashiro H, Kimura Y, Hirata K, Tsutada M, Mikuriya Y, Kobayashi T, Amano H, Tanaka Y, Ohdan H (2015): Rho-kinase inhibitor targeting the liver prevents ischemia/reperfusion injury in the steatotic liver without major systemic adversity in rats. *Liver Transpl* 21, 123-131

Kwon KH, Kim YW, Kim SI, Kim KS, Lee WJ, Choi JS (2003): Postoperative liver regeneration and complication in live liver donor after partial hepatectomy for living donor liver transplantation Yonsei. *Med J* 44, 1069-1077

Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ (2000): Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 32, 169-173

Lesurtel M, Lehmann K, de Rougemont O, Clavien PA (2009): Clamping techniques and protecting strategies in liver surgery. *HPB (Oxford)* 11, 290-295

Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, Vollmar B (2007): Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through platelet and endothelial cell deactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1191-1198

Liu QS, Cheng ZW, Xiong JG, Cheng S, He XF, Li XC (2015): Erythropoietin pretreatment exerts anti-inflammatory effects in hepatic ischemia/reperfusion-injured rats via suppression of the TLR2/NF-kappaB pathway. *Transplant Proc* 47, 283-289

Lutterova M, Kukan M, Vajdova K, Kuba D, Mislanova C, Kebis A, Danninger F, Mraz P (2001): Protection of the rat liver against rewarming ischemic injury by University of Wisconsin solution. *Langenbecks Arch Surg* 386, 31-37

Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Yu WC, Wong J (1999): Tolerance of the liver to intermittent pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors. *Arch Surg* 134, 533-539

Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E (2005): Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 16, 421-427

- Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, Stratta RJ, Langnas AN, Hirst K, Shaw BW, Jr. (1993): Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. *Transplantation* 56, 1403-1409
- Marzi I, Knee J, Menger MD, Harbauer G, Buhren V (1991): Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model. *Transplantation* 52, 432-436
- McCullough AJ (2006): Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 40 Suppl 1, S17-29
- Meirelles Junior RF, Salvalaggio P, de Rezende MB, Evangelista AS, Guardia BD, Matiolo CE, Neves DB, Pandullo FL, Felga GE, Alves JA, et al. (2015): Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)* 13, 149-152
- Menon VP, Sudheer AR (2007): Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin. *Adv Exp Med Biol* 595, 105-125
- Mensink GB, Lampert T, Bergmann E (2005): [Overweight and obesity in Germany 1984-2003] *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 48, 1348-1356
- Merion RM, Sharma P, Mathur AK, Schaubel DE (2011): Evidence-based development of liver allocation: a review. *Transpl Int* 24, 965-972
- Moussavian MR, Scheuer C, Schmidt M, Kollmar O, Wagner M, von Heesen M, Schilling MK, Menger MD (2011): Multidrug donor preconditioning prevents cold liver preservation and reperfusion injury. *Langenbecks Arch Surg* 396, 231-241
- Mukai T, Egawa M, Takeuchi T, Yamashita H, Kusudo T (2017): Silencing of FABP1 ameliorates hepatic steatosis, inflammation, and oxidative stress in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *FEBS Open Bio* 7, 1009-1016
- Murphy BJ, Laderoute KR, Short SM, Sutherland RM (1991): The identification of heme oxygenase as a major hypoxic stress protein in Chinese hamster ovary cells. *Br J Cancer* 64, 69-73
- Musial J, Undas A, Gajewski P, Jankowski M, Sydor W, Szczeklik A (2001): Anti-inflammatory effects of simvastatin in subjects with hypercholesterolemia. *Int J Cardiol* 77, 247-253
- Nagai K, Yagi S, Afify M, Bleilevens C, Uemoto S, Tolba RH (2013): Impact of venous-systemic oxygen persufflation with nitric oxide gas on steatotic grafts after partial orthotopic liver transplantation in rats. *Transplantation* 95, 78-84
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH (2003): Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD. Single Topic Conference Hepatology 37, 1202-1219

Nishida S, Nakamura N, Vaidya A, Levi DM, Kato T, Nery JR, Madariaga JR, Molina E, Ruiz P, Gyamfi A, et al. (2006): Piggyback technique in adult orthotopic liver transplantation: an analysis of 1067 liver transplants at a single center. *HPB (Oxford)* 8, 182-188

Park K, Chung KY, Sung SH, Kim BR, Kim YS (2003): Protective effect of desferrioxamine during canine liver transplantation: significance of peritransplant liver biopsy. *Transplant Proc* 35, 117-119

Parratt JR (1994): Protection of the heart by ischaemic preconditioning: mechanisms and possibilities for pharmacological exploitation. *Trends Pharmacol Sci* 15, 19-25

Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J (1999): The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 29, 126-132

Perez-Ruixo JJ, Krzyzanski W, Hing J (2008): Pharmacodynamic analysis of recombinant human erythropoietin effect on reticulocyte production rate and age distribution in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet* 47, 399-415

Pichlmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H (1988): Transplantation einer Spenderleber auf zwei Empfänger (Splitting - Transplantation) - eine neue Methode in der Weiterentwicklung der Lebersegmenttransplantation. *Langenbecks Arch Chir* 373, 127-130

Pischke S, Lege MC, von Wulffen M, Galante A, Otto B, Wehmeyer MH, Herden U, Fischer L, Nashan B, Lohse AW, et al. (2017): Factors associated with long-term survival after liver transplantation: A retrospective cohort study. *World J Hepatol* 9, 427-435

Pratschke J, Mittler J, Neuhaus P (2008): [Expanding the liver donor pool through extended-criteria donation]. *Chirurg* 79, 130-134

Pratschke, Loehe F, Graeb C, Jauch KW, Angele MK (2009): [Usage of marginal organs for liver transplantation: a way around the critical organ shortage?] *Zentralbl Chir* 134, 107-112

Quiroga J, Prieto J (1993): Liver cytoprotection by prostaglandins. *Pharmacol Ther* 58, 67-91

Rangaswamy R, Singh CG, Singh HM, Punyabati P, Nyuwi KT (2017): Impact of Biliary Calculi on the Liver. *J Clin Diagn Res* 11, Pc04-pc07

Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H (1999): Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *Faseb j* 13, 155-168

Rinella ME, Alonso E, Rao S, Whittington P, Fryer J, Abecassis M, Superina R, Flamm SL, Blei AT (2001): Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors. *Liver Transpl* 7, 409-414

Ruckert RI (1992): [Our surgical heritage. On the history of clinical liver transplantation in Germany.] *Zentralbl Chir* 117, 299-306

Rudiger HA, Clavien PA (2002): Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 122, 202-210

Santiago Delpin EA, Figueroa I, Lopez R, Vazquez J (1975): Protective effect of steroids on liver ischemia. *Am Surg* 41, 683-685

Sawitzki B, Amersi F, Ritter T, Fisser M, Shen XD, Ke B, Busuttill R, Volk HD, Kupiec-Weglinski JW (2002): Upregulation of Bag-1 by ex vivo gene transfer protects rat livers from ischemia/reperfusion injury. *Hum Gene Ther* 13, 1495-1504

Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Meissner H, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M (2004): Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 10, 864-870

Schmeding M, Hunold G, Ariyakhagorn V, Rademacher S, Boas-Knoop S, Lippert S, Neuhaus P, Neumann UP (2009): Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transpl Int* 22, 738-746

Schmidt J, Muller SA, Mehrabi A, Schemmer P, Buchler MW (2008): [Orthotopic liver transplantation. Techniques and results.] *Chirurg* 79, 112-120

Schön MR, Kollmar O, Wolf S, Schrem H, Matthes M, Akkoc N, Schnoy NC, Neuhaus P (2001): Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion *Ann Surg* 233, 114-123

Schorr K (1990): Platelet reactivity and arachidonic acid metabolism in type II hyperlipoproteinaemia and its modification by cholesterol-lowering agents Eicosanoids. 3, 67-73

Schutz E, Wieland E, Hensel A, Niedmann PD, Dreiss A, Armstrong VW, Schuff-Werner P, Oellerich M (1997): Suppression of leukocyte-enhanced cold ischemia/reperfusion injury of liver endothelium with the benzoquinone antioxidant idebenone. *Clin Biochem* 30, 619-624

Seifalian AM, Chidambaram V, Rolles K, Davidson BR (1998): In vivo demonstration of impaired microcirculation in steatotic human liver grafts. *Liver Transpl Surg* 4, 71-77

Selzner, Rudiger H, Graf R, Clavien PA (2003): Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 125, 917-936

Selzner M, Rudiger HA, Selzner N, Thomas DW, Sindram D, Clavien PA (2002): Transgenic mice overexpressing human Bcl-2 are resistant to hepatic ischemia and reperfusion. *J Hepatol* 36, 218-225

Semmler J, Gebert U, Eisenhut T, Moeller J, Schonharting MM, Allera A, Endres S (1993): Xanthine derivatives: comparison between suppression of tumour necrosis factor-alpha production and inhibition of cAMP phosphodiesterase activity. *Immunology* 78, 520-525

Seo MY, Lee SM (2002): Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats. *J Hepatol* 36, 72-77

Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, Yaqoob M, Thiemermann C, Mota-Filipe H (2006): Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int* 19, 919-926

