



Chirurgische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

(Klinikum rechts der Isar)

Klinikdirektor Univ.- Prof. Dr. Helmut Friess

**Quantifizierung des Ischämie-/
Reperfusionsschadens (I/R) anhand der
mitochondrialen Permeabilität zur Prädiktion der
Transplantabilität von marginalen Organen im
Rattenmodell der orthotopen Lebertransplantation**

Daniela K. V. Haiges

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Eduard Matevosjan
2. Univ.-Prof. Dr. Helmut Friess

Die Dissertation wurde am 16.01.2015 bei der Technischen Universität München
eingereicht und am 15.09.2015 durch die Fakultät der Medizin angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Quantifizierung des Ischämie-/ Reperfusionsschadens (I/R) anhand der mitochondrialen Permeabilität zur Prädiktion der Transplantabilität von marginalen Organen im Rattenmodell der orthotopen Lebertransplantation I

1. Allgemeiner Teil.....	1
1.1 Klinische Lebertransplantation	1
1.1.1. Historischer Überblick über die Anfänge der Transplantation.....	5
1.1.2 Deutsche Stiftung Organtransplantation und Eurotransplant.....	8
1.1.3 Kriterien für die Allokation von Lebern	8
1.1.4 MELD-Score	9
1.1.5 Organtransplantabilität aus pathologischer Sicht.....	12
1.1.6 Definition marginale Organe	13
1.1.7 Chirurgisches Verfahren.....	14
1.1.8 Split-Leber Transplantation.....	16
1.2 Ischämie-/Reperfusionsschaden	19
1.2.1 Pathophysiologie der Ischämiephase.....	20
1.2.2 Pathophysiologie der Reperusionsphase.....	21
1.3 Protektion der Leber vor I/R.....	23
1.3.1 Chirurgische Behandlung.....	23
1.3.2 Pharmakologische Behandlung.....	24
1.3.3 Ischämische Präkonditionierung	25
1.4 Immunsuppressiva	25
1.4.1 Corticosteroide	26
1.4.2 Calcineurininhibitoren	27
1.4.3 Antimetabolite.....	28
1.4.4 mTOR-Inhibitoren	28
1.4.5 Polyklonale Antikörper	29
1.4.6 Monoklonale Antikörper.....	30
1.4.7 Costimulationsblockade.....	30
1.5 Transplantatversagen	30
1.5.1 Akute Abstoßung	31
1.6 Die Lebertransplantation am Rattenmodell	34
1.6.1 Anatomie der Rattenleber	36
1.7 Energiegewinnung der Hepatozyten.....	38

1.7.1 ATP	38
1.7.2 Struktur der ATP-Synthase	39
2. Fragestellung	42
3. Material und Methoden	43
3.1 ATP-Messung	43
3.1.1 Versuchstiere / Spenderlebern	43
3.1.2 Leberentnahme	43
3.1.3 Versuchsgruppen	44
3.1.4 Organkonservierung	44
3.1.5 ATP-KIT	45
3.1.6 ATP-Bestimmung	45
3.1.7 Proteinbestimmung	47
3.2 Orthotope Lebertransplantation im Rattenmodell	49
3.2.1 Versuchstiere	49
3.2.2 Genehmigung der Versuche	49
3.2.3 Versuchsgruppen	49
3.2.4 Chirurgisches Vorgehen	50
3.2.5 Postoperative Probengewinnung	60
3.3 Histologische Auswertung	60
3.4 Statistische Auswertung	61
4. Ergebnisse	62
4.1 Ergebnisse der ATP/Protein-Untersuchung	62
4.2 Ergebnisse der histologischen Auswertung	64
4.3 Ergebnisse der Blutwerte	68
4.4 Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Histologie	71
5. Diskussion	73
5.1 Das Ratten-Tiermodell	73
5.2 Die Operationstechnik	74
5.3 Messungen und Messfehler	75
5.3.1 Irregularität der Konservierungs-/Perfusionslösung	75
5.3.2 Finale Versuchsreihe	79
5.4 Histologische Färbemethoden	79
5.5 Aussagekraft der Blutwerte	81
6. Zusammenfassung	84

7. Literaturverzeichnis	87
8. Danksagungen.....	113

Abkürzungsverzeichnis

AB0	Blutgruppenmerkmal
ALG	Anti-Lymphozyten-Globuline
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATG	Anti-T-Lymphozyten-Globulin
ATP	Adenosintriphosphat
BANFF	internationale Arbeitsgruppe zur Abstoßung bei Transplantation
BMI	Body-Mass-Index
BUN	Harnstoff
Ca ²⁺	Calcium
CD28	Cluster of Differentiation 28, engl.
CD80	Cluster of Differentiation 80, engl.
CD86	Cluster of Differentiation 86, engl.
cm	Zentimeter
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen-4
CXC-Chemokine	Familie von Chemokinen
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ET	Eurotransplant
g	Gramm
G6P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Gluc	Glukose
GRWR	graft-recipient body weight ratio, engl.
H ⁺	positiv geladenes Wasserstoff-Ion
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCIO	Hypochlorige Säure
HK	Hexokinase
HLA	Human Leukocyte Antigen, engl.
HU	high-urgency, engl.
HX	Hexokinase
I/R	Ischämie-/Reperfusionsschaden
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1, engl.
IL-8	Interleukin 8
KI	Konfidenzintervall
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LLS	left lateral segmented graft, engl.
MDH	Malatdehydrogenase
MELD	Model for End-Stage Liver Disease, engl.
MMF	Mycophenolat-Mofetil
MPS	mycophenolate sodium, engl.

MW	Mittlerer Wert
Na ⁺ /Ca ²⁺ -Antiporter	Natrium-Calcium-Antiporter
Na ⁺ /K ⁺ -Transporters	Natrium-Kalium-Transporter
NADPH	reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
O ²⁻	Sauerstoffoxid-Ion
PAF	Platelet-activating-factor, engl.
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RES	reticulo-endotheliales System
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TGF-β 1	Tumornekrosefaktor β-1
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TNF-β	Tumornekrosefaktor β
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1, engl.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organspender 2013 in Deutschland	4
Abbildung 2: Triangulationsnaht nach Carrel.....	6
Abbildung 3: Carrel-Patch.....	6
Abbildung 4: Stadien einer chronischen Lebererkrankung	12
Abbildung 5: Anastomosen der Spenderleber in-situ	15
Abbildung 6: Lebersegmente	16
Abbildung 7: Split-Leber	18
Abbildung 8: Pringle-Manöver	20
Abbildung 9: Pathogenese des I/R	22
Abbildung 10: Übersicht über die Wirkmechanismen der verschiedenen Immunsuppressiva-Klassen	26
Abbildung 11: Abklemmung der hepatischen Venen und Präparation eines Cuffs	34
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Cuff-Technik	35
Abbildung 13: Die Segmentaufteilung der Rattenleber.....	36
Abbildung 14: Die Segmentaufteilung der menschlichen Leber	37
Abbildung 15: chemische Struktur von ATP	39
Abbildung 16: Struktur eines Mitochondriums	40
Abbildung 17: Struktur der ATP-Synthase.....	41
Abbildung 18: schematische Darstellung der Messpunkte	44
Abbildung 19: Vorgehensweise nach Anleitung des ATP-Kit lite.....	46
Abbildung 20: Schematische Darstellung der operativen Versuchsdurchführung.....	50
Abbildung 21: Blick auf den Rattensitus	52
Abbildung 22: V. phrenica und Lebersitus intraoperativ	53
Abbildung 23: Leberhilus intraoperativ	54
Abbildung 24: Perfusion der Spenderleber über die Aorta	55
Abbildung 25: Blick auf den Rattensitus nach Hepatektomie	56
Abbildung 26: Spenderleber in situ des Empfängers.....	57
Abbildung 27: Fortlaufende Naht zur Anastomosierung	58
Abbildung 28: Anastomose der suprahepatischen V. cava inferior durch Naht der Rückwand.....	58
Abbildung 29: Anastomosierung der V. portae	59
Abbildung 30: Darstellung der ATP/ Protein-Werte gegen die Ischämiezeit	63
Abbildung 31: histologische Kriterien zur Gradeinteilung	64
Abbildung 32: Gradeinteilung anhand der Ischämiezeit bei 2h	65
Abbildung 33: Gradeinteilung anhand der Ischämiezeit bei 4h	66
Abbildung 34: Gradeinteilung anhand der Ischämiezeit bei 8h	67
Abbildung 35: Auftragung der Gradeinteilung gegen die Ischämiezeit anhand der Mittelwerte	67
Abbildung 36: Laborwerte anhand der Ischämiezeit.....	68
Abbildung 37: Auftragung der ALT Werte gegen die Ischämiezeit.....	69
Abbildung 38: Auftragung der AST Werte gegen die Ischämiezeit.....	69
Abbildung 39: Auftragung der LDH Werte gegen die Ischämiezeit	70

Abbildung 40: Auftragung der Glucose Werte gegen die Ischämiezeit	70
Abbildung 41: Auftragung der Harnstoff Werte gegen die Ischämiezeit	71
Abbildung 42: Prozentuale Darstellung der histologischen Grade und der Mittelwerte ATP/Protein bezogen auf die Ischämiezeit	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Indikationsstellung und Indikation für eine Lebertransplantation	1
Tabelle 2: Kontraindikationen für eine Lebertransplantation	2
Tabelle 3: Eckpunkte der MELD-Score-Äquivalente	10
Tabelle 4: Eingeschränkt vermittelbare Organe	14
Tabelle 5: Auswahlkriterien der Spenderorgane.....	17
Tabelle 6: Auswahlkriterien des Empfängers	18
Tabelle 7: BANFF-Schema für das Grading der Abstoßung im Sinne einer globalen Einschätzung des Rejektionsgrades	32
Tabelle 8: BANFF-Schema für das Grading der Allograft-Abstoßung: Rejektions-Aktivitäts-Index (RAI)	32
Tabelle 9: Eichkurve des BRADFORD-TEST	48
Tabelle 10: Darstellung ATP/Protein-Werte anhand der Ischämiezeit sowie der 95% Konfidenzintervallen	62
Tabelle 11: Korrelation des mittleren ATP/Protein-Gehalts mit der Histologie	73
Tabelle 12: Zusammensetzung von CUSTODIOL®	77
Tabelle 13: Zusammensetzung von der selbsthergestellten Nährlösung	78

1. Allgemeiner Teil

1.1 Klinische Lebertransplantation

Eine Lebertransplantation stellt heutzutage die einzige Möglichkeit dar, ein Überleben bei akuten sowie chronisch fortgeschrittenen Leberinsuffizienzen zu ermöglichen.

Es wird eine Indikation zur Transplantation bei Erkrankungen gestellt, die eine nicht verhinderbare Progression zeigen, durch einen genetischen Defekt bedingt sind oder das Leben gefährden⁸⁵ (Bundesärztekammer, 2013). Voraussetzung ist dabei allerdings, dass diese Erkrankungen erfolgreich durch eine Transplantation therapiert werden können.

Dabei wird zwischen folgenden Kategorien unterschieden: Leberparenchymerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, cholestatische Lebererkrankungen, vaskuläre Erkrankungen, bestimmte maligne Erkrankungen und Traumen³⁴ (Bundesärztekammer, 2013) (siehe *Tabelle 1*). Kontraindikationen zur Durchführung einer Lebertransplantation werden in *Tabelle 2* dargestellt. Sie ergeben sich aus einer Steigerung des Operationsrisikos oder mangelnde Erfolgsaussichten nach der Transplantation. Ebenso sind „nicht kurativ behandelte, bösartige Erkrankungen (soweit sie keine Indikation sind), klinisch manifeste oder durch Immunsuppression erfahrungsgemäß sich verschlimmernde Infektionserkrankungen, schwerwiegende Erkrankungen anderer Organe, vorhersehbare schwerwiegende operativ-technische Probleme sowie mangelhafte Compliance“⁸⁵ (Bundesärztekammer, 2013) als Kontraindikationen zu werten⁸⁵ (Bundesärztekammer, 2013).

Tabelle 1: Indikationsstellung und Indikation für eine Lebertransplantation

Quelle: Indikationsstellung und Indikationen für eine Lebertransplantation, Strassburg CP¹⁸⁴

Cholestatische Lebererkrankungen
<ul style="list-style-type: none">- Primäre biliäre Zirrhose- Primäre sklerosierende Cholangitis- Sekundär biliäre Zirrhose- Familiäre Cholestasesyndrome

Parenchymatöse Lebererkrankungen
<ul style="list-style-type: none">- Chronische Hepatitis B, C und D- Alkoholzirrhose- Autoimmunhepatitis- Kryptogene Zirrhose
Neoplastische Erkrankungen
<ul style="list-style-type: none">- Unifokales HCC < 5cm- Multifokales HCC max. 3 Herde ≤ 3cm- Fibrolamelläres Karzinom- Adenomatose der Leber- Hämangioendotheliom- Carcinoid-Metastase
Anlagestörungen
<ul style="list-style-type: none">- Polyzystische Lebererkrankung- Caroli-Syndrom
Parasitäre Ursachen
<ul style="list-style-type: none">- Echinokokkose
Stoffwechselerkrankungen
<ul style="list-style-type: none">- Hämatochromatose- Morbus Wilson- Alpha-1-Antitrypsinmangel- Morbus Gaucher- Glykogenose Typ 1- Primäre Oxalurie- Transthyretin-Amyloidose- Familiäre Hypercholesterinämie
Vaskuläre Lebererkrankungen
<ul style="list-style-type: none">- Chronisches Budd-Chiari-Syndrom- Venocclusive disease
Akutes Leberversagen
<ul style="list-style-type: none">- Virushepatitis- Medikamente, Toxine- Morbus Wilson- Akutes Budd-Chiari-Syndrom

Tabelle 2: Kontraindikationen für eine Lebertransplantation

Quelle: Indikationsstellung und Indikationen für eine Lebertransplantation, Strassburg CP¹⁸⁴

Kontraindikationen für eine Lebertransplantation

- Alter (> 65 Jahre, relativ)
- Aktive und unkontrollierte Infektionen
- HIV-Infektion (nur relativ, in vielen Fällen Transplantation möglich)
- Ausgedehnte Portalvenen- und Mesenterialvenenthrombose (kavernöse Transformation)
- Extrahepatische Erkrankung, die Operation oder Rehabilitation verhindert
- Extrahepatische Erkrankung, die Operation oder Rehabilitation verhindert
- Extrahepatische hepatozelluläres Karzinom
- Cholangiozelluläres Karzinom (außerhalb von Studien)
- Nicht kurativ therapierte Tumorerkrankungen
- Fortgesetzter Alkoholabusus (sechs Monate Karenz erforderlich)
- Noncompliance einschließlich erheblichen sprachlichen Problemen

Allerdings darf nicht vergessen werden, dass der chirurgischen Therapie, mit Aussicht auf eine kurative Genese, ein Organmangel gegenübersteht. Mangelnde Spenderorgane limitieren die Transplantationsraten erheblich. In deutschen Kliniken wurden im Jahr 2013 779 Lebern nach postmortalen Spende und 97 nach Lebendspende transplantiert⁶⁴ (Eurotransplant, 2013). Dem gegenüber stand ein Organbedarf bei 1491 Personen. Was eine klare Differenz zwischen Angebot und Nachfrage zeigt. Des Weiteren schürt die nachlassende Spendebereitschaft dieses Dilemma²⁵ (Blome B, 2014) weiter. *Abbildung 1* veranschaulicht die abnehmende Zahl an Organspender über die Jahre 2004-2009.



Abbildung 1: Organspender 2013 in Deutschland

Quelle: DSO-Jahresbericht 2013, Pressebilder und Grafiken

Diverse Lösungsansätze wurden entworfen, um diesen Umstand zu lindern. So soll eine Erhöhung der postmortalen Spenden und Lebendspenden durch verbesserte Aufklärung und eine Transplantation von „*marginalen Organen*“, im angelsächsischen Sprachraum mit „*expanded criteria donor organs*“ betitelt²⁰⁷ (Workgroup on expanded criteria organs for liver transplantation, 2005), dazu beitragen, das Defizit an Spenderorganen zu mildern².

Der Verwendung von marginalen Organen wird hierbei der höchste Stellenwert zur Verkleinerung des Organmangels und zur Steigerung der Transplantationsrate zugeschrieben. Dennoch muss bedacht werden, dass einer Reduktion der Mortalität auf der Warteliste eine mögliche Transplantatdysfunktion⁹ (Attia M, 2008), 150 (Pratschke S, 2009) gegenüber steht.

Aus diesem Grunde ist es von Nöten, durch eine prädiktive analytische Methode eine therapeutische Strategie zu entwickeln, um die Nutzbarkeit von marginalen Organen zu erhöhen und potentielle, nicht mehr transplantationsfähige, marginale Organe ausfindig zu machen, die bereits durch eine prolongierte Ischämie geschädigt sind. Dadurch könnte eine klare Charakterisierung von Organen erfolgen. Es wäre eine Trennung von Organen möglich, welche auf der einen Seite dem Spenderpool zugeführt werden könnten und auf der anderen Seite sich nicht mehr für eine Transplantation eignen würden. Aus klinischer Sicht ist bis heute allerdings keine

eindeutige Definition zur Charakterisierung von marginalen Organen festgelegt¹⁶² (Sass DA, 2011).

Folglich wurde mit dieser Arbeit und tierexperimentellen Orientierungsstudie das Ziel verfolgt, eine klinisch orientierte analytische Methode im Lebertransplantationsmodell an der Ratte zu entwickeln, die marginale Organe mit bereits kritischen Organfunktionen identifizieren würde.

Durch experimentelle Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R) verursachte Transplantatdysfunktion mit einer mitochondrialen Permeabilitätssteigerung in den Hepatozyten einhergeht⁹⁷ (Kern H, 2008). Mitochondrien eignen sich demnach als sensibler Parameter zur Quantifizierung des I/R. Ausgehend von diesem Vorwissen, ließ sich folgende Fragestellung formulieren:

„Eignet sich eine frühe Änderung des mitochondrialen Zustandes, gemessen durch die Adenosin-Triphosphat (ATP)-Produktion in Korrelation mit der Histopathologie, als denkbare prädiktives Score-System, um marginale Organe zu identifizieren?“

Würde sich ein positives Ergebnis darstellen, so wäre ein solches Scoring-System für die Verwendung von marginalen Organen durchaus im klinischen Rahmen denkbar.

1.1.1. Historischer Überblick über die Anfänge der Transplantation

Als Pionier der Transplantationsmedizin gilt *Alexis Carrel* mit seinen im Jahre 1904 begonnenen Arbeiten über die Anastomosierung von Gefäßen sowie der Transplantation von Organen an Tieren¹⁴¹ (Orlando G, 2013). In seiner Arbeit beschreibt er wichtige chirurgische Techniken, die für eine Umsetzung einer Transplantation unabdingbar waren¹⁰ (Aviles AJ, 2004). Die von ihm eingeführte *Triangulationstechnik*, eine Dreipunktgefäßnaht, wird heutzutage ebenso praktiziert, wie der sogenannte *„Carrel-Patch“*⁶⁰ (Dutkowski P, 2008).