Shen SQ, Zhang Y, Xiang JJ, Xiong CL (2007): Protective effect of curcumin against liver warm ischemia/reperfusion injury in rat model is associated with regulation of heat shock protein and antioxidant enzymes. *World J Gastroenterol* 13, 1953-1961

Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA (2000): Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 118, 183-191

Sinha B, Semmler J, Eisenhut T, Eigler A, Endres S (1995): Enhanced tumor necrosis factor suppression and cyclic adenosine monophosphate accumulation by combination of phosphodiesterase inhibitors and prostanoids. *Eur J Immunol* 25, 147-153

Song ATW, Avelino-Silva VI, Pecora RAA, Pugliese V, D'Albuquerque LAC, Abdala E (2014): Liver transplantation: Fifty years of experience *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20, 5363-5374

Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, Saitta A, Caputi AP (1999): Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol* 127, 482-488

Starzl TE, Demetris AJ (1990): Liver transplantation: a 31-year perspective. Part II *Curr Probl Surg* 27, 117-178

Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR (1963): HOMOTRANSPLANTATION OF THE LIVER IN HUMANS. *Surg Gynecol Obstet* 117, 659-676

Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, Blanchard H, Martin AJ, Jr., Porter KA (1968): Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg* 168, 392-415

Starzl TE, Todo S, Tzakis AG, Gordon RD, Makowka L, Stieber A, Podesta L, Yanaga K, Concepcion W, Iwatsuki S (1989): Liver transplantation: an unfinished product. *Transplant Proc* 21, 2197-2200

Sterneck M, Fischer L, Gahlemann C, Gundlach M, Rogiers X, Broelsch C (2000): Mycophenolate mofetil for prevention of liver allograft rejection: initial results of a controlled clinical trial. *Ann Transplant* 5, 43-46

Sun CK, Chen CH, Chang CL, Chiang HJ, Sung PH, Chen KH, Chen YL, Chen SY, Kao GS, Chang HW, et al. (2017): Melatonin treatment enhances therapeutic effects of exosomes against acute liver ischemia-reperfusion injury. *Am J Transl Res* 9, 1543-1560

- Tabrizian P, Joseph TT, Radkani P, Cohen E, Facciuto M (2016): Liver Transplantation in an Adult Recipient With Situs Inversus Totalis: Case Report and Review of the Literature. *Transplant Proc* 48, 3163-3166
- Tacke F, Kroy DC, Barreiros AP, Neumann UP (2016): Liver transplantation in Germany. *Liver Transpl* 22, 1136-1142
- Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC (1995): Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell* 80, 279-284
- Tang KS, Huang LT, Huang YH, Lai CY, Wu CH, Wang SM, Hwang KP, Huang FC, Tiao MM (2007): Gamma-glutamyl transferase in the diagnosis of biliary atresia. *Acta Paediatr Taiwan* 48, 196-200
- Tapuria N, Junnarkar S, Abu-Amara M, Fuller B, Seifalian AM, Davidson BR (2016): Haemoxygenase modulates cytokine induced neutrophil chemoattractant in hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 22, 7518-7535
- Tector AJ, Mangus RS, Chestovich P, Vianna R, Fridell JA, Milgrom ML, Sanders C, Kwo PY (2006): Use of extended criteria livers decreases wait time for liver transplantation without adversely impacting posttransplant survival. *Ann Surg* 244, 439-450
- Teoh NC, Farrell GC (2003): Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 18, 891-902
- Teramoto K, Bowers JL, Khettry U, Palombo JD, Clouse ME (1993): A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 55, 737-741
- Thapa PB, Maharjan DK, Suwal B, Byanjankar B, Singh DR (2010): Serum gamma glutamyl transferase and alkaline phosphatase in acute cholecystitis. *J Nepal Health Res Counc* 8, 78-81
- Torkadi PP, Apte IC, Bhute AK (2014): Biochemical Evaluation of Patients of Alcoholic Liver Disease and Non-alcoholic Liver Disease. *Indian J Clin Biochem* 29, 79-83
- Tzakis A, Todo S, Starzl TE (1989): Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Ann Surg* 210, 649-652
- Umeshita K, Fujiwara K, Kiyosawa K, Makuuchi M, Satomi S, Sugimachi K, Tanaka K, Monden M (2003): Operative morbidity of living liver donors in Japan. *Lancet* 362, 687-690
- Uysal E, Dokur M (2017): Comparison of effects of the tacrolimus and cyclosporine A on the colon anastomosis recovery of rats. *Ann Surg Treat Res* 92, 402-410
- van As AB, Lotz Z, Tyler M, Kahn D (2002): Reperfusion injury associated with portal venous and hepatic arterial perfusion in liver transplantation. *Transplantation* 74, 158-163

van Wagenveld BA, van Gulik TM, Gelderblom HC, Scheepers JJ, Bosma A, Endert E, Gouma DJ (1999): Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs. *Ann Surg* 229, 376-384