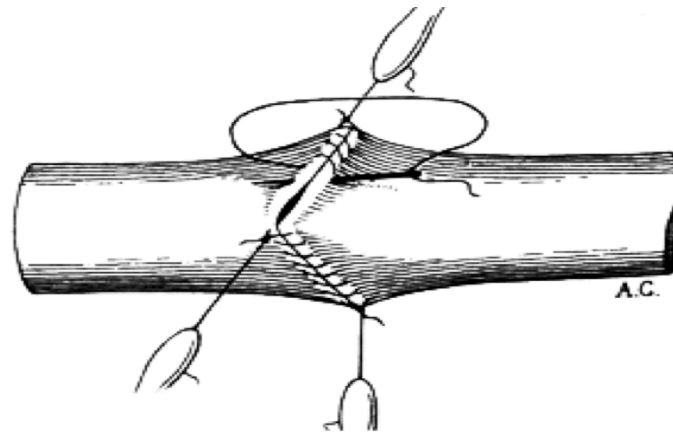


Abbildung 2: Triangulationsnaht nach Carrel

Quelle: Alexis Carrel: Genius, Innovator and Ideologist, Dutkowski et al.⁶⁰

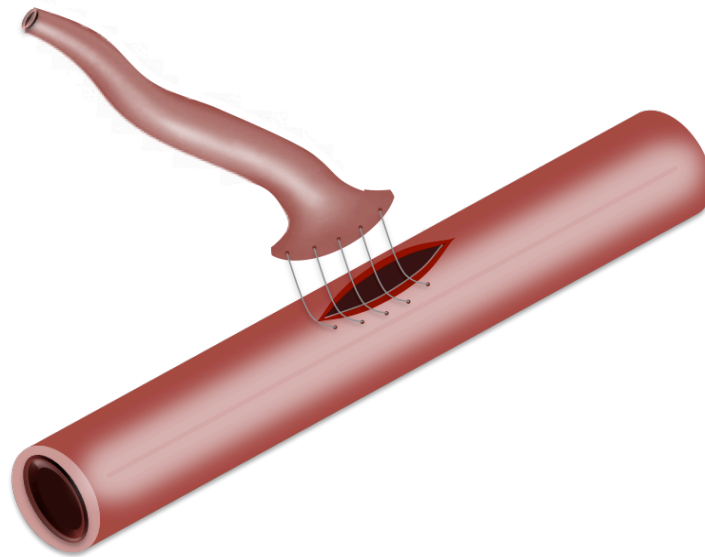


Abbildung 3: Carrel-Patch

Quelle: Alexis Carrel: Genius, Innovator and Ideologist, Dutkowski et al.⁶⁰: Schematische Darstellung des Carrel-Patches, als Beispiel durchgeführt an der Aorta und einem aortalen Patch mit Abgang der renalen Gefäßversorgung

Die Entdeckung der Konservierung von Organen durch Unterkühlung, lieferte enorme Fortschritte in der Transplantationsmedizin, was *Charles Claude Guthrie*⁸³ (Holznienkemper T, 2005) zu verdanken war. Mit *Peter Medawar* wurde im Jahre 1944 der immunologische Nachweis einer Abstoßung durch fremdes Gewebe in Experimenten an der Haut geliefert¹⁷⁹ (Starzl TE, 1995), was den Begriff der immunologischen Toleranz ins Spiel brachte. Eine gelungene Nierentransplantation an eineiigen Zwillingen im Jahre 1954 durch *Joseph Murray* bestätigte die These, dass eine Immunsuppression des Empfängers notwendig ist, um erfolgreich eine Transplantation durchführen zu

können¹⁵ (Barry JM, 2006), 125 (McAlister VC, 2005), 129 (Murray JE, 2001). Aufbauend auf dieser Annahme, entdeckte *Joachim Dausset* das Human-Leukocyte-Antigen-System (HLA-System) im Jahre 1958, was weitere Verständnisse im Hinblick auf immunologischen Reaktionen lieferte¹⁵⁶ (Richmond C, 2009). Es entwickelte sich das Verständnis, dass das HLA-System dazu dient, körpereigene und körperfremde Zellen zu erkennen. Werden dabei fremde Zellen mit abweichenden Glykoproteinen an der Oberfläche erkannt, so werden diese zerstört.

Fortschritte in der Pharmakologie führten zum weiteren Durchbruch der Transplantationsmedizin. Durch Verabreichung von Azathioprin bei Nierentransplantationen, verzeichnete *Roy Calne* im Jahre 1960 wesentliche Erfolge³⁷ (Calne R, 1998). Den ersten Erfolg innerhalb der humanen Lebertransplantation gelang *Thomas Earn Starzl* in Denver, Colorado/USA im Jahre 1963¹⁷⁷ (Starzl TE, 1968). Dort transplantierte er einem dreijährigen Jungen eine Leber⁶² (Eiseman B, 1992). Unglücklicherweise verstarb der Junge noch während der Operation⁶⁷ (Falasca L, 2001). Nach anfänglichen Schwierigkeiten und kurzen Überlebenszeiten, führte *Starzl* erst im Jahre 1967 weitere Lebertransplantationen durch¹⁷⁷ (Starzl TE, 1968). Eine Kombination von Immunsuppressiva und Steroide sowie paralleler in-situ Perfusion der Leber, konnte die Überlebenszeit auf rund dreizehn Monaten verlängert werden¹⁸³ (Strasberg SM, 1994). In Deutschland führten *Alfred Gütgemann* 1969 in Bonn und *Rudolf Pichlmayr* in Hannover²⁶.

In der Transplantationsmedizin konnten allerdings auch Misserfolge verzeichnet werden: Technische Probleme bei der Durchführung von Operationen, zunächst fehlende Organkonservierungsmöglichkeiten und nicht zuletzt der Mangel einer standardisierten immunsuppressiven Therapie limitierten den Erfolg¹⁴⁵ (Penko ME, 1999).

Erneuten Aufschwung erhielt die Transplantationschirurgie mit der Entdeckung des Cyclosporins im Jahre 1970 durch *Jean Francois Borel*¹⁸ (Beauchesne PR, 2007) und der Einführung 1983¹⁰⁷ (Land W, 2001) in Deutschland. Studien aus dem Jahre 1981 sprachen für eine erfolgsversprechende Therapie mit Cyclosporin, welches die Überlebenszeit auf über vier Jahren verlängerte. Zusätzlich konnte 1984 durch die Entdeckung des immunsuppressiv wirkenden Medikamentes *Tacrolimus* die Transplantationszahl gesteigert werden¹⁵⁶ (Richmond C, 2009).

Das Transplantationsgesetz von 1997 verankerte die Transplantation in der deutschen Rechtsprechung⁵⁴ (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2014).

1.1.2 Deutsche Stiftung Organtransplantation und Eurotransplant

Die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) wurde im Jahre 1984 gegründet und ist eine gemeinnützige Stiftung mit dem Hauptsitz in Frankfurt am Main, Deutschland. Organisatorisch ist das Bundesgebiet in sieben Regionen aufgeteilt (Nord, Nord-Ost, Ost, Bayern, Baden-Württemberg, Mitte und Nordrhein-Westfalen)⁵⁴
(Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2014)

Mit dem gesetzlichen Auftrag durch das Transplantationsgesetz aus dem Jahre 1997 fungiert die DSO nun als bundesweite Koordinierungsstelle für postmortale Organspende und eine sachgerechte Vermittlung der Organe. Als transplantatfähige Organe gelten derzeit viszerale Organe wie Niere, Leber, Pankreas und Dünndarm sowie thorakale Organe wie Herz und Lunge.

Alle Schritte des Organspendeprozesses werden über die Stiftung abgewickelt, von der Meldung eines potentiellen Spenders bishin zur erfolgreichen Organübergabe an den Empfänger.

Eurotransplant (ET) hingegen ist eine im Jahre 1967 gegründete Stiftung mit dem Hauptsitz in Leiden in den Niederlanden. Sie dient der Zuteilung von Spendeorganen in den Mitgliedsstaaten. Diese sind Belgien, Deutschland, Kroatien, Ungarn, Luxemburg, Niederlande, Österreich und Slowenien. Durch diese internationale Kooperation wird ein großer Spenderpool generiert und ermöglicht zugleich den am besten passenden Empfänger zu ermitteln.

1.1.3 Kriterien für die Allokation von Lebern

Die Vergabe von Organen ist an festgelegte Richtlinien und Kriterien gebunden.

Bestimmend für den Erfolg einer Transplantation ist die Blutgruppenidentität/-kompatibilität (AB0-System) zwischen Spender und Empfänger.

Die Blutgruppenidentität hat Vorrang in jeder Dringlichkeitsstufe, was bedeutet dass die Blutgruppen von Spender und Empfänger in der Regel identisch sind. Wird kein blutgruppenidentischer Empfänger gefunden, so gilt die Blutgruppenkompatibilität. Die Spendergruppe 0 wird dabei als Universalspender angesehen.

Als weiteren Punkt erfolgt eine Listung nach Dringlichkeit. Dabei werden drei Stufen unterschieden: „high-urgency“ (HU), „urgency“ (U) und „transplantable“ (T)⁵⁴ (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2014).

Empfänger, die sich in einer akut lebensbedrohlichen Situation befinden und der Tod innerhalb weniger Tage zu drohen scheint, werden als HU gelistet. Ihnen wird präferentiell zuerst ein Organ zugeteilt. Eine Einschätzung erfolgt dabei nach den Richtlinien der Bundesärztekammer. Bedacht muss allerdings werden, dass selbst innerhalb der HU-Listung, die Allokation stets nach Wartezeit verläuft.

Ein Maß für die Einschätzung der Dringlichkeit bietet der „Model for Endstage Liver Disease“ (MELD)-Score¹³⁹ (Olthoff, 2004). Dabei erfolgt eine Einschätzung der Mortalität innerhalb von neunzig Tagen. Berechnet wird der MELD-Score aus den Laborwerten von Prothrombinzeit (International Normalized Ratio, INR), Serumbilirubin und Serumkreatinin. Die Dauer der Konservierung des Spendeorgans, die kalte Ischämiezeit, spielt ebenfalls bei einer Allokation eine Rolle. Um eine gute Organfunktion zu gewährleisten, wird daher bei gleichem MELD-Score der regional gelistete Empfänger vorgezogen³⁴ (Bundesärzte Kammer, 2014).

1.1.4 MELD-Score

Der MELD-Score wurde eingeführt, um die Mortalität bei Patienten mit schweren Lebererkrankungen besser einschätzen zu können und die Dringlichkeit einer Transplantation bei nicht-malignen Lebererkrankungen bestimmen zu können³ (Angeli P, 2012).

Ursprünglich wurde er aber etabliert, um „postoperative Mortalität bei Patienten, welche eine Leberzirrhose haben, das Risiko eines transjugulären intrahepatischen Shunts“ abschätzen zu können²¹⁰ (Yantorno SE, 2007).

Heutzutage wird dieser Score für die Allokation von Organen auf der Warteliste genutzt⁴⁴ (Christensen E, 2004), 116 (Malinchoc M, 2000). Geltend ist das Grundprinzip, dass der kranke Patient zuerst ein Organ erhält⁷⁰ (Freeman RB Jr, 2002). Mit Einführung des MELD-Scores zeigte sich eine Reduktion der Mortalität innerhalb der Wartelisten, da eine schnellere Allokation stattfinden konnte¹⁴⁶ (Pichlmayr R, 1988).

Berechnet wird der MELD-Score mit der Formel:

„ $R = 9,6 \times \log_e(\text{Kreatinin}[\text{mg} / \text{dl}]) + 3,8 \times (\text{Bilirubin}[\text{mg} / \text{dl}] + 11,2 \times \log_e(\text{INR})) + 6,4$ „⁴³

(Cholongitas E, 2006)

Hiefür gehen der Kreatininwert als Parameter für die Nierenleistung, das Bilirubin als Parameter für die Ausscheidungsfunktion der Leber und der INR als Parameter für die Gerinnungsleistung der Leber in die Berechnung mit ein.

Wurde eine Dialysebehandlung in der Woche vor Meldung durchgeführt, wird automatisch ein Höchstwert des Kreatinins von 4,0mg/dl berechnet. *Tabelle 3* zeigt die Korrelation zwischen MELD-Score und der Drei-Monats-Mortalität auf. Daraus ist zu entnehmen, dass ein höherer MELD-Score ein kürzeres Überleben bedingt. Liegt der MELD-Score bei 40, so versterben rund 98% der Patienten innerhalb von neunzig Tagen.

Tabelle 3: Eckpunkte der MELD-Score-Äquivalente

Quelle: Model for end-stage liver disease, Jung GE⁹⁰

Eckpunkte der MELD-Score-Äquivalente	
MELD-Score	Drei-Monats-Mortalität
6	1%
10	2%
15	5%
20	11%
22	15%
24	21%
26	28%
27	32%
28	37%
29	43%
30	49%

31	55%
32	61%
33	68%
35	80%
36	85%
37	90%
38	93%
39	96%
40	98%

Kritisch muss bei Berechnung des Scores gesehen werden, dass aufgrund unterschiedlicher Messtechniken von Instituten, eine Varianz innerhalb Laborparametern auftreten kann.

Als Beispiel lässt sich der Serum-Kreatinin-Wert anführen, welcher eine Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, der ethnischen Zugehörigkeit eines Menschen und dessen Muskelmasse zeigt⁴² (Cholongitas E, 2007), 201 (Washburn K, 2005). Ein reduzierter Ernährungszustand eines Patienten führt ebenso zu einem niedrigen Kreatininwert, woraus sich wiederum ein erniedrigter MELD-Score ergibt⁴³ (Cholongitas E, 2006). Ebenso kann eine therapeutische Behandlung des hepato-renalen Syndroms zu einer Senkung des Kreatininwertes beitragen³ (Angeli P, 2012). Ein Ansteigen des MELD-Score ergibt sich durch eine Antikoagulationstherapie mit Phenoprocoumon (*Marcumar*®), was zu einem Anstieg des INR führt⁷ (Asrani SK, 2011). Eine Indikation für eine Lebertransplantation wird ebenfalls beim Hepatozellulären Carcinom (HCC) gesehen, sofern die Milan-Kriterien zutreffend sind. Der Tumor muss $\leq 5\text{cm}$ sein, oder es dürfen maximal ≤ 3 Herde vorliegen, welche kleiner als $\leq 3\text{cm}$ sind. Unabdingbar ist dabei eine Anpassung des MELD-Scores, da die Gefahr besteht, dass eine Progression des Tumors die Mortalität drastisch steigert. Aufgrund der anfänglich geringen Einschränkung der hepatischen Leistung werden bei Listung zunächst nur niedrige MELD-Scores erzielt. International wurde deshalb ein Konsens vereinbar, der automatisch einen höheren MELD-Score bei Patienten mit HCC vergibt²⁰¹ (Washburn K, 2010).

1.1.5 Organtransplantabilität aus pathologischer Sicht

Im Allgemeinen werden Spenderlebern bei der Entnahme nur klinisch auf ihre Eignung untersucht.

Palpatorisch können so Kontraindikationen für eine Annahme, wie zirrhotische Umbauprozesse der Leber oder größere Tumoren entdeckt werden.

Abbildung 4 verdeutlicht die schrittweise Entwicklung einer gesunden Leber über Umbauprozesse des Leberparenchyms, bishin zu einem Karzinom, das gegebenenfalls eine Kontraindikation zur Annahme eines Spenderorgans darstellt.

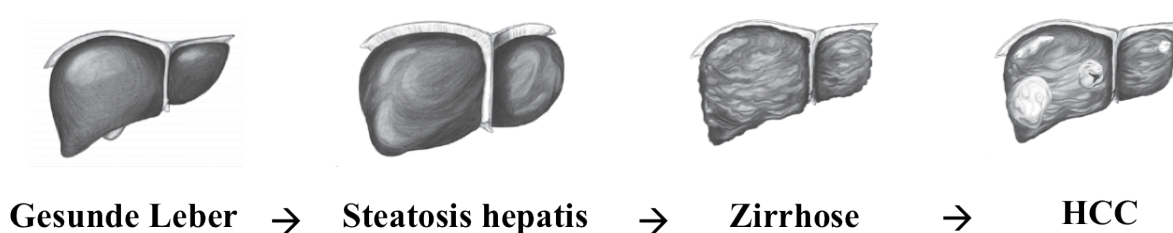


Abbildung 4: Stadien einer chronischen Lebererkrankung

Quelle: <http://www.deutsche-leberstiftung.de/aktuelles/presseportal/bilder/grafiken>⁷⁵

Die klinische Expertise eines Arztes ist für den Erfolg einer palpatorischen Untersuchung maßgebend¹³⁹ (Olthoff, 2004). Wünschenswert wäre deshalb eine standardisierte Untersuchung, die es ermöglicht zum Beispiel durch einen histologischen Schnellschnitt, eine präzise Aussage über die Organqualitäten zu treffen¹²⁶ (Melin C, 2013) und dies nicht allein abhängig von der Erfahrung eines Mediziners zu machen. Letztendlich vermag eine histologische Untersuchung genauer über eine Akzeptanz bzw. Ablehnung von Spenderlebern entscheiden können.

So können Steatosis hepatis (Fettleber), virale Hepatiden, Fibrosierungsgrad, Granulomanzahl, portale Inflammation, Nekrosen und mögliche Anzeichen einer Malignität als Kriterien für eine Beurteilbarkeit herangezogen¹³⁰ (Natori S, 1997). Bei einer Steatosis hepatis wird dabei zwischen der kleintropfigen (mikrovesikulären) und großtropfigen (makrovesikulären) Leberzellverfettung unterschieden¹¹⁵ (Magliocca JF, 2006). Es kann wiederum eine geringgradige (< 33%), eine mittelgradige (33-60%)

oder eine hochgradige (> 60%) makrovesikuläre Leberzellverfettung vorliegen⁷ (Asrani SK, 2011), 87 (Imber CJ, 2002).

Eine hochgradige Steatose stellt einen Risikofaktor dar, der mit einem höheren Transplantatversagen assoziiert ist⁵⁰ (Crowley H, 2000), 91 (Kakizoe S, 1990), 149 (Post S, 1994).

Weiterhin stellen eine fibrosierte Leber, ab einem bestimmten Fibrosierungsgrad (BANFF > 2)¹⁶ (Batts KP, 1995), 126 (Melin C, 2013), eine Hepatitis, sofern es sich um einen nicht infizierten Empfänger handelt¹¹⁸ (Marroquin CE, 2001), 196 (Velidedeoglu E, 2002), sowie Hinweise auf malignes Gewebe, eine Kontraindikation dar.

Keine Kontraindikationen für eine Verwendung des Organs stellen histologische Befunde wie mikrovesikuläre Verfettung⁵⁶ (Doyle MBM, 2010), Granulome, eine nichtspezifische mononukleäre Inflammation (oft bei Sepsis präsent)¹²⁶ (Melin C, 2013), Pigmentablagerungen und Eisenablagerung sowie eine fokal noduläre Hyperplasie dar¹²⁶ (Melin C, 2013).

1.1.6 Definition marginale Organe

Aus klinischer und wissenschaftlicher Sicht steht bis heute keine einheitliche Definition für Organe mit erweiterten Spendekriterien (marginale Organe/expanded donor criteria) zur Verfügung.

Die Bundesärztekammer in Deutschland stuft in den Richtlinien zur Organtransplantation nach „§ 16 Absatz 1, Satz 1, Nummer 2 und 5 TPG“⁸⁵ (Bundesärztekammer, 2013) folgende Kriterien als eingeschränkt vermittelbare Organe ein: „Alter des Spenders > 65 Jahre, Intensivaufenthalt des Spenders > 7 Tage, Adipositas des Spenders mit einem BMI > 30kg/m², histologisch gesicherte Fettleber > 40%, Serum-Natrium > 165mmol/l, Serum-GOT oder Serum-GPT > 3x normal oder S-Bilirubin > 3mg/dl (letzter Wert vor der Spendermeldung)“⁸⁵ (Bundesärztekammer, 2013), 148 (Ploeg RJ, 1993), 150 (Pratschke S, 2009). In der Literatur werden zudem Geschlecht, Rasse, Blutgruppe, Ursache des Hirntodes, pulmonale Dekompensation, Katecholaminverbrauch, positive Hepatitisserologie des Spenders, Herzstillstand und kalte Ischämiezeit genannt³⁶ (Busuttill RW, 2003), 39 (Cameron AM, 2006), 158 (Rogiers X, 1996).

Tabelle 4: Eingeschränkt vermittelbare Organe

Eingeschränkt vermittelbare Organe
<ul style="list-style-type: none">- Alter des Spenders > 65 Jahre- Intensivaufenthalt des Spenders > 7 Tage- Adipositas des Spenders mit BMI > 30kg/m²- Histologisch gesicherte Fettleber > 40%- Serum-Natrium > 165 mmol/l- Serum-GOT oder Serum-GPT > 3x normal oder S-Bilirubin > 3mg/dl

Die aktuelle Studienlage widerlegt oft gehegte Befürchtungen eines schnelleren Transplantatversagens oder einer Mortalitätssteigerung durch den Einsatz marginaler Organe¹⁵⁰ (Pratschke S, 2009). Vor allem durch die perioperative Optimierung, das gezielte Abwägen und das verbesserte Patientenmanagement werden zufriedenstellende Ergebnisse erzielt, die einer Standardtransplantation in nichts nachstehen³⁷ (Calne R, 1998), 73 (Goldaracena N, 2012), 119 (Marti J, 2012). Andererseits wurde aber auch festgestellt, dass bei einem MELD-Score > 30 das Ein-Jahres-Überleben von 90% auf 80% gesunken ist, was möglicherweise auf der Verwendung von marginalen Organen zurückzuführen ist¹⁶⁶ (Schlitt H, 2011).

1.1.7 Chirurgisches Verfahren

Die orthotope Lebertransplantation nach *piggy-back* Technik, beschrieben durch *Tsaki et al.* im Jahre 1989¹⁹³ (Tzakis A, 1989), 195 (Urata K, 1995), hat sich in seiner modifizierten Form als chirurgisches Verfahren der Wahl etabliert. Vorarbeiten zur orthotopen Transplantation lieferte bereits *Calne* im Jahre 1968³⁸ (Calne RY, 1968). Grundsätzlich zeichnet sich die *piggy-back* Technik durch den Erhalt der unteren Hohlvene (Vena cava/ V. cava) aus. Die Leber wird von der V. cava abpräpariert und kann nach Durchtrennung der Lebervenen, bei denen zuvor der Blutfluss durch eine Gefäßklammer unterbunden wurde, aus dem Situs explantiert werden. Die Transplantatleber wird mit anhängender V. cava in den Situs gelegt. Danach werden die Empfängerlebervenen und die Lebervenen der Transplantatleber anastomosiert¹²¹ (Massarollo, 1998). Um einen Blutverlust über die Spender-V. cava zu verhindern, wird diese, kaudal der Transplantatleber, mit einer Naht blind verschlossen⁷⁶ (De Groot H, 2007), 191 (Todo S, 2004).

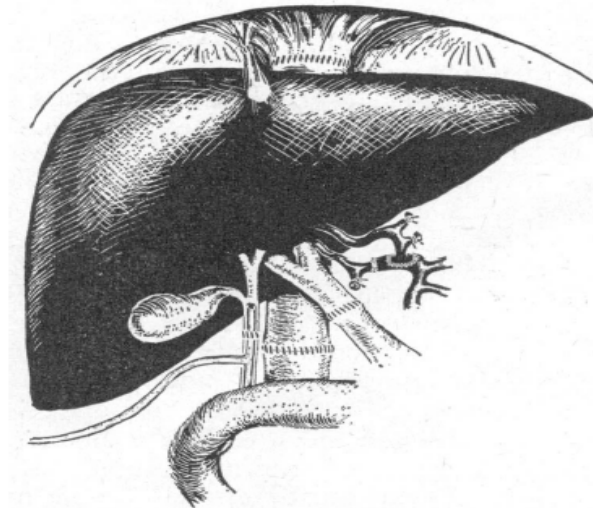


Abbildung 5: Anastomosen der Spenderleber in-situ

Quelle: II. A report of two orthotopic liver transplants in adult recipients, Calne RY et al.³⁸

Einen Vorteil der *piggy-back* Technik sehen einige Autoren in der Tatsache, dass eine Reduzierung des Blutverlustes¹³⁵ (Nishida S, 2006) ermöglicht wird. Zugleich wird eine Verkürzung der warmen Ischämie (Unterbrechung des Blutstroms) erreicht. Dadurch wird eine hämodynamische Stabilität²⁰ (Belghiti J, 1995), 80 (Hesse UJ, 2000) während der anhepatischen Phase garantiert, da die V. cava entweder gar nicht oder nur partiell abgeklemmt ist¹⁵⁴ (Reddy KS, 2000). Ebenso kann dadurch auf einen venösen Bypass verzichtet werden¹⁷¹ (Shaw BW Jr, 1984). Die Gefahr von Luftembolien und Thromboembolien werden durch das Fehlen eines veno-venösen Bypass deutlich reduziert⁵³ (Denmark SW, 1983). Zugleich wird eine Ansammlung von Kalium und Lactat aufgrund einer Ischämie aus der unteren Körperhälfte durch eine Abklemmung verhindert⁵⁷ (Drebber PDU, 2011). Durch die Unterbindung des venösen Blutstroms besteht die Gefahr der Entwicklung eines Budd-Chiari-Syndroms, wobei ein thrombotischer Verschluss der Lebervenen eintritt¹³¹ (Navarro F, 1999). Als weiterer Vorteil lässt sich anführen, dass durch den Wegfall einer inferioren V. cava-Anastomose erheblich Zeit eingespart wird, was zur Reduktion der ischämischen Schädigung führt. Dadurch, dass weder eine retrocavale Dissektion noch eine Dissektion im suprarenalen Bereich durchgeführt wird, wodurch es zu Verletzungen der Gefäße in diesen Gebieten kommen könnte, wird präventiv der Blutverlust gesenkt.

1.1.8 Split-Leber Transplantation

Die Split-Leber Transplantation eröffnet eine weitere Nische zur Vergrößerung des Spenderpools. Diese wurde zum ersten Male im Jahre 1988²⁴ (Bismuth H, 1998), 122 (Matevosjan E, 2010) beschrieben. Nach anfänglichen Rückschlägen³¹ (Broelsch CE, 1990) bietet diese Art der Transplantation nun eine Alternative zur orthotopen Lebertransplantation. Vor allem in der Pädiatrie konnten annähernd gleiche Ein-Jahres-Überlebenszahlen erzielt werden, wie durch eine gewöhnlichen Transplantation¹⁹ (Becker NS, 2008).

Technisch erfolgt eine operative Entfernung der Leberhälfte (Hemihepatektomie), bevorzugt durch die Cava-Gallenblasen-Linie („Cantlie-Linie“). Grundlage für diese Vorgehensweise ist die schnelle Regenerationsfähigkeit und Hypertrophiebereitschaft der Leber. In der Regel wird ein linksseitiger Anteil (left lateral segmented graft, LLS-Segment II, III) einem Kind transplantiert und die übrigen Segmente (Segment I, IV- VIII) werden einem Erwachsenen zugeteilt⁶³ (Emre S, 2011), 158 (Rogiers X, 1996).

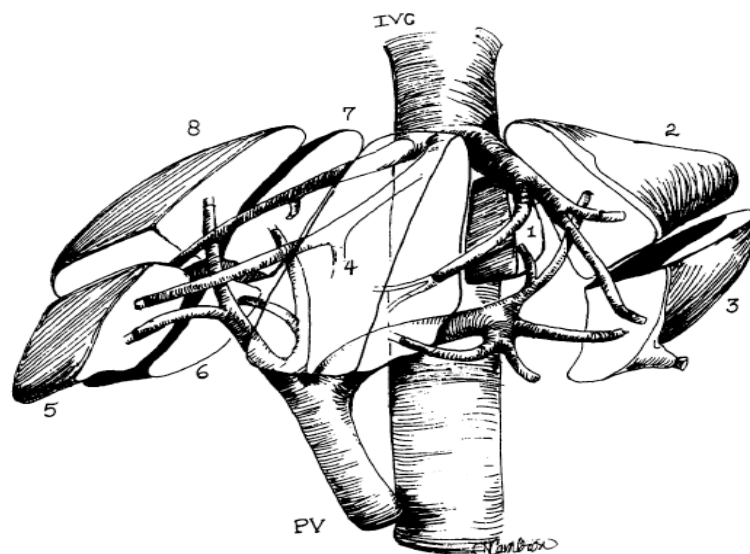


Abbildung 6: Lebersegmente

Quelle: Split Liver Transplantation, Busuttill RW et al.³⁵

PV= portal vein, Pfortader; IVC= inferior vena cava, inferiore Vena cava³⁵

Vor allem Patienten mit primär billiärer Zirrhose (PBC) und primär sklerosierender Cholangitis (PSC) profitieren von einer Split-Leber Transplantation. Der Grund dafür

ist der Tatsache geschuldet, dass Patienten mit diesen Krankheiten ein geringes Körpergewicht aufweisen und sich dadurch die Suche nach einem der Größe und dem Gewicht entsprechendem Spenderorgan erschwert. Darüber hinaus wird eine Progression der Grunderkrankung, wie zum Beispiel ein Gallengangskarzinom bei PSC Patienten¹³⁴ (Neuhaus P, 2005), verhindert. Über eine Erweiterung der Indikationsstellungen für eine Lebertransplantation sollte auch bei Patienten mit einem HCC nachgedacht werden, um so die Wartezeit auf ein Organ zu minimieren und dem Patienten rechtzeitig das Leben zu retten¹⁹¹ (Todo S, 2004). Qualitativ gilt, dass Organe von Spendern unter sechzig Jahre bessere postoperative Organfunktionen erzielen als Organe von Spendern, die wesentlich älter sind¹ (Abradelo M, 2012). Unterschiede in der postoperativen Transplantatfunktion durch in-situ oder ex-situ Hepatektomie scheinen marginal zu sein, wobei allerdings die kalte Ischämiezeit bei in-situ Teilung geringer ist²¹⁰ (Yantorno SE, 2007).

Es kann sowohl eine post mortem gespendete Leber gesplittet werden oder ein Teil stammt von einem Lebendspender. Das Lebervolumen sollte dabei nach der „graft-recipient body weight ratio“ (GRWR) dem Körpergewicht angepasst werden. Bei Lebendspendern sollte die GRWR mindestens ein Prozent des Körpergewichts des Empfängers betragen¹⁸⁷ (Tanaka K, 2004), 195 (Urata K, 1995).

Tabelle 5: Auswahlkriterien der Spenderorgane

Quelle: Split liver transplantation: where? when? how?, Abradelo M et al.¹

Auswahlkriterien (Spender)	
Präoperativ	Intraoperativ
<ul style="list-style-type: none">- Alter- Gewicht/BMI- Aufenthaltsdauer Intensivstation- Hämodynamische Stabilität- Leberfunktionswerte- Infektionsparameter- Tumor-Screening	<ul style="list-style-type: none">- Makroskopische Beurteilung- Mikroskopische Beurteilung- Anatomische Abnormitäten

Tabelle 6: Auswahlkriterien des Empfängers

Quelle: Split liver transplantation: where? when? how?, Abradelo M et al.¹

Auswahlkriterien (Empfänger)

- Volumenverhältnisse (graft-to-recipient weight ratio)
- MELD

In-situ Split-Leber

Durchgeführt wird die in-situ Technik bei hämodynamisch stabilen Spendern. Dabei wird zunächst der linke Ast der Arteria hepatica (A. hepatica) aufgesucht. Während des Prozederes ist es wichtig, die Versorgung des Segmentes IV zu gewährleisten und den Arterienast für dessen Versorgung nicht zu durchtrennen. Anschließend folgt eine Absetzung der Pfortader an der Bifurkation. Rechts, am Lig. falciforme entlang, läuft die Schnittführung der Hemihepatektomie²⁰⁰ (Washburn K, 2005). Um eine Abflussstörung des Segment I zu vermeiden, wird die Schnittführung so gewählt, dass die V. cava beim rechten Leberlappen verbleibt und die mittlere hepatische Vene mit dem linken Leberlappen zieht⁶³ (Emre S, 2011).

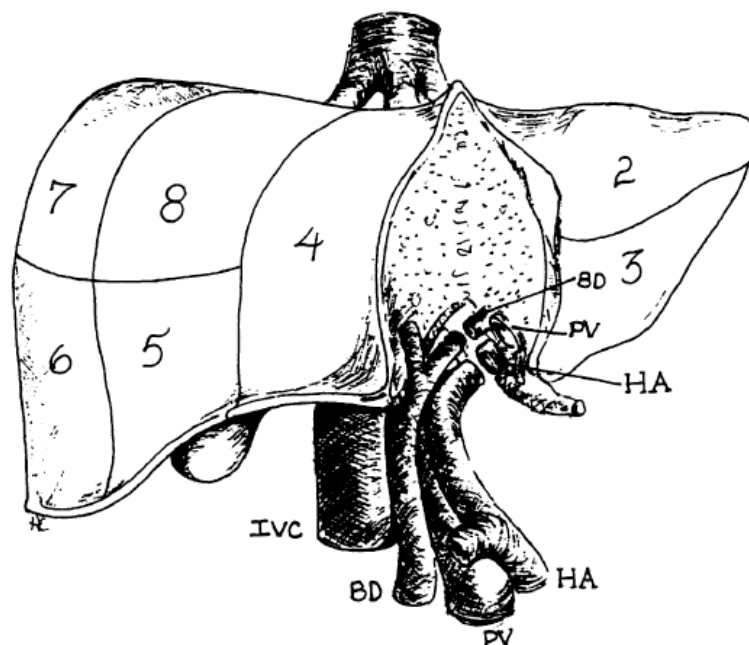


Abbildung 7: Split-Leber

Quelle: Split Liver Transplantation, Busuttill RW et al.³⁵

Darstellung der Lebersegmente und Aufteilung der standardmäßigen Split-Leber. BD= bile duct, Gallengang; HA=hepatic artery, Leberarterie; PV=portal vein, Pfortader; IVC= inferior vena cava, inferiore Vena cava

1.2 Ischämie-/Reperfusionsschaden

Schäden, die in erster Linie durch Ischämie und anschließende Reperfusion bedingt sind, stellen die Transplantationsmedizin weiterhin vor eine Schwierigkeit, die es einzudämmen gilt. Vor allem durch die Verwendung von marginalen Organen muss der I/R vermehrt in den Kontext gerückt werden. I/R werden durch einen Mangel an Sauerstoff bei ischämischer Schädigung hervorgerufen. Mit anschließender Reperfusion und erneuter Freigabe des Blutflusses, zum Beispiel durch Öffnen einer Gefäßklemme oder Reimplantation eines Organs nach kalter Ischämiezeit, wird eine Kaskade in Gang gesetzt, welche eine schädigende Wirkung auf umliegendes Gewebe ausübt⁹⁴ (Kang KJ, 2002). Ausgelöst wird diese Schädigung unter anderem durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Aktivierung von katabolischen Enzymen, die in eine mitochondriale Funktionseinschränkungen⁸⁸ (Jaeschke H, 1989) münden.

In der Transplantationschirurgie wird das häufig verwendete „Pringle-Mänover“²² (Bilzer M, 2002) mit dem I/R in Verbindung gebracht. Durch kurzfristige Abklemmung des Lig. hepatoduodenale wird die Blutzufuhr der Leber, vertreten durch die Pfortader und A. hepatica, unterbrochen. Dies führt zu einer Erleichterung des chirurgischen Arbeitens durch eine Reduzierung des Blutflusses. Nachteilig erweist sich allerdings diese Abklemmung durch eine Behinderung des venösen Abflusses. Ebenso steigt der intravasale Druck in den umliegenden Gebieten an, was zu Zellschäden führt⁵² (Dello SAWG, 2012).

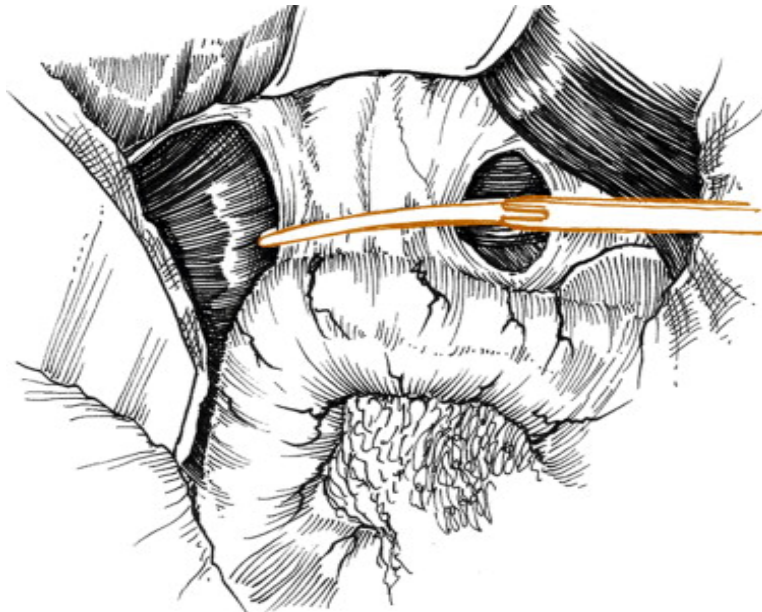


Abbildung 8: Pringle-Manöver

Quelle: Liver Transplantation Techniques for the Surgical Management of Renal Cell Carcinoma with Tumor Thrombus in the Inferior Vena Cava, Ciancio G et al.⁴⁵

Histopathologisch äußert sich der zelluläre Schaden durch ein intersitielles Ödem, inflammatorische Zellinfiltration, mangelnde Vasoregulationsmechanismen und Nekrose⁸¹ (Hiranuma S, 2007).

1.2.1 Pathophysiologie der Ischämiephase

Die ischämische Phase wird eingeläutet durch eine unterbrochene Sauerstoffzufuhr, die in eine Stagnation der mitochondrialen Energieproduktion mündet. Letztenendes kommt es zu einer Abnahme der ATP-Produktion und der oxidativen Phosphorylierung⁹² (Kalogeris T, 2012). Durch den ATP-Mangel wird die Zellhomöostase gestört. Der pH-Wert sinkt, Hydrolasen werden aktiviert, was wiederum eine Permeabilität der Zellmembran bewirkt. Der anerobe Stoffwechsel unterhält zusätzlich den pH-Abfall und führt zu einer Laktatakkumulation⁹² (Kalogeris T, 2012). Die Dysfunktion des ATP-abhängigen Na^+/K^+ -Transporters führt über kompensatorische Steigerung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters zu einer Zunahme der intrazellulären Natrium- und Calciumkonzentration. Eine gesteigerte Permeabilität der Zellmembranen begünstigt ebenfalls diesen Sachverhalt⁷⁶ (De Groot H, 2007), was erneut zu einer gestörten zellulären Homöostase führt.

Der zytosolische Calcium-Anstieg aktiviert seinerseits wiederum Hydrolasen (z.B. Phospholipase A2) und Proteasen. Durch den veränderten Elektrolythaushalt kommt es folglich zu einem passiven Einstrom von Wasser aus dem Extrazellularraum beziehungsweise dem Gefäßsystem, was zu einer Zellschwellung führt. Diese Zellschwellung kann so stark ausgeprägt sein, dass Leberzellen platzen und zugrunde gehen.

1.2.2 Pathophysiologie der Reperfusionphase

Durch Wiedereinsetzen der Blutzufuhr, der Reperfusion, potenziert sich der I/R¹⁴³ (Papadopoulos D, 2013). Dabei spielt die zuvor stattgefundenene lokale Hypoxie, aber auch eine Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen⁷⁴ (Van Golen RF, 2013), eine wesentliche Rolle.

Letztendlich sorgen so eine Erhöhung der mitochondrialen Permeabilität⁸⁸ (Jaeschke H, 2003), eine Abnahme der ATP-Produktion aufgrund von Hypoxie, Kupfer-Zell-Aktivierung, Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, gestörte Elektrolythaushalte von Ca^{2+} , H^+ , Na^+ ⁶⁹ (Franklin TJ, 1969) und eine Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen¹⁴³ (Papadopoulos D, 2013) dafür, dass die Zellen nicht nur durch Apoptose zugrunde gehen, sondern auch durch Nekrose⁸⁸ (Jaeschke H, 2003),⁹⁸ (Kim J-S, 2008).

Eine erneute Versorgung des zuvor hypoxischen Areals mit Sauerstoff durch die Reperfusion führt dazu, dass ROS gebildet werden. Diese sind vor allem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie Hyperoxide des Sauerstoffs (O^{2-} , Sauerstoffanion). In der Literatur herrscht Uneinigkeit über den exakten Pathomechanismus. Einige Autoren gehen davon aus, dass diese durch das Enzym Xanthin-Oxidase/Xanthin-Dehydrogenase gebildet werden⁴¹ (Casillas-Ramírez A, 2006), wiederum andere sind der Meinung, dass die Atmungskette in den Mitochondrien dafür verantwortlich sei⁸⁹ (Jaeschke H, 1989).