Veveva J, Fisar Z, Nekovarova T, Vrablik M, Zlatohlavek L, Hroudova J, Singh N, Raboch J, Vales K (2016): Statin-induced changes in mitochondrial respiration in blood platelets in rats and human with dyslipidemia. *Physiol Res* 65, 777-788

Vollmar B, Glasz J, Senkel A, Menger MD, Messmer K (1993): Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir* 118, 691-696

Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD (1994): Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 145, 1421-1431

von Heesen M, Seibert K, Hulser M, Scheuer C, Wagner M, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR (2012): Multidrug donor preconditioning protects steatotic liver grafts against ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 203, 168-176

Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Jaeschke H (1996): The 21-aminosteroid tirilazad mesylate protects against liver injury via membrane stabilization not inhibition of lipid peroxidation. *J Pharmacol Exp Ther* 277, 714-720

Ward A, Clissold SP (1987): Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs* 34, 50-97

Weigand MA, Plachky J, Thies JC, Spies-Martin D, Otto G, Martin E, Bardenheuer HJ (2001): N-acetylcysteine attenuates the increase in alpha-glutathione S-transferase and circulating ICAM-1 and VCAM-1 after reperfusion in humans undergoing liver transplantation. *Transplantation* 72, 694-698

Wiggers JK, van Golen RF, Verheij J, Dekker AM, van Gulik TM, Heger M (2017): Atorvastatin does not protect against ischemia-reperfusion damage in cholestatic rat livers. *BMC Surg* 17, 35

Yeung AC, Tsao P (2002): Statin therapy: beyond cholesterol lowering and antiinflammatory effects. *Circulation* 105, 2937-2938

Zhong Z, Connor HD, Froh M, Bunzendahl H, Lind H, Lehnert M, Mason RP, Thurman RG, Lemasters JJ (2005): Free radical-dependent dysfunction of small-for-size rat liver grafts: prevention by plant polyphenols. *Gastroenterology* 129, 652-664

Zwacka RM, Zhou W, Zhang Y, Darby CJ, Dudus L, Halldorson J, Oberley L, Engelhardt JF (1998): Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation. *Nat Med* 4, 698-704

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. O. Kollmar, von 2012 bis 2015 leitender Oberarzt der Klinik für Allgemein-, Viszeral und Kinderchirurgie der UMG in Göttingen, für die Überlassung des Themas sowie die Förderung bei der Arbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Dr. J. Slotta für die Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. In den vergangenen Jahren gab mir sein mir entgegengebrachtes Vertrauen die Zuversicht, meine Doktorarbeit voranzutreiben. Seine Hilfestellungen und Ratschläge waren für die Durchführung der Versuche unerlässlich. Er lehrte mich wissenschaftliches Arbeiten und unterstützte mich bei jeglichen Problemen, insbesondere bei dem Verfassen der Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Min Xu für die Unterstützung bei den Tierversuchen, insbesondere der Durchführung der Lebertransplantationen, bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei Roswitha Streich für die Unterstützung bei der Herstellung und Auswertung der histologischen Präparate sowie bei Cordula Sauerhoff für die Übernahme der Logistik und Fütterung der Versuchstiere bedanken.

Lebenslauf

Geboren wurde ich, Rian Lukas Urbach, am 14.01.1991, als Sohn von Dr. med. Rainer Urbach und Barbara Urbach in Saulgau.

Meine Schullaufbahn begann 1997 an der Grundschule Ebenweiler. Ab 2001 folgte die weiterführende Schule Studienkolleg St. Johann, ein privates Gymnasium, wo ich 2010 mein Abitur erwarb.

Nach den anschließenden Pflegepraktika und einer Ausbildung zum Rettungssanitäter erfolgte dann zum Sommersemester 2011 das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Das Physikum bestand ich im März 2013, das Staatsexamen im Mai 2016. Meine Famulaturen erfolgten während des klinischen Studienabschnitts in Innsbruck, Stuttgart und Ravensburg.

Während meines Studiums arbeitete ich als studentische Hilfskraft auf der Intensivstation des Krankenhauses Weende. Das erste Tertial meines Praktischen Jahres absolvierte ich in Göttingen in der anästhesiologischen Abteilung. Das zweite Tertial absolvierte ich in der inneren Abteilung des Städtischen Klinikums München Schwabing und mein drittes Tertial in der Chirurgie im Städtischen Klinikum München-Bogenhausen. Darauf folgte der Dritte Teil der Ärztlichen Prüfung im Mai 2017.