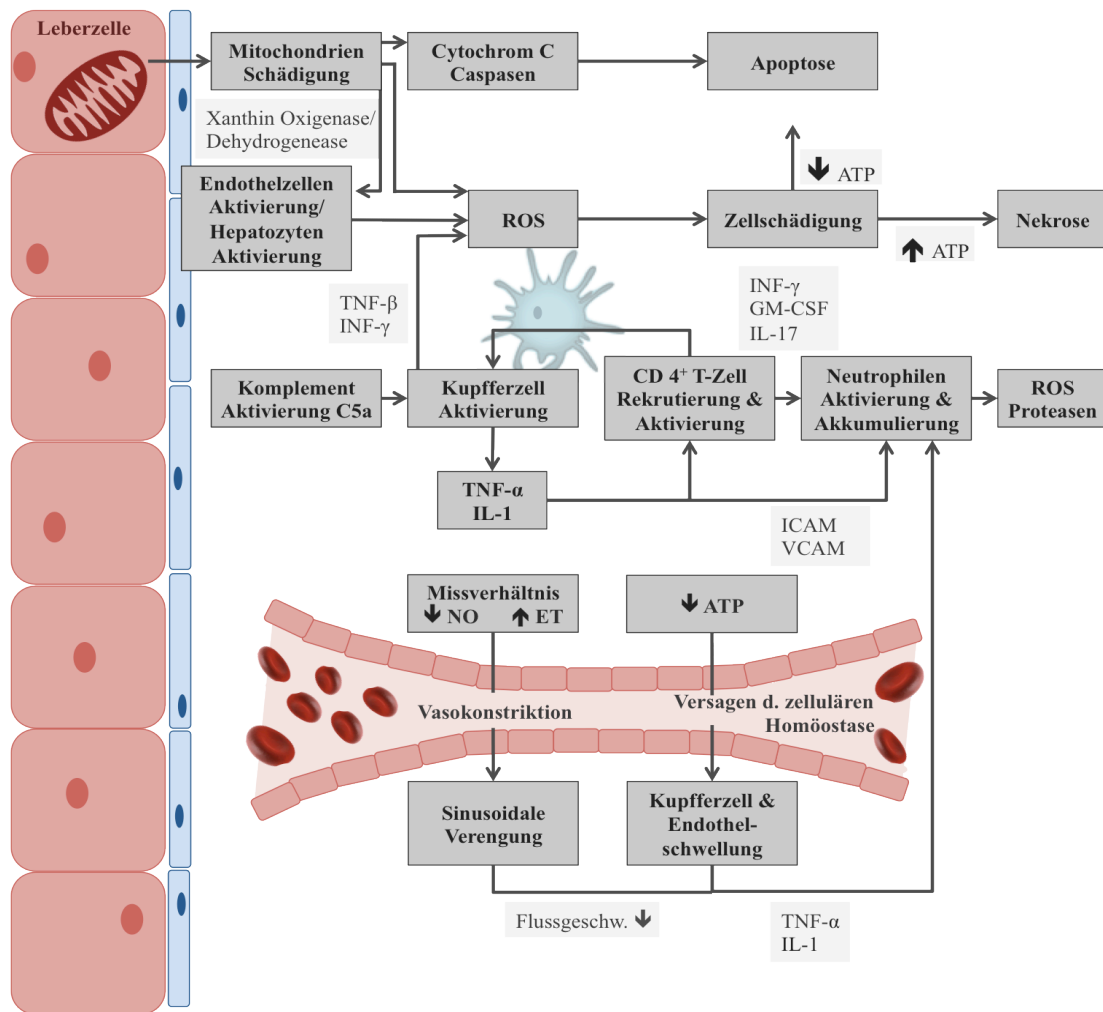


Abbildung 9: Pathogenese des I/R

Zusammenspiel der verschiedenen Schädigungsmechanismen ¹²⁷

Tatsache ist aber, dass die Sauerstoffspezies eine Zellschädigung initiieren. Zum einen dadurch, dass die Desoxyribonukleinsäure (DNS) oxidiert wird und vorhandene Enzyme denaturiert werden, was einen Funktionsverlust der Zellen bewirkt¹⁴³ (Papadopoulos D, 2013). Zugleich erfolgt eine Produktion von verschiedenen nukleären Transkriptionsfaktoren, wie Nuclear Factor kb (NF-kb), Tumor Nekrose Faktor-a (TNF-a) und Interleukin 1 (IL-1). Diese werden durch diverse hepatische Zellen, unter anderem leberspezifische Makrophagen, Kupfer-Zellen, Endothelzellen und parenchymatöse Leberzellen, produziert⁵¹ (Cursio R, 1999). TNF-a potenziert eine Stressantwort der Zellen, wodurch die Apoptose eingeleitet wird. Zudem aktivieren TNF-a und IL-1 die CD4+-T-Lymphozyten aktiviert¹²⁷ (Mendes-Braz, 2012). Diese zytotoxischen Lymphozyten setzen ihrerseits ebenfalls Zytokine frei. So wird granulocytin-colony-stimulating factor (GCSF), Interferon-γ und TNF-b produziert,

welche die Aktivierung von Kupffer-Zellen verstärken, wodurch ein Circulus vitiosus eingeleitet wird. Neutrophile Granulozyten werden durch CXC-Chemokines und Interleukin 8 (IL-8) aktiviert¹²⁷ (Mendes-Braz, 2012). Unheil richten Neutrophile an, sobald diese über die sinusoidale Grenze transmigrieren. Dabei bedarf es Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und Integrinen. Studien zeigen ebenfalls, dass P-Selectin (ein Zelladhäsionsmolekül, von Endothelzellen und Thrombozyten gebildet) eine Rolle spielt¹⁰⁸ (Lentsch AB, 2000), ²⁰⁸ (Yadav SS, 1999). Befinden sich die neutrophile Granulozyten im intrazellulären Raum, so setzen diese Oxidasen und Proteasen frei. Ein wichtiger Mechanismus der neutrophilen Granulozyten spielt dabei die NADPH-Oxidase. Einmal aktiviert, setzt diese O^{2-} aus molekularem Sauerstoff frei. Zugleich sorgen weitere Peroxidasen und Proteasen der neutrophilen Granulozyten dafür, dass weitere Oxidantien wie H_2O_2 und hypochlorige Säure (HClO) entstehen. Diese schädigen unmittelbar das Leberparenchym⁸¹ (Hiranuma S, 2007). Zusammen mit einem gestörten Missverhältnis von NO und Endothelin führen diese Umstände zu einer Verengung der sinusoidalen Lumen, was ebenfalls die Mikrozirkulation einschränkt¹²⁷ (Mendes-Braz M, 2012) und so eine dauerhafte Hypoxie unterhält.

1.3 Protektion der Leber vor I/R

1.3.1 Chirurgische Behandlung

Eine kurze warme Ischämiezeit sollte das primäre Ziel bei einer Transplantation sein, um so den I/R zu minimieren. Dies wird durch eine initiale portale Reperfusion mit verzögerter Arterialisierung⁸⁹ (Jaeschke H, 1989), ¹⁵⁸ (Rogiers X, 1996) erreicht. Zum einen wird dadurch die anhepatische Phase verkürzt und die Aufwärmphase des Organs wird verlängert. Positiv wirkt sich diese Methode auf die Perfusion des Gallengangsystems aus. Es ist dadurch eine niedrigere Rate an biliären Komplikationen¹¹³ (Loganathan S, 2010), ¹²⁹ (Murray JE, 1955) zu verzeichnen. Negativ sollte allerdings eine prolongierte Mikrozirkulationsstörung, durch die verzögerte arterielle Blutversorgung, bewertet werden¹⁴⁹ (Post S, 1994).

Eine andere Möglichkeit zur Minimierung des I/R besteht in der initialen arteriellen Revaskularisierung mit anschließender portaler Perfusion¹⁵¹ (Puhl G, 2005). Hierbei zeigt sich ein verkürzter Verlauf des Postreperfusionssyndroms⁵⁸ (Ducerf C, 2000). Die

Operationsdauer sinkt und der Bedarf an Transfusionen und antifibrinolytischer Therapie fällt¹³⁶ (Noun R, 1997).

Als weitere Möglichkeit lässt sich noch die initial retrograde Reperfusion nach Anastomosierung der *V. cava* im Rahmen der *piggy-back* Technik nennen.

Einige Autoren bevorzugen nach Anastomosierung eine antegrade Reperfusion über die Pfortader. Dabei soll es zu einer geringeren Beeinträchtigung der Hämodynamik kommen. Eine kardioprotektive Wirkung wird so zum Beispiel durch eine verminderte Schwankung des Blutdrucks oder der Herzfrequenz erreicht⁹⁹ (Kniepeiss D, 2004).

Neuere Studien befürworten allerdings die retrograde Reperfusion. Hierbei lässt sich histopathologisch nachweisen, dass der I/R bei retrograder Reperfusion geringer ausgeprägt ist.

1.3.2 Pharmakologische Behandlung

Besondere Wertschätzung werden den Pharmaka zugeschrieben, welche zur Potenzierung oder Induktion der endogenen Schutzmechanismen der Zellen führen.

So kommt der Aminosäure Glycin in Studien besondere Bedeutung zugleich. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz der Aminosäure ein längeres Überleben der Tiere erzielt werden konnte. Der Pathomechanismus hierfür liegt in einem verminderten Natriumeinstrom in die Leberzellen. Des Weiteren blockiert Glycin die Chloridkanäle der Kupffer-Zellen, was dazu führt, dass weniger schädliche Radikale gebildet werden²² (Bilzer M, 2002), 165 (Schemmer P, 2001).

Eine weitere tierexperimentelle Studie zeigte, dass eine intravenöse Infusion mit Gluthathion die Leber vor Reperfusionsschäden schützt¹⁶⁴ (Schauer RJ, 2004).

Grundlegendes Prinzip ist hierbei die Annahme, dass von Leberzellen freigesetztes Gluthathion die Radikalbildung durch Kupffer-Zellen reduziert.

Einen anderen Weg, um das Ausmaß des I/R einzuschränken, findet sich im Calcineurinhemmer Tacrolimus. In einer früheren Studie wurde Tacrolimus genutzt, um Lebern vor einer Transplantation zu spülen, was den Leberzellschaden verminderte und bessere postoperative Ergebnisse lieferte¹⁵³ (Ramirez CB, 2007), 180 (Steffen R, 1989).

Auch Adenosin-Rezeptorantagonisten zeigten in experimentellen Studien eine protektive Wirkung. Sie verbessern unter anderem die eingeschränkte sinusoidale Mikrozirkulation⁵ (Arai M, 2000).

Ebenso finden Apoptose-Inhibitoren¹⁹⁶ (Velidedeoglu E, 2002) Tauroursodesoxycholsäure⁶⁷ (Falasca L, 2001) und Prostaglandine⁴ (Anthuber M, 1996), 123 (Matevossian E, 2009) eine Verwendung.

1.3.3 Ischämische Präkonditionierung

Ein neueres Verfahren zur Reduktion des I/R wird durch die ischämische Präkonditionierung erreicht. Es soll eine Toleranz der Leber gegenüber einer verlängerten Ischämie erzielt werden. Dies wird dadurch erreicht, dass sich Ischämiephasen und Reperusionsphasen abwechseln, wie es zum Beispiel beim Pringle-Manöver durchgeführt wird. Durch den hervorgerufenen Stress werden zelluläre Abwehrmechanismen induziert, die bei andauernder Vulnerabilität die Abwehrfunktion stärken sollen⁴⁶ (Clavien PA, 2003), 47 (Clavien PA, 2000).

1.4 Immunsuppressiva

Immunsuppressive Medikamente sind in der Transplantationsmedizin unersetzlich. Der Erfolg der Organtransplantation hängt im Wesentlichen von der Unterdrückung der Abstoßungsreaktion ab. Ziel ist es das Immunsystem des Empfängers soweit zu unterdrücken, dass das Transplantat nicht abgestoßen wird, aber dennoch eine funktionierende Immunabwehr gegenüber alltäglichen Infektionserregern vorherrscht. Die Einnahme von Immunsuppressiva ist leider immer noch lebenslang von Nöten, was zu einer Vielzahl an schweren Nebenwirkungen führt.

Im klinischen Alltag werden folgende Medikamente am häufigsten eingesetzt: Calcineurinhemmer wie Cyclosporin A oder Tacrolimus, Antimetabolite wie Azathioprin oder Mycophenolat Mofetil, mTOR-Inhibitoren wie Rapamycin, Corticosteroide und Interleukin-2-Rezeptor-Antikörper¹⁴⁷ (Pillai AA, 2009).

Letztendlich zielen all diese Medikamente auf eine Verhinderung der T-Zell-Aktivierung oder in eine Depletion der T-Zellen ab¹⁴⁷ (Pillai AA, 2009).

1. Allgemeiner Teil

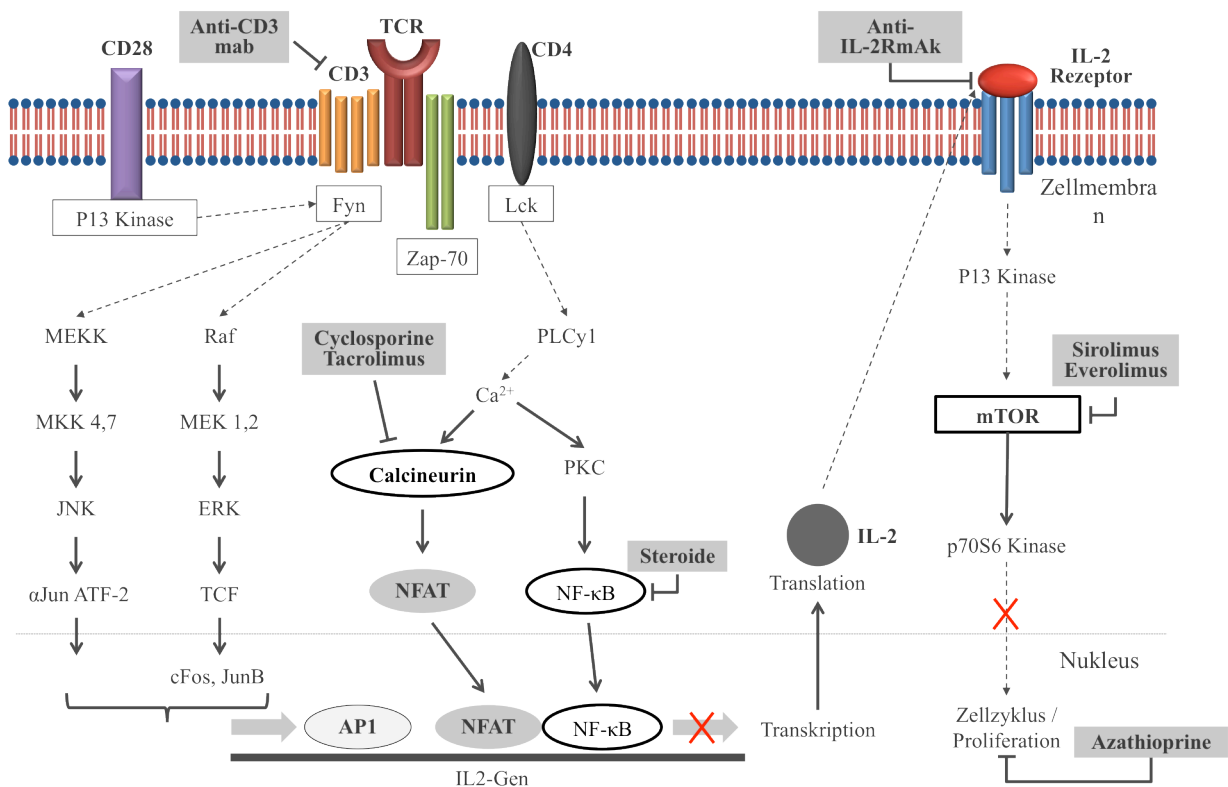


Abbildung 10: Übersicht über die Wirkmechanismen der verschiedenen Immunsuppressiva-Klassen

1.4.1 Corticosteroide

Corticosteroide gehören zu den ältesten Vertretern der Immunsuppressiva. Die antiinflammatorische Wirkung zeigt sich in der Hemmung der Prostaglandinsynthese, Stabilisierung der lysosomalen Membranen, Inhibition der IL-1 Transkription, sowie in einer Hemmung der Bradikinin- und Histaminfreisetzung¹⁸⁹ (Taylor AL, 2005), 212 (Zarrinpar A, 2012). Anwendung finden sie in der Initialtherapie der Immunsuppression und zur Verhinderung einer akuten Abstoßung.

Neben den bekannten Nebenwirkungen wie Diabetes, Hypertonie und Osteoporose⁶¹ (Eason JD, 2003), tragen sie wahrscheinlich auch zu einer Erhöhung der Rezidivhäufigkeit bei HCC bei¹²⁴ (Mazzaferro V, 1994). Ein Wiederauflammen von HCV-Infektionen sowie erhöhte Fibrosierungstendenz konnte ebenfalls verzeichnet werden⁷⁹ (Henry SD, 2007), 198 (Vivarelli M, 2007).

1.4.2 Calcineurininhibitoren

Cyclosporin A (*Sandimmun®*, *Sandimmun Optoral®*, *Neoral®*) und Tacrolimus (*Prograf®*, *FK506*) zählen zu den Calcineurininhibitoren.

Sie werden hauptsächlich in der Erhaltungstherapie eingesetzt. Ihre Wirkung entfalten sie über eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung durch Inhibition von IL-2-Gentranskription⁵⁶ (Doyle MBM, 2010), 163 (Sawada S, 1987). Dies gelingt dadurch, dass Cyclosporin einen Komplex mit Cyclophilin und Calcineurin bildet²¹² (Zarrinpar A, 2012). Tacrolimus wiederum formt diesen Komplex mit FKBP12 und Calcineurin. Hierdurch wird eine nukleäre Translokation von NF-AT verhindert, sowie die Translokation von zytokinischen Genen unterbrochen. Daraus resultiert eine Reduktion der Zytokinproduktion wie zum Beispiel der IL-2 Produktion und eine Inhibition der T-Zell Aktivität und Proliferation²¹² (Zarrinpar A, 2012).

Führe Studien zeigten auf molekularer Ebene eine Überlegenheit von Tacrolimus⁷² (Geissler EK, 2009), dennoch lässt sich klinisch kein Unterschied zwischen Tacrolimus und Cyclosporin feststellen¹⁰⁹ (Levy G, 2006), 110 (Levy G, 2004).

Die aufgeführten Präparate weisen allerdings auch eine Vielzahl an Nebenwirkungen auf. Als besonders relevant gelten die Induktion einer akuten und chronischen Nephrotoxizität¹³⁷ (Ojo AO, 2003). Zudem können eine Hyperkaliämie und eine metabolische Azidose auftreten²¹² (Zarrinpar A, 2012). Als weitere unerwünschte Nebenwirkung wird eine Neurotoxizität beobachtet, welche vor allem durch die Einnahme von Tacrolimus begünstigt wird²¹² (Zarrinpar A, 2012). Diese äußern sich im Auftreten von Tremor, Halluzinationen und Agitation. Auch für das Auftreten eines Diabetes liegen Anzeichen vor⁷⁸ (Haddad EM, 2006).

Cyclosporin begünstigt zusätzlich einen Hypertonus und Hyperlipidämien, was vor allem bei kardiovaskulär schlecht eingestellten Patienten berücksichtigt werden sollte²¹² (Zarrinpar A, 2012). Problematisch wirkt sich der Einsatz von Calcineurininhibitoren auf die Interaktion mit TGF- β 1 aus¹⁰⁰ (Koehl GE, 2004). Der Einsatz der Inhibitoren steigert die TGF- β 1-Produktion, was zu zusätzlich zu einer Nephrotoxizität führt¹⁴⁰ (Olyaei AJ, 2001). Dieses Zytokin begünstigt zudem eine Fibrosierung des Gewebes und fördert die Entstehung von Tumorzellen⁸² (Hojo M, 1999), 147 (Pillai AA, 2009). Vorsicht muss deshalb geboten sein, wenn eine Lebertransplantation aufgrund eines HCC erfolgt. Bei der Verwendung der Calcineurininhibitoren sollte sorgfältig auf HCC Rezidive geachtet werden.

1.4.3 Antimetabolite

Hauptvertreter der Antimetabolite sind mycophenolate mofetil (MMF) und mycophenolate sodium (MPS). Azathioprin ist ein Vertreter dieser Gruppe, der nur noch vereinzelt in der Transplantationsmedizin Anwendung findet⁷² (Geissler EK, 2009).

Durch First-pass-Metabolisierung in der Leber werden MMF und MPS zum aktiven Metabolit Mycophenolsäure (MPA) umgewandelt. Die Wirkung besteht in einer nicht-kompetitiven Inhibition der Inosin-Monophosphat-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym der de-novo Synthese von Guanotin in den Lymphozyten⁶⁹ (Franklin TJ, 1969). Dadurch wird eine immunsuppressive Wirkung entfaltet¹⁸⁹ (Taylor AL, 2005), da eine Proliferation der aktivierten Lymphozyten verhindert wird.

Ein Vorteil von MMF und MPS erweist sich in der niedrigen Nephrotoxizität. Dem gegenüber steht allerdings eine erhöhte Rate an akuter Transplantatabstoßung in der Monotherapie¹⁶⁷ (Schlitt HJ, 2001), ¹⁸² (Stewart SF, 2001). Weitere Nebenwirkungen zeigen sich in gastro-intestinalen Störungen sowie in einer Myelosuppression¹⁷³ (Sollinger HW, 2004), ¹⁸¹ (Streuer W, 2007). Auch virale Infektionen scheinen durch den Einsatz begünstigt zu sein. So können vermehrt Zunahmen an Infektionen mit Cytomegalieviren²⁷ (Boucher A, 2006) und bei Herpes-simplex-Viren¹⁷⁰ (Shaked A, 2009), ¹⁷² (Smak GPJH, 2003) verzeichnet werden. Ebenso kann ein Anstieg von Candida-Infektionen beobachtet werden. Eine progressive multifokale Leukoencephalopathie kann ebenfalls auftreten¹³² (Neff RT, 2008).

1.4.4 mTOR-Inhibitoren

Sirolimus und Everolimus gehören zu den Vertretern der mTOR-Inhibitoren und werden primär in der Erhaltungstherapie eingesetzt⁹⁶ (Kawahara T, 2011), ²⁰² (Watson CJ, 1999).

Sie binden intrazellulär an FKBP 12 und führen dadurch zu einer Inhibition von mTORC1⁶⁵ (Facchinetti V, 2008), ⁷² (Geissler EK, 2009). mTOR kontrolliert die Translation spezifischer mRNA und führt zur Zellzyklusblockade sowie zur IL-2 Signalblockade der T-Zellen²¹¹ (Zamboni F, 2001).

Im Unterschied zu den Calcineurininhibitoren verhindern mTOR-Inhibitoren eine Proliferation von T-Zellen, nicht aber deren Aktivierung. Die in früheren Studien gefundene Gefahr der Inzidenzsteigerung an arterieller Thrombose in der Leber, konnte aber durch neuere Studien widerlegt werden⁵⁹ (Dunkelberg JC, 2003).

Tatsache ist aber, dass der Einsatz von mTOR-Inhibitoren zu einer Erhöhung der Blutfettwerte (Cholesterin) führt. Es kommt dadurch zu einer Verzögerung der

Wundheilung, Beinödemen und zu dermatologischen Problemen wie Mundulzera oder Akne¹⁴⁷ (Pillai AA, 2009).

Im Gegensatz dazu zeichnen sich diese Medikamente aber auch durch einige Vorteile aus. So kann eine Nephrotoxizität durch die Anwendung von Calcineurininhibitoren mit Einsatz von mTOR-Inhibitoren gemildert werden⁶⁶ (Fairbanks KD, 2003), 106 (Lam P, 2004). Rapamycin, auch Sirolimus genannt, ein Vertreter der mTOR-Inhibitoren, zeigte in einer Tierstudie eine anti-cancerogene Wirkung⁷⁷ (Guba M, 2002), 78 (Haddad EM, 2006), 100 (Koehl GE, 2004). Dank einer proliferationshemmenden Wirkung und einer hemmenden Wirkung auf die Angiogenese⁷⁷ (Guba M, 2002) könnte sich diese Substanz möglicherweise für Patienten mit HCC als erfolgsversprechend erweisen.

1.4.5 Polyklonale Antikörper

Anti-Thymozyt-Globulin (ATG) und Anti-Lymphozyten-Globuline (ALG) gehören zur Gruppe der polyklonalen Antikörper. Sie werden vor allem bei Einleitung einer immunsuppressiven Therapie zusammen mit Azathioprin und Corticosteroiden verabreicht, um Nebenwirkungen zu reduzieren⁵⁷ (Drebber PDU, 2011), 61 (Eason JD, 2003), 155 (Richardson AJ, 1989), 189 (Taylor AL, 2005). Sie führen zu einer Lymphozyten-Depletion durch eine komplementsystemvermittelte Zellyse, bei gleichzeitiger Aufnahme durch das reticulo-endotheliale System (RES) durch opsonierte T-Zellen¹⁸⁸ (Taniguchi Y, 1990). Eine partielle Aktivierung von T-Zellen bei einem gleichzeitig vorliegenden Proliferationsblock wird ebenso diskutiert¹²⁸ (Merion RM, 1998). So soll sich das Immunsystem des Empfängers auf das Spenderorgan einspielen können und lernen, es nicht als fremd zu erkennen²¹² (Zarrinpar A, 2012).

Typische Nebenwirkungen äußern sich in Fieber, Blutbildveränderungen wie Thrombozytopenie und Anämie. Ebenso treten vermehrt Zytomegalieinfektionen auf und es können Sensibilisierungen gegenüber diesen Antikörpern auftreten, die im schlimmsten Falle in eine Anaphylaxie führen³³ (Büchler M, 2003), 212 (Zarrinpar A, 2012).

1.4.6 Monoklonale Antikörper

Diese Gruppe beinhaltet Anti-IL2-Antikörper (*Basiliximab*® und *Daclizumab*®), Anti-CD52-Antikörper (*Alemtuzumab*®) und CD53-Antikörper.

Die Zielstruktur der monoklonalen Antikörper stellen spezifisch aktivierte T-Zellen dar. Zusammen mit Calcineurininhibitoren werden sie vor allem in der ersten Phase nach einer Transplantation gegeben¹¹¹ (Liu CL, 2004), 140 (Olyaei AJ, 2001), 144 (Pascual J, 2008), da eine Kombination beider Stoffe die Abstoßungsrate senkt¹¹⁷ (Mangus RS, 2006). Alemtuzumab hat als Zielstruktur Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, natürliche Killerzellen und Thymozyten. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass Alemtuzumab zu einer Depletion von Lymphozyten sowohl im Blut als auch in peripheren Lymphknoten führt. Allerdings muss bedacht werden, dass nicht komplett alle Lymphozyten zerstört werden, da dieser Antikörper Plasmazellen und Gedächtniszellen nicht angreift¹¹⁵ (Magliocca JF, 2006).

1.4.7 Costimulationsblockade

CTLA-4-Antigene wie Belatacept sind Homologe des zytotoxischen T-Zell-Rezeptors CD28. Durch Bindung von CD28 mit CD80 und CD86 auf antigenpräsentierenden Zellen wird unter anderem eine T-Zell-Aktivierung eingeleitet. Zu nutzen macht man sich diese Tatsache, indem CTLA-4 diese Aktivierung verhindert und folglich eine Immunantwort ausbleibt.

Belatacept wird einmal im Monat verabreicht. Es wird von einer guten Verträglichkeit mit MMF und Kortikosteroiden berichtet¹⁹⁷ (Vincenti F, 2005).

1.5 Transplantatversagen

Die kausalen Pathomechanismen, welche postoperativ zu einem Transplantatversagen führen, lassen sich untereinander differenzieren.

So tragen am 1.-5. postoperativen Tag eine Thrombose der A. hepatica oder der V. portae sowie ein „Kinking“ (gewundener Arterienverlauf) der A.hepatica zum Transplantatversagen bei. Ebenso fällt ein primäres Transplantatversagen und eine hyperakute Abstoßung in dieser Zeitspanne¹¹² (Klinikleitfaden Lebertransplantation, LMU, München, 2014).

Innerhalb der ersten Monate nach erfolgter Transplantation finden sich Gallenleckagen und Zeichen einer akuten Abstoßung in der Histologie¹¹³ (Loganathan S, 2010).

Anschließend führen chronifizierende Abstoßungsreaktionen, Gallengangsstrikturen und Infektionen die Liste an. Des Weiteren können erneute Reinfektionen mit Viren (Hepatitis-, Zytomegalie-, Epstein-Bar-, Herpes-simplex- oder Adeno-Viren) auftreten. Auch eine Rekurrenz von Autoimmunerkrankungen (PBC, PSC) ist möglich¹¹² (Klinikleitfaden Lebertransplantation, LMU, München, 2014).

1.5.1 Akute Abstoßung

Obwohl sich die immunsuppressive Therapie verbessert hat, kommt es bei 20-40% der Patienten nach Transplantation zu einer Abstoßungsreaktion unterschiedlichen Ausmaßes¹³³ (Neil DAH, 2010), 170 (Shaked A, 2009). Mit dem Begriff der Abstoßung ist eine durch den Empfänger hervorgerufene, immunologisch vermittelte Zerstörung des Transplantats (Host-versus-Graft-Reaktion) beschrieben. Klinisch wird die Abstoßungsreaktion dabei in drei Kategorien unterteilt: Hyperakute, akute und chronische Abstoßungsreaktion.

Eine hyperakute Abstoßung kommt innerhalb von Stunden bis wenige Tage nach der Transplantation zum Tragen. Letzendlich mündet eine hyperakute Abstoßung im irreversiblen Transplantatversagen. Sie wird in der Regel durch präformierte zytotoxische Antikörper ausgelöst⁸⁶ (Hübscher SG, 1989). Diese richten sich gegen die AB0-Proteine der Erythrozyten oder HLA-Antigene des Transplantats. Pathophysiologisch kommt es zu einer Gefäßokklusion durch Fibrinablagerung⁸⁶.

Eine akute Abstoßung tritt meistens zwischen einer Woche bis zu einem Monat nach Transplantation auf¹³. Kennzeichnend hierfür ist die histologische Trias aus portaler Inflammation, Gallengangsinfektion und Endothelialitis¹⁵¹ (Puhl G, 2005), wobei sich die Endothelialitis auch auf die hepatischen Venolen ausdehnen kann¹³ (Banff schema for grading liver allograft rejection, 1997), 206 (Wight DG, 1994).

In der Histologie dominieren vor allem Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten¹³ (Banff schema for grading liver allograft rejection, 1997). Ebenso zeigt sich eine Gallengangsinfektion und eine subendotheliale Inflammation der portalen Venen oder terminalen Venolen¹³ (Banff schema for grading liver allograft rejection, 1997).

Für eine akute Abstoßung wird in der Literatur die BANFF-Klassifikation verwendet, um ein einheitliches internationales Klassifikationssystem gewährleisten zu können¹⁴² (Ormonde DG, 1999). Dieses setzt sich aus dem „Global assessment“ und dem „RAI“ (Rejection Activity Index) zusammen, was *Tabelle 7* und *Tabelle 8* zusammenfassen.

Tabelle 7: BANFF-Schema für das Grading der Abstoßung im Sinne einer globalen Einschätzung des Rejektionsgrades

Quelle: Aktuelle Aspekte zur Histopathologie im Rahmen der Lebertransplantation, Drebbler PDU et al.⁵⁷; Banff schema for grading liver allograft rejection: Utility in clinical practice, Ormonde DG et al.¹⁴²

Grad	Kriterien
Intermediär	Portale Entzündung (nicht ausreichend den Kriterien der akuten Abstoßung entsprechend)
Mild (Grad 1)	Rejektionsinfiltrat in wenigen Portalfeldern, mild bei intakter Grenzlamelle
Moderat (Grad 2)	Rejektionsinfiltrat in den meisten bzw. allen Portalfeldern
Schwer (Grad3)	Wie bei „moderat“ mit Durchbrechen der Grenzlamelle zum Parenchym, perivenuläre Hepatozytennekrose

Tabelle 8: BANFF-Schema für das Grading der Allograft-Abstoßung: Rejektions-Aktivitäts-Index (RAI)

Quelle: Aktuelle Aspekte zur Histopathologie im Rahmen der Lebertransplantation, Drebbler PDU et al.⁵⁷; Banff schema for grading liver allograft rejection: Utility in clinical practice, Ormonde DG et al.¹⁴²

Kategorie	Kriterien	Score
Portale Entzündung	Lymphozytäres Entzündungsinfiltrat in nicht-erweiterten Portalfeldern	1
	Verbreiterung der meisten oder aller Portalfelder durch gemischtes Entzündungsinfiltrat mit Lymphozyten, wenigen Blasten, Neutrophilen und Eosinophilen	2

	Ausgeprägte Verbreiterung der meisten oder aller Portalfelder durch gemischtes Entzündungsinfiltrat mit Lymphozyten, vielen Blasten, Neutrophilen und Eosinophilen mit Durchbruch zum Parenchym	3
Gallengangs- entzündung	Wenige Gallengänge werden von Entzündungszellen umgeben und infiltriert, geringe reaktive Veränderung wie verschobene Kern-Zytoplasma-Relation	1
	Die meisten Gallengänge sind entzündlich infiltriert. Degenerative Veränderungen mit Kernpleomorphie, gestörter Polarität und vakuolisierten Zytoplasma	2
	Wie bei Score 2 mit Befall aller Gallengänge und fokaler Zerstörung des Gallenganglumens	3
Venöse endotheliale Entzündung	Subendotheliales lymphozytäres Infiltrat in einzelnen, aber nicht in der Mehrheit der portalen oder zentralen Venolen	1
	Subendotheliales Infiltrat in vielen oder allen portalen oder zentralen Venolen	2
	Wie bei Score 2 mit Extension in das perivenuläre Parenchym mit Hepatozytennekrosen	3
Der RAI-Score bildet sich aus der Summe aller Kategorien		

Therapeutisch wird eine akute Abstoßung meist mit Tacrolimus und Glucocorticoiden sowie MMF behandelt¹⁹² (Turner AP, 2013).

Eine chronische Abstoßung kann sich über den ersten Monat nach Transplantation¹⁷⁸(Starzl TE, 1982) bis über mehrere Jahre nach dem Eingriff ereignen. Es kommt zu einer schleichenden Transplantatdysfunktion. Vor allem eine durch Makrophagen vermittelte Endovaskulitis, eine Gallengangssklerose¹⁷⁵ und eine dadurch entstehende Cholestase sowie Leberzelluntergänge prägen das histologische Bild²⁰⁶ (Wight DG, 1994). Letztendlich mündet die Entzündung in einer Verengung der Gefäße, was eine Ischämie zur Folge hat und so zum Zelluntergang mit drohendem Organverlust führen kann.

1.6 Die Lebertransplantation am Rattenmodell

Das Rattenmodell hat sich als Versuchsmodell in der Lebertransplantation etabliert, da das Verfahren beim Tier weitestgehend dem des Menschen gleicht und die Möglichkeit besteht, genetisch gleiche (syngene) Tiere aus einem Inzuchtstamm für die Untersuchungen heranzuziehen. Dadurch wird gezielt eine immunologische Abstoßungsreaktion durch das HLA-System verhindert.

Die Transplantation im Rattenmodell wurde erstmalig von *Lee et al.* im Jahre 1973 beschrieben. Durch den Einsatz von Cuffs wurde das Modell von *Kamada* im Jahre 1979 modifiziert. Dies führte zu einer kürzeren Phase, in welcher die Pfortader abgeklemmt war. Dadurch konnte eine Reduktion an biliären Komplikationen erzielt werden⁹³ (*Kamada N, 1979*), 161 (*Sankary HN, 1995*). Bei der *Kamada*-Technik erfolgt eine Anastomosierung der suprahepatischen und infrahepatischen inferioren Vena cava, der Pfortader und des Gallengangs, wobei die Anastomosierung der Pfortader sowie der infrahepatischen inferioren V. cava in Cuff-Technik durchgeführt wird⁹³ (*Kamada N, 1979*).

Über eine Gefäßanastomose wird die suprahepatische inferiore V. cava adaptiert und der Gallengang mithilfe einer Teleskopmethode (22 G Kanüle) verbunden.

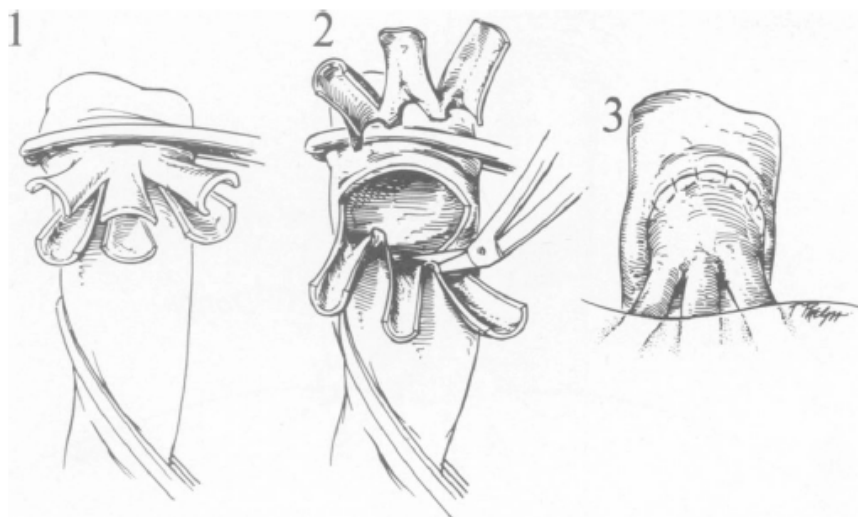


Abbildung 11: Abklemmung der hepatischen Venen und Präparation eines Cuffs

Quelle: Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava Tzakis A et al.¹⁹⁴

Die Cuff-Technik findet sich bei humanen Transplantationen allerdings nicht. Hier wird stets auf eine Gefäßnaht zurückgegriffen. Vorteil der Gefäßnaht ist eine geringere Thrombosierungsrate post transplantationem. Eine solche Gefäßnaht benötigt im Rattenmodell ausgezeichnete mikrochirurgische Fähigkeiten¹²² (Matevosjan E, 2010). Auch beansprucht eine Gefäßnaht ein längeres Zeitintervall, was wiederum die anhepatische Phase während der Operation verlängert. Als Lösung wurde deshalb die Cuff-Technik eingeführt. Als nachteilig wirkt sich die Cuff-Technik allerdings auf den Blutfluss aus. Dieser ist hämodynamisch gestört, was mit einer möglicher Thromboseentwicklung im Cuff-Bereich und möglichen immunologischen Reaktionen auf das Cuff-Material einhergeht⁹⁵ (Kashfi A, 2005), 180 (Steffen R, 1989).

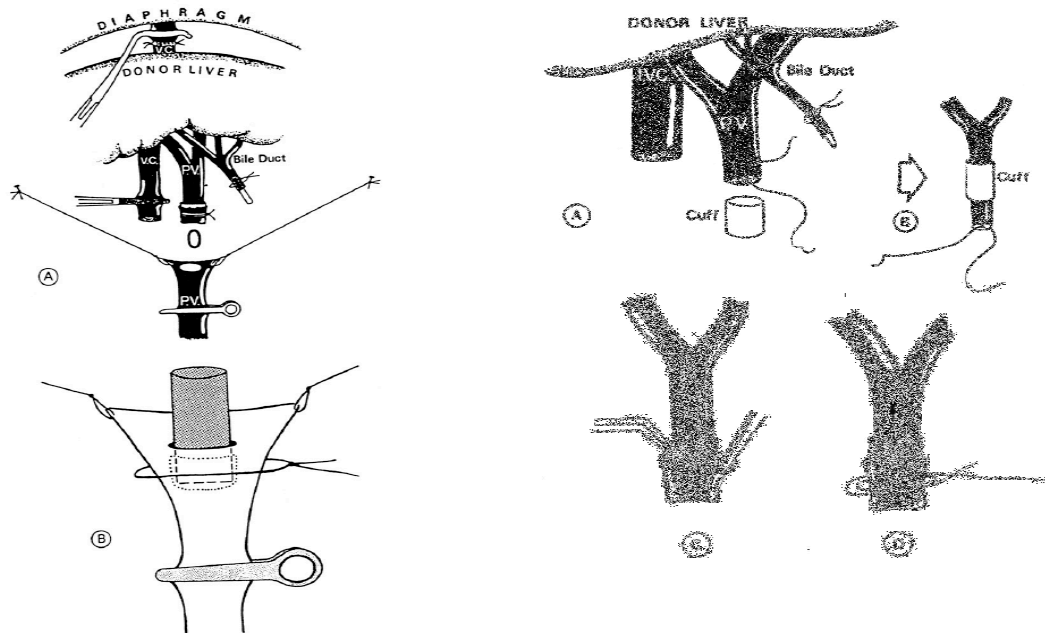


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Cuff-Technik

Quelle: Graftpotektive Strategien Zur Prävention Der Akuten Abstossung Und Reduzierung Des Ischämie-/Reperfusionsschadens Nach Orthotoper Lebertransplantation Im Rattenmodell, Matevosjan E et al.¹²²

1.6.1 Anatomie der Rattenleber

Anatomisch besteht eine große Ähnlichkeit zwischen der Leber des Menschen und der der Ratte.

So ist die Rattenleber ebenfalls multilobulär aufgebaut. Bei einem Körpergewicht der Ratte von 250 - 300g entspricht das mittlere Gewicht der Leber ungefähr 13g¹²⁰ (Martins PNA, 2007). Die Leber weist eine Länge von 3,8cm - 4,2cm und einer Breite von 2,2cm - 2,5cm auf¹²⁰ (Martins PNA, 2007). Eine Unterteilung der Leber in Segmente erfolgt nach Versorgung durch die Pfortader: Lobus caudatus mit Processus (Proc.) caudatus, Procc. papillares¹⁰¹ (Kogure K, 1999), Lobus sinister übergehend in Lobus medianus und Lobus dexter¹²⁰ (Martins PNA, 2007).

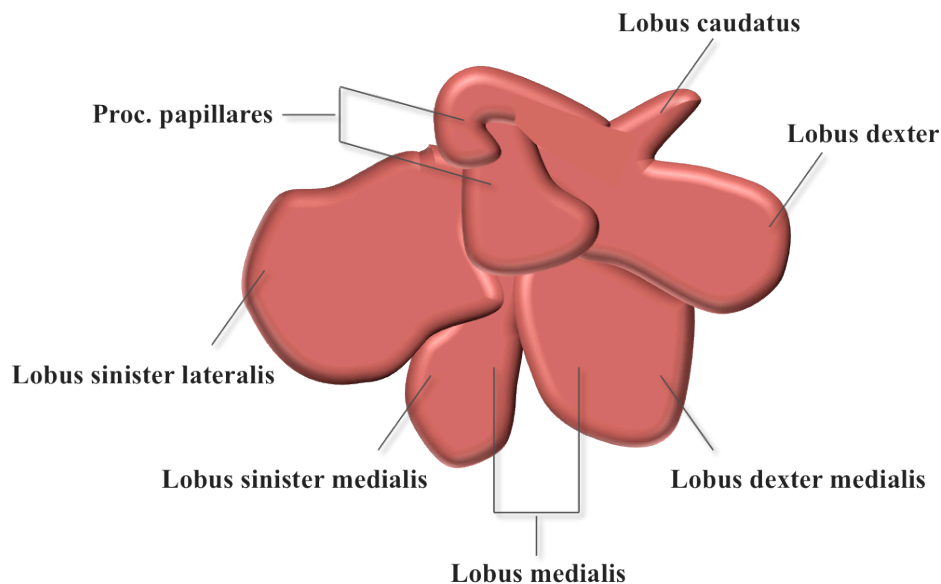


Abbildung 13: Die Segmentaufteilung der Rattenleber

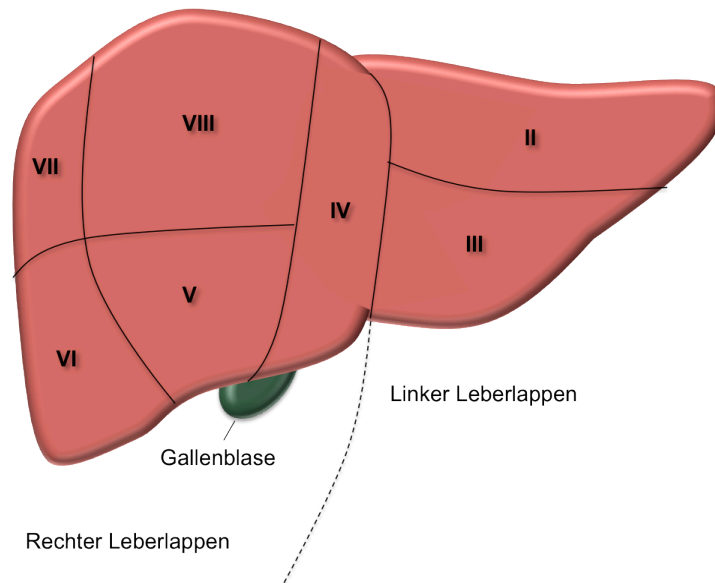


Abbildung 14: Die Segmentaufteilung der menschlichen Leber

Ein Vergleich zwischen der humanen Leber und der Rattenleber kann nach Beschreibungen von *Couinaud*⁴⁹ (Couinaud C, 1994) an der menschlichen Leber aus dem Jahre 1994, vorgenommen werden. So gleicht das II. und III. Segment der menschlichen Leber dem Lobus sinister lateralis der Ratte, welcher von zwei portalen Ästen durchzogen wird. Diese Kongruenz findet sich auch zwischen Lobus sinister medialis und dem IV Segment. Ein weiterer Pfortaderast versorgt auf der rechten Seite den Lobus quadratus¹²⁰ (Martins PNA, 2007). Auf den Menschen übertragen, entspricht dies der Versorgung für das Segment V und VIII. Einen separaten Blutzuffluss erhalten der Lobus dexter und der Proc. caudatus, was sich beim Menschen im Segment VI und VII widerspiegelt¹²⁰ (Martins PNA, 2007). Der Proc. papillares, anlehnend an das humane Segment I, wird von einem linksseitig gelegenen Pfortaderast versorgt. Jener teilt sich wiederum in zwei Segmentäste auf¹²⁰ (Martins PNA, 2007).

Anatomisch überdecken die größten Lappen, der mittlere und linke Leberlappen, die restlichen in situ.

Der Lobus sinister schließt einen lateralen Anteil und einen kleineren medialen Anteil ein. Angrenzend an die rechte Niere befindet sich der rechte Leberlappen. Ebenso steht der Proc. caudatus in Kontakt mit der rechten Niere. Die zwei zugehörigen Procc. papillares stehen beide in Kontakt mit dem Magen. Bei der Ratte findet sich ebenso wie beim Menschen ein ligamentärer Halteapparat¹²⁰ (Martins PNA, 2007). Das Lig. falciforme ist an der ventralen Bauchwand und dem Diaphragma befestigt und zieht

zwischen den Lobus sinister lateralis und Lobus sinister medialis. Das Lig. coronarium zieht an der Austrittsstelle der V. cava caudalis nach dorsolateral und bildet die Plicae triangulare. Der Eintritt der großen Gefäße, wie A. hepatica und die Pfortader, findet sich ventral der V. cava caudae, vor dem Proc. caudatus gelegen. Über das hepatogastrale Ligament ist die Leber mit dem Magen verbunden. Zum Duodenum steht die Leber mit dem hepatoduodenalen Band in Kontakt.

Ein wichtiger Unterschied zur humanen Leber besteht in der Tatsache, dass die keine Gallenblase bei der Ratte vorliegt. Der Abfluss der Gallenflüssigkeit erfolgt kontinuierlich über den Ductus choledochus ins Duodenum.

1.7 Energiegewinnung der Hepatozyten

1.7.1 ATP

ATP, Adenosin-Triphosphat, ist ein universeller Energielieferant der Zelle und ein bedeutendes Signalmolekül der intra-/extrazellulären Signalkaskade. Es dient unter anderem zur Aktivierung von Kinasen und als Agonist an Rezeptoren. Strukturell setzt sich ATP aus dem Zucker Ribose zusammen, der mit drei Phosphatresten und einem Adenosinrest verbunden ist.

Die energiereichen Phosphoanhydrid-Bindungen der Phosphate stellen dabei die Quelle der Energiepotenz des ATPs dar.

So führt die hydrolytische Spaltung einer Phosphoanhydrid-Bindung zur Bildung von ADP und zur Bereitstellung von rund 33 kJ/mol⁵⁵ (Doenecke D, 2005).

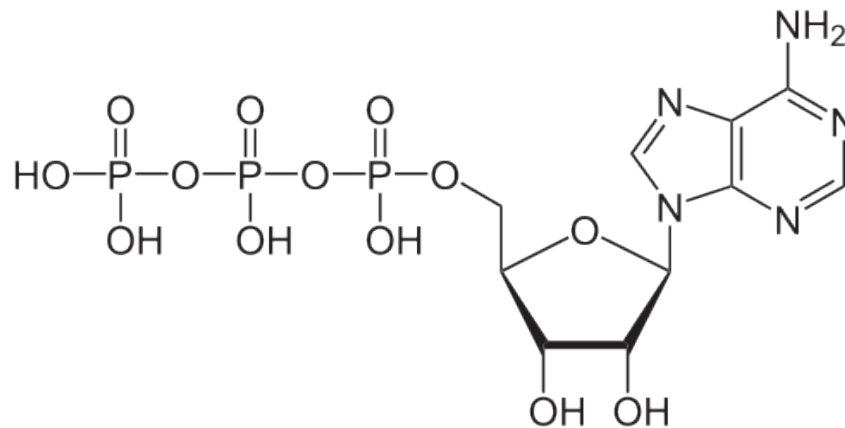


Abbildung 15: chemische Struktur von ATP

1.7.2 Struktur der ATP-Synthase

Die Synthese des ATP wird durch einen elektrochemischen Gradienten, einen Protonenstrom, der durch das Enzym ATP-Synthase erzeugt wird, getrieben¹⁹⁰ (Theruvath TP, 2008).

Dabei fungiert die ATP-Synthase auf zwei unterschiedliche Arten: Zum einen kann mit Hilfe eines erzeugten Protonengradienten ATP gebildet werden, zum anderen kann unter Verbrauch von ATP ein Protonengradient aufgebaut werden.

Strukturell ist die ATP-Synthase ein 550 - 650kDa großer Proteinkomplex¹² (Baker LA, 2012), 40 (Capaldi RA, 2002), welcher in Chloroplasten, der Zellmembran von Bakterien und beim Menschen in den inneren Membranen der Mitochondrien lokalisiert ist.

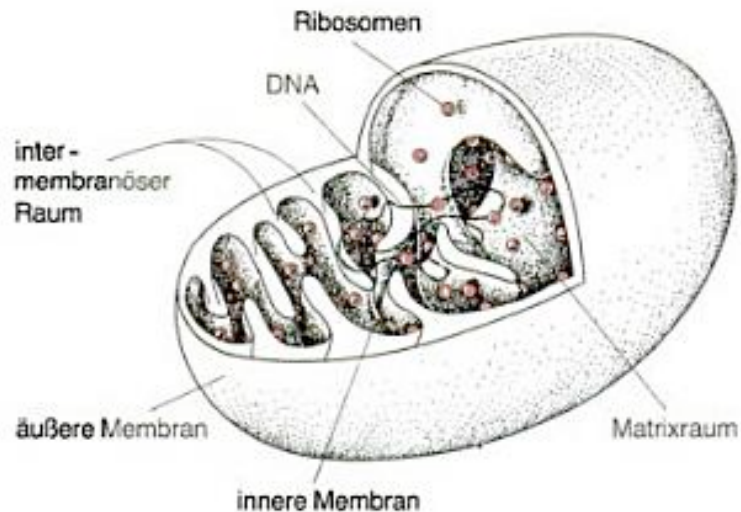


Abbildung 16: Struktur eines Mitochondriums

Quelle: Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler: 74 Tabellen, Monica Hirsch-Kauffmann, Manfred Schweiger²³

Aufgebaut ist die ATP-Synthase aus einem F_0 -Anteil, welcher in der Mitochondrienmembran verankert ist, und einem F_1 -Anteil, der aus der Membran nach innen ins Lumen ragt. Beide sind über einen Stiel miteinander verbunden. Aufgrund des Aufbaus wird die Synthase auch als F_0F_1 -Synthase bezeichnet²⁰⁴ (Weber J, 1997).

Der F_1 -Teil besteht aus fünf Untereinheiten, α , β , γ , δ , und ϵ , die eine Stöchiometrie von 3:3:1:1:1 aufweisen⁷¹ (Futai M, 2000). Das Kernstück setzt sich aus einem Ring, der aus sechs Untereinheiten besteht, zusammen. Diese repräsentieren alternierend α - und β -Untereinheiten, die mittig die helikalen Segmente der γ -Untereinheit umschließen, die wiederum mit F_0 verbunden sind²⁸ (Boyer PD, 2002). Synonym wird für diesen Teil auch die Bezeichnung $\alpha_3\beta_3\gamma$ Komplex verwendet. In der β -Untereinheit von F_1 finden sich zudem drei katalytische Zentren. Zeitliche Asymmetrien und Konformationsänderungen führen dazu, dass alle drei Seiten in einer einzelnen β -Untereinheit abwechselnd zum katalytischen Zentrum werden²⁹ (Boyer PD., 1997). Dies gilt nicht für die α -Untereinheiten, da diese keine katalytischen Eigenschaften besitzen⁴⁰ (Capaldi RA, 2002).

Der F_0 -Teil besteht aus einer α - und zwei β -Untereinheiten, die um eine γ -Untereinheit angeordnet sind. Die Stöchiometrie ist 1:2:12⁷¹ (Futai M, 2000). Der F_0 -Teil

2. Fragestellung

Die Transplantationsmedizin beschränkt sich bei der Auswahl der Spenderorgane lediglich auf die bereits erwähnten Kriterien, die zu einem Ein- oder Ausschluss eines Organs in den Spenderpool führen¹²⁶ (Melin C, 2013). Hierbei wird die Vitalität der Spenderorgane anhand der Ischämiezeit, der klinischen Expertise eines erfahrenen Transplantateurs³² (Brunt EM, 2013) und gegebenenfalls einer histologischen Untersuchung festgestellt¹⁵⁴ (Reddy KS, 2000). Erfahrungsgemäß sollte die kalte Ischämiezeit der Leber bei Transplantation unter zehn Stunden liegen¹⁰² (Krukemeyer MG, 2006).

Obwohl eine histologische Untersuchung durch einen Pathologen eine validierte Aussage zur Vitalität des Organs treffen kann, fehlt dieser Untersuchung eine hinreichende Sensivität und Spezifität. Die Ergebnisse sind untersucherabhängig, nicht immer reproduzierbar und teilweise in ihrer Aussage vage, da Sachverhalte häufig durch die histologische Präparation verschleiert oder verzerrt werden⁴⁸ (Cockfield SM, 2010), 84 (Hsu Y-HR, 2013), 113 (Loganathan S, 2010).

Eine Bestimmung des MELD-Scores nach erfolgter Transplantation kann auch eingesetzt werden, um eine postoperative Risikostratifizierung sowie eine Beurteilung der Organfunktion der Transplantatleber („early graft function“) zu ermöglichen¹⁹⁹ (Wagener G, 2013). Diese tritt in einem Zeitraum von neunzig Tagen nach Transplantation auf. Studien zeigen, dass insbesondere der MELD-Score am fünftem postoperativen Tag am aussagekräftigsten ist¹⁷⁶ (St. Peter SD, 2003).

Es wirft sich daher die Frage auf, ob eine Möglichkeit besteht, das Risiko für eine Transplantatdysfunktion beziehungsweise ein Transplantatversagen schon vor Beginn einer Transplantation zu überprüfen.

Einige Vorarbeiten zeigten, dass eine ATP-Produktion ein sensibler Wert für den I/R darstellt¹⁹⁰ (Theruvath TP, 2008). Ebenso zeigte sich in Untersuchungen, dass durch Hypoxie eine anaerobe Glykolyse eintritt¹⁷⁴ (Sprague LD, 2006), was ebenfalls zum Absinken der ATP-Produktion führt.

All diese Sachverhalte bildeten das Fundament für die Fragestellung dieser Arbeit und die darauf aufbauende experimentelle Versuchsreihen. Dabei sollte verstärkt ein Augenmerk auf folgende Unterpunkte gelegt werden:

- Kann unsere experimentelle Studie die inverse Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Ischämiezeit bestätigen?
- Korreliert die histologische Auswertung mit der Ischämiezeit?

-Eignet sich die ATP-Messung oder die histologische Auswertung zur Ermittlung eines Prognose-Scores? Welcher Wert ist dabei sensitiver?

Für die Versuchsreihe wurde speziell die Leber als Organ gewählt, da sie mitunter die höchste Stoffwechselleistung erzielt. Eine Messung der ATP-Produktion durch experimentelle Messungen wird dadurch erleichtert.

3. Material und Methoden

3.1 ATP-Messung

3.1.1 Versuchstiere / Spenderlebern

Für die Bestimmung des ATP-Gehalts wurden Lebern von männlichen syngenesischen Lewis-CD-Ratten (Charles River, Sulzburg, Deutschland) verwendet. Diese Tiere stammen aus Inzuchtsstamm mit den gleichen Gewebemerkmale. Zum Versuchszeitpunkt lag ein Gewicht von 220-240 Gramm bei den Tieren vor, was einem Alter von 5-6 Wochen entsprach.

3.1.2 Leberentnahme

Die Explantation der Lebern wurde am Klinikum rechts der Isar (München, Deutschland) im speziell dafür vorgesehenen Tieroperationssaal durchgeführt, um optimalen hygienischen Bedingungen gewährleisten zu können.

Der operative Eingriff wurde durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran 5% und unter Zuhilfenahme von Buprenophen in einer Narkosekammer durchgeführt. Erst nachdem die Stellreflexe der Tiere erloschen waren, wurde mit der Operation begonnen. Zu Beginn wurde durch eine mediane Laparotomie von der Symphyse bis zum Xiphoid der Bauchraum der Ratten eröffnet und mittels vier Halterhaken expositioniert. Anschließend wurde das Lig. falciforme vorsichtig durchtrennt, um Sicht auf die V. cava zu gewinnen. Danach folgte eine Herauslösung der Leber unter Durchtrennung der V. portae, V. cavae und Herauslösung der Tr. coeliacus. Die Schritte werden nachfolgend unter 3.2.4 wiedergegeben.

3.1.3 Versuchsgruppen

Die Einteilung der Versuchsgruppen erfolgte anhand unterschiedlicher Ischämiezeiten. Dabei wurden die entnommenen Organe vom Klinikum rechts der Isar nach Garching in das Zentralinstitut für Medizintechnik der Technischen Universität München (IMETUM) transportiert, um dort die ATP-Messungen durchzuführen. Eine Ischämiezeit galt als beendet, nachdem am IMETUM „Mammalian Cell Lysis Solution“ aus einem ATP-Kit zugegeben wurde. Damit konnten die Ischämiezeiten exakt definiert werden.

Gemessen wurde nach folgenden Ischämiezeiten: 2h, 2,25h, 2,5h, 3h, 3,5h, 4h, 4,5h, 5h, 5,5h, 6h, 7h, 8h, 9h, 10h. Die Versuchsreihen wurden anschließend mit n=4 durchgeführt.

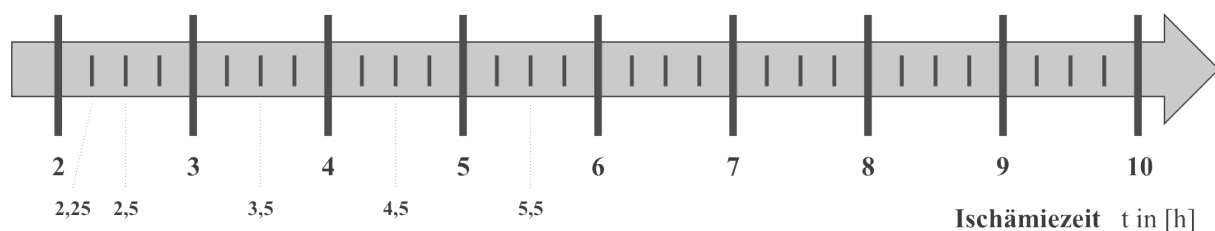


Abbildung 18: schematische Darstellung der Messpunkte

3.1.4 Organkonservierung

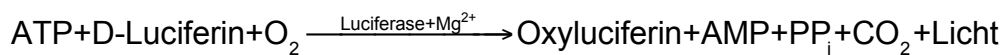
Für die Organkonservierung auf dem Transportweg wurden die Lebern nach Explantation in einer selbst hergestellten Nährlösung aufbewahrt. Die Lösung setzte sich folgenden Bestandteilen zusammen:

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM base, Nährmedium mit dem Hauptbestandteil Glucose) + 0,35 g/l NaHCO_3 + 2mM L-Glutamin + 5% FCS + 20mM HEPES + 25 mM Glucose.

Es wurde ein Ziel pH-Wert von 7,25 bei Erstellen der Lösung angestrebt.

3.1.5 ATP-KIT

Es wurde zur Bestimmung der ATP-Konzentration das „*ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System*“ (ATP-Kit ATPlite, Perkin Elmer, Vertrieb Deutschland, Rotgau, Deutschland) verwendet. Die Wirkungsweise des ATP-Kit basiert auf einer Lichtemission durch die Reaktion von ATP mit dem hinzugefügten Enzym Luciferase (Glühwürmchengattung *Photinus pyralis*) und D-Luciferin. Die Reaktion wird dabei durch Luciferase und Mg^{2+} katalysiert⁸ (Perkin Elmer).



Die Lichtemission ist dabei dem ATP-Gehalt proportional und wurde zur Messung verwendet.

3.1.6 ATP-Bestimmung

Vor Versuchsbeginn wurden die Lebern zunächst mithilfe eines Skalpells zerkleinert. Anschließend erfolgte eine Überführung in separate Eppendorfgefäße. Es wurde zudem eine Gewichtsbestimmung vorgenommen, um Störgrößen wie unterschiedliche Masse und Gewicht in der späteren Auswertung zu vermeiden.

Danach wurde 1ml phosphatgepufferte Säure (PBS, englisch Phosphate Buffer Solution, Hydrogenphosphat und Dihydrogenphosphat in 0,9%-iger Kochsalzlösung, physiologischer Puffer) in jedes Eppendorfgefäß gegeben, um eine Reinigung der Proben vorzunehmen. Es erfolgte daraufhin eine Abpipettierung.

Eine Bestimmung der ATP-Konzentration wurde mithilfe des ATP-Kits „ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System“ ermöglicht.

Durch Zugabe der vorgefertigten „Mammalian Cell Lysis Solution“ des ATP-Kits wurde der Endpunkt einer Ischämie festgelegt. So wurde nach Ablauf einer gewissen Zeitspanne 400µl „Mammalian Cell Lysis Solution“ in die Eppendorfgefäße gegeben. „Mammalian Cell Lysis Solution“ inaktiviert endogene ATPasen, die die Auswertung durch pH-Wert Erhöhung stören könnten und markiert gleichzeitig den Ischämieendzeitpunkt.

Nach erfolgter Zugabe der Lösung, erfolgte eine Zerkleinerung der Proben mithilfe eines Ultraschallstabes. Es entstanden homogene Lösungen, die bei Raumtemperatur weiter verarbeitet werden konnten. Nach Zentrifugation der Proben bei 2500 Umdrehungen pro Minute (engl. rpm), konnten je 50µl der Lösungen aus den einzelnen Eppendorfgefäßen auf eine schwarze 96er well Platte nach Plattenbelegung übertragen werden. Dabei war bereits in jedem well 100µl PBS vorgegeben. Es erfolgte ein erneutes Rütteln unter anschließender Zugabe von 50µl einer neu angesetzten Substratlösung nach Anleitung des ATP-Kits. Diese Substratlösung setzte sich aus 5ml „Substrate buffer Lösung“ zusammen, welche in das „lyophilized substrate Solution“-Fläschchen gegeben wurde. Durch das Hinzugeben der „lyophilized substrate Solution“ entstand ein niedriger pH-Wert, wodurch die zuvor beschriebene Reaktion stattfinden konnte.

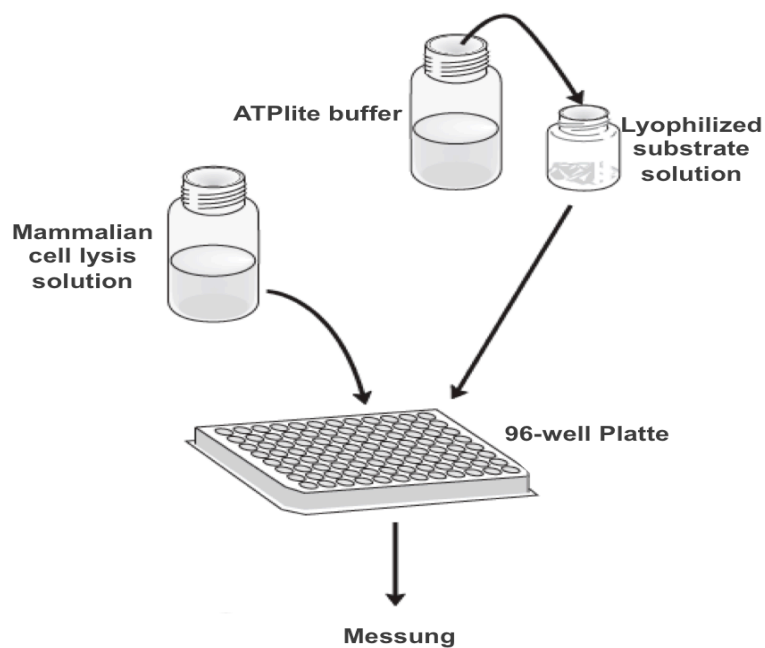


Abbildung 19: Vorgehensweise nach Anleitung des ATP-Kit lite

Quelle: <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/6016947>⁸

Nach zehnminütigem Ruhen bei Raumtemperatur erfolgte die Auswertung mithilfe des Computerprogrammes *Victor3* (ATPlite, Perkin Elmer, Vertrieb Deutschland, Rotgau, Deutschland), was zur Erfassung der Lichtemission diente.

Zeitgleich wurde eine ATP-Referenzkurve angelegt, um die einzelnen Probenmesswerte miteinander vergleichen zu können.

Als erster Schritt wurde hierbei eine „10 mM stock solution“ hergestellt: Die aus dem ATP-Kit entnommene „lyophilized ATP standard [11,6 μMol]“-Lösung wurde mit 1160 μl H_2O vermengt.

Dadurch konnte eine Verdünnungsreihe mit neun Verdünnungsschritten hergestellt werden. Die Stammlösung entsprach dabei einer Konzentration von [10 mM]. Schrittweise fand so eine Verdünnung von [10^{-5} M] zunächst auf eine Konzentration von [10^{-9} M] statt.

Auf eine zweite well-Platte wurde auf die ersten zwanzig wells 50 μl „Mammalian Lysis“-Lösung aufgetragen und anschließend bei 700rpm für fünf Minuten gerüttelt. Danach wurden 10 μl der vorbereiteten Verdünnungsschritte auf die einzelnen wells übertragen. Dabei war in jedem well erneut 100 μl PBS vorgelegt.

Es erfolgte anschließend die Zugabe von 50 μl lysierte Probenlösung und eine erneute Rüttelung. Zuletzt wurden 50 μl Substratlösung (Zusammensetzung aus „Substrate buffer“-Lösung und „lyophilized substrate solution“) in jedes einzelne Well hinzugefügt und erneut gerüttelt. Nach einer Ruhephase von zehn Minuten in Dunkelheit, um ungewollte Lichteinstrahlung zu vermeiden, wurde die Lichtemission mit Victor3 gemessen und ausgewertet.

3.1.7 Proteinbestimmung

Um einen Vergleich zwischen den einzelnen ATP-Werten zu ermöglichen, wurde nach jeder ATP-Messung eine Bestimmung der Proteinkonzentration an derselben Probe durchgeführt. So ließ sich ein ATP/Protein-Quotient ermitteln, welcher im weiteren Versuchsablauf als Analog zum ATP-Gehalt gelten sollte, da Störgrößen wie Masse und Gewicht der Proben nicht in die Auswertung miteinfließen.

Die Proteinbestimmung erfolgte dabei mittels BRADFORD-Tests. Dieser Test nützt den Farbstoff Commassie-Brilliant-Blau, der an Seitenketten von Proteinen bindet und dadurch sein Absorptionsspektrum von 470nm in der ungebundenen kationischen Form auf 590nm in der gebundenen anionischen Form ändert.

Demnach ist die Absorptionsänderung des Lichtspektrums proportional zur vorliegenden Proteinkonzentration in der untersuchten Probe. Dabei wurde eine Eichgerade erstellt, welche auf einer Verdünnungsreihe des Proteins Bovines Serumalbumin (BSA) basierte.

In der nachfolgenden *Tabelle 9* werden die einzelnen Konzentrationen von PBS und BSA pro Eppendorfgefäß veranschaulicht.

Tabelle 9: Eichkurve des BRADFORD-TEST

Eppendorfgefäß	PBS [μ l]	BSA [μ l]
1	200	0
2	195	5
3	190	10
4	180	20
5	160	40
6	140	60
7	100	100
8	80	120

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 5 μ l der lysierten Proben aus der ATP-Messung am Vortrag mit jeweils 95 μ l PBS verdünnt.

Nach dem Mischen der Proben durch einen Vortexmischers, erfolgte eine Übertragung derer auf eine 96er well-Platte. Hierbei wurden je 5 μ l der Eichkurven-Präparate und je 5 μ l der neuen Proben zusammengegeben. In jedes well wurde zudem 50 μ l 0,1 M NaOH/EDTA (pH-Wert 12,9) pipettiert und zum Abschluss 250 μ l industriell hergestellte BRADFORD-Lösung hinzugegeben. Nach einer Ruhephase von zehn Minuten in Dunkelheit zur Inaktivierung der Fluoreszenz, erfolgte die Messung und Auswertung des Absorptionsspektrum mithilfe der Computersoftware *Magellan 3.0*¹¹⁴.

3.2 Orthotope Lebertransplantation im Rattenmodell

3.2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden syngene männliche Ratten der Inzuchtlinie LEWIS verwendet (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Durch die Syngenie waren die Gewerbsmerkmale der Tiere identisch, wodurch die Möglichkeit einer immunologischen Abstoßung auf ein Minimum reduziert wurde. Die Tiere wogen zwischen 220g und 250g und entsprachen einem Alter von 61-65 Tagen. Es wurde darauf geachtet, dass die Empfängertiere rund 20g schwerer waren als die Spendertiere, um die Transplantation versierter durchführen zu können.

Die Haltung der Tiere fand in Käfigen auf Einstreu bei einer Raumtemperatur von 19-24 °C statt. Um den natürlichen Tag-/Nachtrhythmus zu gewährleisten, wurden sie einem zwölfstündigem Beleuchtungsintervall im Rattenraum des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung (TU München, Klinikum rechts der Isar) ausgesetzt.

3.2.2 Genehmigung der Versuche

Die Tierversuche wurden durch den Regierungsbezirk Oberbayern (München, Deutschland) unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.3-18-055 genehmigt.

Alle Versuche wurden nach geltenden Richtlinien der good clinical practice (GCP) durchgeführt.

3.2.3 Versuchsgruppen

Eine Einteilung erfolgte in drei Gruppen. Anhand den Ergebnissen der ATP-Messung konnten definierte Ischämiezeiten ermittelt werden, bei denen ein deutlicher Abfall des ATP-Wertes zu verzeichnen war. Dies war nach dreieinhalb und fünfeinhalb Stunden der Fall. Aufgrund dessen fiel die Entscheidung zur Einteilung der Versuchstiere in Gruppen mit zweistündiger, vierstündiger und achtstündiger Ischämiezeit.

3. Material und Methoden

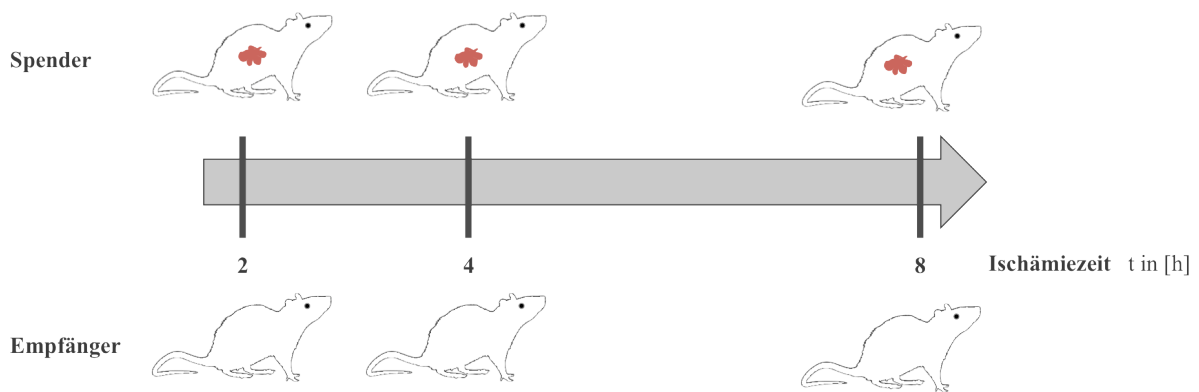


Abbildung 20: Schematische Darstellung der operativen Versuchsdurchführung

Jede dieser Gruppen beinhaltete insgesamt vier Tiere ($n=4$). Die Auswertung beschränkte sich auf diejenigen Tiere, bei denen die anhepatische Phase unter zwanzig Minuten lag, so dass der Blutverlust auf 1ml minimiert werden konnte. Ein größerer Blutverlust hätte dann nicht nur für einen I/R gesorgt, sondern gleichzeitig die Hämodynamik beeinflusst und wäre demnach in die Messungen miteingeflossen. Zudem überschritt die Operationsdauer nicht einen Zeitraum von eineinhalb Stunden. Ein postoperatives Überleben war für die Fragestellung nicht vorgesehen, weswegen nach erfolgreicher Transplantation die Tiere mithilfe von Isofluran und Buprenorphin euthanasiert wurden.

3.2.4 Chirurgisches Vorgehen

Operationsvorbereitung und Anästhesie:

Präoperativ erfolgte eine orientierende Untersuchung der Tiere, um gegebenenfalls vorliegende Erkrankung, insbesondere Atemwegserkrankungen festzustellen¹²² (Matevosjan E, 2010). Tiere mit bekannten Pneumonien wurden zum Beispiel von der Versuchsreihe ausgeschlossen. Vor der Operation wurden die Tiere keiner Nahrungskarenz ausgesetzt. Als Inhalationsanästhetikum wurde während des gesamten operativen Eingriffs Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) eingesetzt. Prinzipiell eignet es sich zur raschen Narkose Ein- und Ausleitung⁹⁷ (Kern H, 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Bei Wirkungseintritt verloren die Tiere das Bewusstsein, den Muskeltonus sowie die Stellreflexe¹²² (Matevosjan E, 2010). Die Konzentration des Isoflurans war über einen speziell kalibrierten Dampfer reguliert, welcher zur einfachen Regulation der Narkosetiefe diente. Zur Narkoseeinleitung wurden die Tiere in eine

Narkosekammer aus Glas transferiert¹²² (Matevosjan E, 2010). Dann folgte die Einleitung von Isofluran 5% bei einem Sauerstoffflow von 600ml/min. Sobald die Stellreflexe der Tiere erloschen waren, erfolgte die Reduzierung des Sauerstoffflows auf 400ml/min und das Isofluran wurde auf 3% reduziert. Die Tiere wurden auf den OP-Tisch transferiert und die Narkose mithilfe eines offenen Systems fortgeführt. Die Nase der Ratten wurde dabei in ein offen darliegendes Ende einer Perfusorspritze eingebracht¹²² (Matevosjan E, 2010). Die Narkose wurde mit 3% Isofluran bei einem Sauerstoffflow von 300-400ml/min fortgeführt. Für die Analgesie wurde den Tieren Buprenorphin (*Temgesic*®) intravenös mit einer Dosierung von 0,01-0,02mg/kg Körpergewicht bereits bei Einleitung der Narkose verabreicht¹²²(Matevosjan E, 2010).

Operationstechnik

Eine orthotope Rattenlebertransplantationen (RLTx) erfolgte unter Zuhilfenahme von mikrochirurgischer Nahttechnik bei allen Operationen in allen Gruppen. Die Technik fand in Anlehnung an das Modell von *Kamada et al.*⁹³ (Kamada N, 1979) und eigenen Vorarbeiten statt¹²² (Matevosjan E, 2010), ¹²³ (Matevosjan E, 2009).

Chirurgisches Vorgehen zur Gewinnung der Spenderleber

Nach Rasur und Desinfektion des Bauches der Ratte, konnte mit der Operation begonnen werden. Über eine mediane Laparatomie von der Symphyse bis zum Xiphoid wurde der Bauchraum eröffnet. Um den Blick auf den Situs konstant zu sichern, wurden Halterhaken angebracht. Zwei für den Oberbauchsitus und zwei für den Unterbauchsitus. Das Xiphoid wurde mittels einer Fixationsnaht kranial eingespannt.

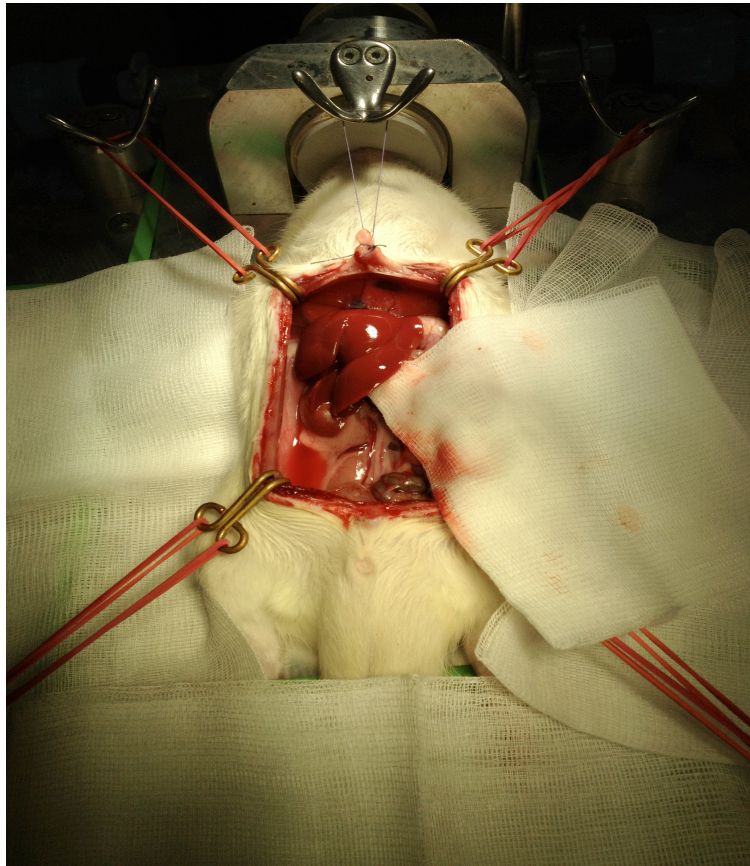


Abbildung 21: Blick auf den Rattensitus

Anschließend wurde die V. phrenica ligiert, um eine Lösung des Lig. falciforme sowie der hepatophrenischen und hepatogastrischen Bänder durchzuführen¹²² (Matevosjan E, 2010). Es erfolgte eine Koagulation und Absetzung des Gefäßbündels zwischen der Leber und dem unteren Ösophagus. Der Lobus medianus der Leber wurde von einer in Kochsalz getränkten Kompresse umfasst und aus dem Situs ausgelagert¹²² (Matevosjan E, 2010), um das Lig. hepatoduodenale unter freier Sicht präparieren zu können. Ebenso wurde der Darm durch eine feuchte Kompresse umfasst und ex-situ nach lateral links positioniert.

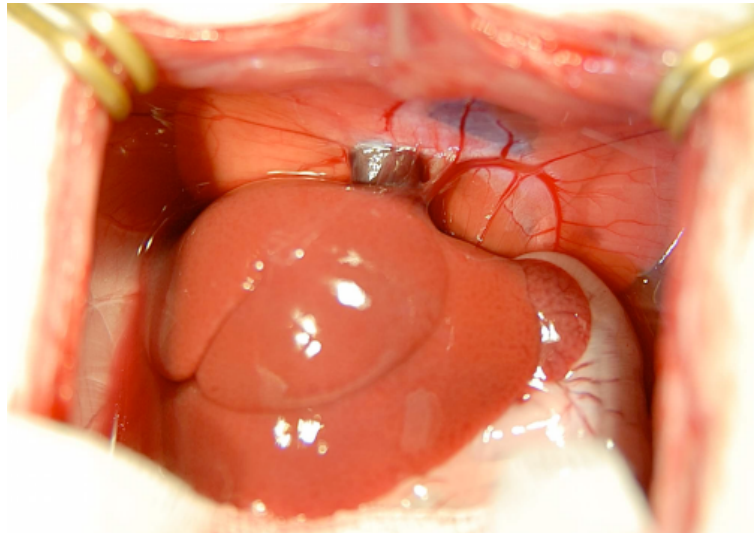


Abbildung 22: V. phrenica und Lebersitus intraoperativ

Quelle: The influence of retrograde reperfusion on the ischaemia-/reperfusion injury after liver transplantation in the rat, Kern H et al.⁹⁷

Nach Ligation der V. gastroduodenalis, wurde die V. portae zwischen der Einmündung der V. lienalis und der Leberpforte stumpf vom Bindegewebe gelöst. Die A. gastroduodenalis wurde ligiert und durchtrennt, ebenso der Ductus choledochus. Dieser wurde leberfern ligiert und durchtrennt. In den Ductus choledochus wurde ein an den Enden angeschrägter Gallengangscuff (/-splint) von 8mm Länge (22 G, Vasculon[®] Plus)⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010) in den Gang eingeführt. Eine Fixation erfolgte mit einer monofilen Ligatur (7/0 Ethilon schwarz monofil, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland). Zu beachten war, dass der Splint nicht zu weit in die Leber vorgeschoben wurde, da sonst ein kontinuierlicher Abfluss der Galle nicht mehr gewährleistet war⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010).



Abbildung 23: Leberhilus intraoperativ

Quelle: The influence of retrograde reperfusion on the ischaemia-/reperfusion injury after liver transplantation in the rat, Kern H et al.⁹⁷

Des Weiteren erfolgte eine Ligatur der infrahepatischen V. cava, kranial der rechten V. renalis, sowie ein Absetzen cavanah der V. suprarenalis und der Lumbalvenen. Durch eine stumpfe Präparation im Retroperitonealraum wurde die Aorta abdominalis dargestellt und alle rechtsseitig und linksseitig abgehenden Arterien, unter Erhaltung der A. renalis, ligiert und abgesetzt. Ebenso wurde Truncus aufgesucht und die abgehenden Arterien, A. gastrica sinistra und die A. lienalis, abgesetzt. Die arterielle Versorgung der Leber, vertreten durch die A. hepatica communis, wurde zunächst belassen. Im Anschluss fand eine Absetzung der Nierenarterien statt, was eine vollständige Isolierung des abdominalen Aortensegments zur Folge hatte. Zur Unterbrechung des Blutflusses in der Aortenbifurkation wurde ein Mikrogefäßclip verwendet. Dieser Schritt stellte den Beginn der Perfusionsphase dar⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Die Aorta abdominalis wurde punktiert und ein Perfusionskatheter (14 G, Venflon®)⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010) eingeführt. Anschließend fand eine Perfusion mit CUSTODIOL® (circa 50ml, auf 4 °C gekühlt) statt, wodurch das Blut aus der Leber gewaschen wurde. Als weitere Vorgehensweise wurde die suprahepatische V. cava inzidiert, um den durch die Perfusion entstandenen Überdruck entgegen zu wirken⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Gleichzeitig wurde dadurch ein Blut- und Perfusatabfluss ermöglicht. Unmittelbar in Zwerchfellnähe wurde die suprahepatische V. cava inferior während der Perfusion abgesetzt.

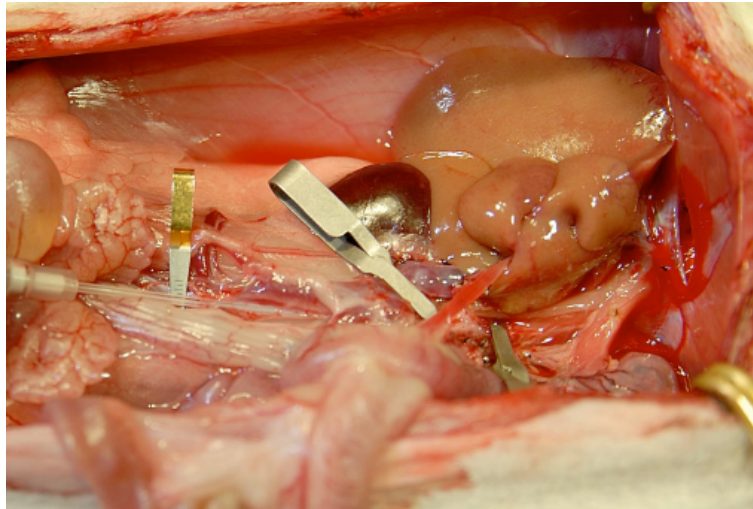


Abbildung 24: Perfusion der Spenderleber über die Aorta

Quelle: The influence of retrograde reperfusion on the ischaemia-/reperfusion injury after liver transplantation in the rat, Kern H et al.⁹⁷

Im Verlauf erfolgte eine Durchtrennung und Absetzung der linken V. phrenica, der infrahepatische V. cava inferior proximal des Einmündungsbereiches, der rechten V. renalis und der rechten V. suprarenalis. Somit fand keine simultane portale Perfusion mehr statt⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Es schloss sich ein vollständiges Absetzen der A. hepatica communis an. Nach Ligation des Truncus und Durchtrennung der umgebenden Bandstrukturen konnte die Leber an dem infrahepatischen V. cava Gefäßclip aus dem Situs explantiert werden. Das Organ wurde in CUSTODIOL®-Lösung (4 °C) gelegt und erst nach Ablauf der zu untersuchenden Ischämiezeiten entnommen.

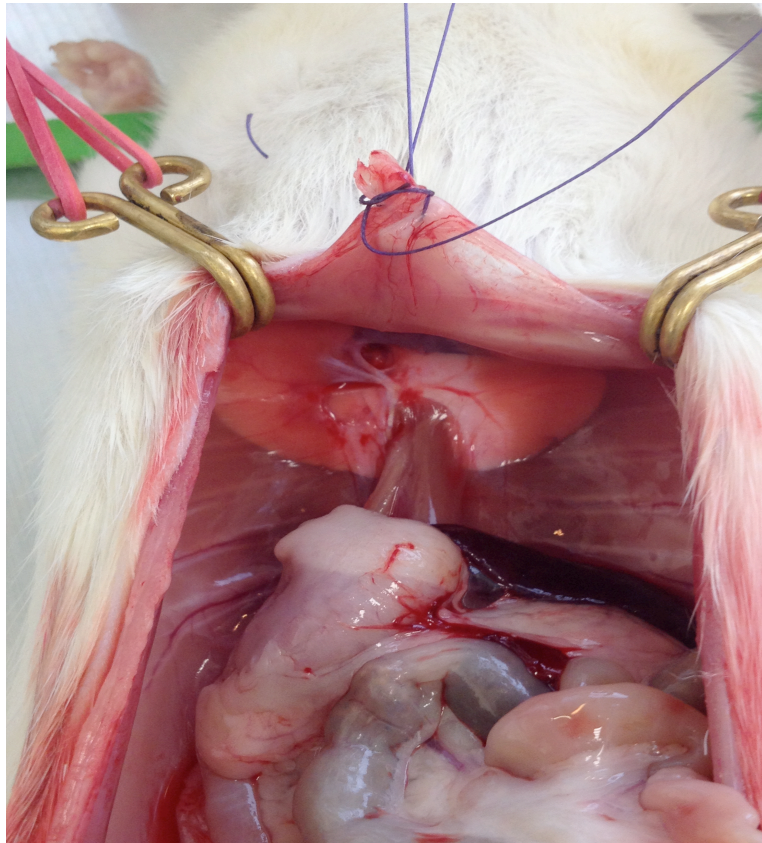


Abbildung 25: Blick auf den Rattensitus nach Hepatektomie

Chirurgisches Vorgehen zur Entfernung des Empfängerleber

Wie schon beim Spendertier erfolgten die gleichen Präparationsschritte wie beim Spender. Dies schloss eine Rasur und Desinfektion der Bauchhaut, eine mediane Laparotomie sowie die Fixation durch Halterhaken und einer Fixationsnaht am Xiphoid ein.

Die Leber des Empfängertieres wurde annähernd analog der Leber des Spendertiers entnommen, dennoch mit gewissen Abwandlungen. So wurde die Ligation der linken V. phrenica und der rechten V. suprarenalis leberfern gesetzt. Eine Isolation der Pfortader fand von der Einmündung der V. lienalis bis zur Aufzweigung in die beiden portalen Hauptstammäste statt. Weiterhin wurden die A. hepatica propria und der Ductus choledochus lebernah ligiert und durchtrennt. Nach Abklemmung der infrahepatischen V. cava inferior an der Einmündung der rechten V. lienalis und nach Abklemmung der Pfortader an der Einmündung der V. lienalis durch Mikrogefäßclips, wurde eine an der zwerchfellnahen suprahepatischen V. cava sitzende Satinsky-Klemme eingesetzt⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Die kritische anhepatische Phase

setzte mit Verschluss der V. portae durch einen Mikrogefäßclip ein⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Während den Versuchen wurde nie ein Zeitraum von mehr als zwanzig Minuten überschritten. Um die Leber entnehmen zu können wurde jetzt noch die linke V. phrenica sowie die suprahepatische V. cava inferior am Leber-Gefäß-Übergang abgesetzt. Die Pfortader und die infrahepatische V. cava inferior wurden lebernah durchtrennt. Die rechte V. suprarenalis wurde noch koaguliert und im Anschluss daran die Leber entnommen. Das Leberbett wurde anschließend mit einer feuchten Mullkomresse bedeckt und die zu transplantierende Leber des Spendetieres wurde aus der CUSTODIOL®-Lösung entnommen und orthotop in den Situs des Empfängertieres eingesetzt.

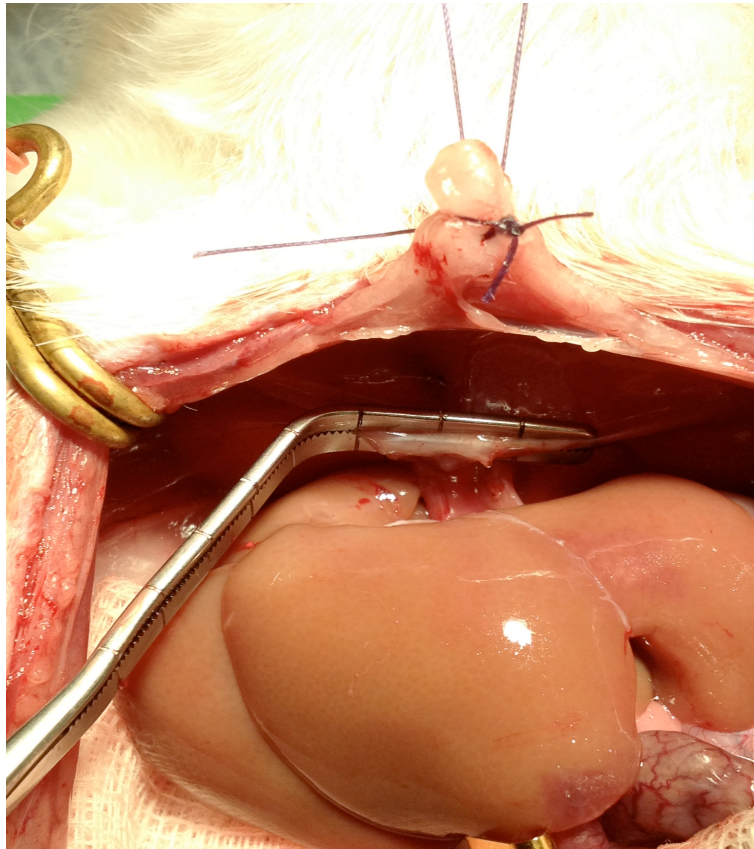


Abbildung 26: Spenderleber in situ des Empfängers

Orthotope Lebertransplantation

Um die suprahepatischen V. cavae inferiores der Spenderleber und des Empfängertieres besser anastomosieren zu können, wurden zwei Eckfäden (9/0

Ethilon) angebracht und querverlaufend verknotet⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Dadurch entstand ein Kreisbogen der Hinterwand, was die fortlaufende Naht der suprahepatischen V. cava von innen erleichterte. Vor kompletter Anastomosierung wurde das Gefäßlumen mit isotoner Kochsalzlösung durchgespült, um eine Bildung von Luftblasen zu verhindern, was mit der Gefahr eine Luftembolie einherging.

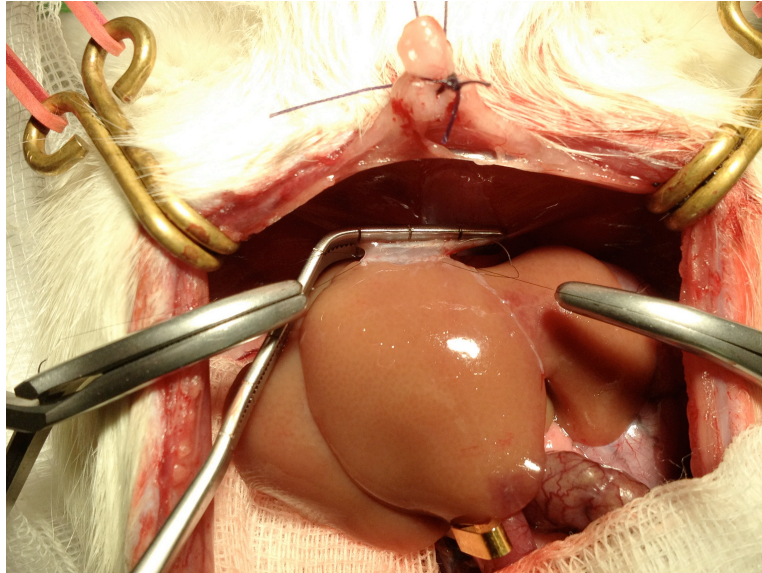


Abbildung 27: Fortlaufende Naht zur Anastomosierung

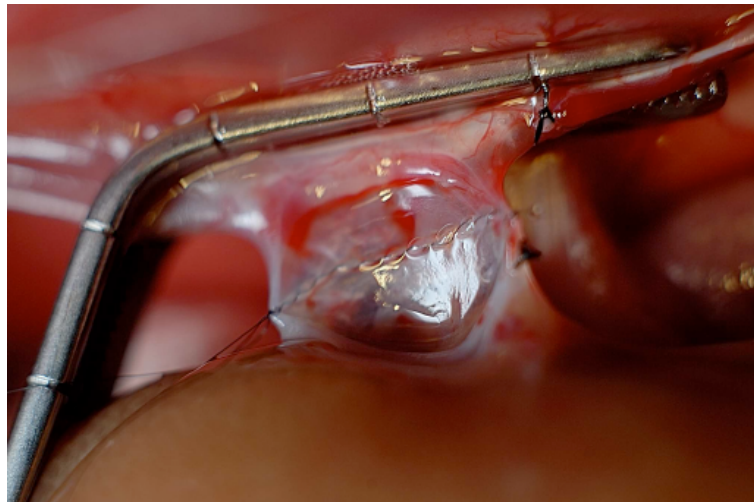


Abbildung 28: Anastomose der suprahepatischen V. cava inferior durch Naht der Rückwand

Quelle: The influence of retrograde reperfusion on the ischaemia-/reperfusion injury after liver transplantation in the rat, Kern H et al.⁹⁷

Die zuvor eingelegte Mullkomresse wurde aus dem Situs entfernt und zur besseren Übersicht wurden der Lobus medianus und der Lobus lateralis sinister nach kranial geklappt. Zur besseren Darstellung der Leberpforte wurde die Pfortader der Spenderleber und die Pfortader des Empfängertieres wurden in fortlaufender Naht (9-0 Ethilon) genäht. Die Satinsky-Klemme an der suprahepatischen V. cava wurde geöffnet, um eine Perfusion des Organs zu ermöglichen. Dadurch wurde ebenfalls die Blutstauung in den Bauchorganen beseitigt und die anhepatische Phase beendet⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Die infrahepatische V. cava wurde ebenfalls mit einer fortlaufenden Naht anastomosiert.

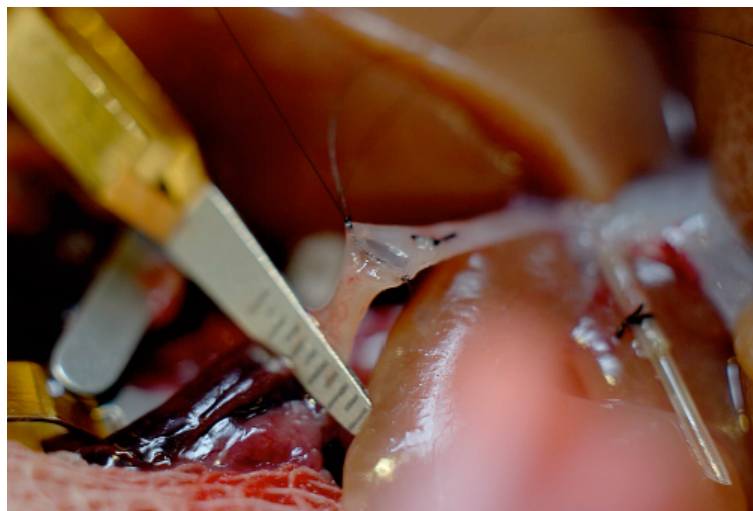


Abbildung 29: Anastomosierung der V. portae

Quelle: The influence of retrograde reperfusion on the ischaemia-/reperfusion injury after liver transplantation in the rat, Kern H et al.⁹⁷

Rekonstruktion des Gallengangs:

Auf eine weitere Rekonstruktion des Gallengangs wurde in Anbetracht der Fragestellung und zur visuellen Evaluation der primären Transplantatfunktion (vertreten durch Gallenfluß) bewusst verzichtet. Es wurde eine Spülung des Bauchraumes mit Ringer-Lösung vorgenommen. Nach fünfzehn Minuten fand eine Blutprobe aus der infrahepatischen V. cava statt, nachdem angenommen wurde, dass sich ein funktionierender Kreislauf eingestellt hatte⁹⁷ (Kern H., 2008), 122 (Matevosjan E, 2010). Danach erfolgte die Euthanasie der Tiere, da die unmittelbaren Ischämieauswirkungen histopathologisch festgestellt werden sollte.

Die Leber wurde nach erfolgter Euthanasie den Tieren entnommen und nach folgendem Schema der Pathologie verblindet, in Formaldehyd fixiert, übergeben:

I.1= rechter Leberlappen

I.2= linker Leberlappen

I.3= Lobus caudatus

I.4= Restgewebe

3.2.5 Postoperative Probengewinnung

Die Blutwerte wurden nach erfolgreicher Lebertransplantation mit einem zeitlichen Abstand von fünf Minuten abgenommen. So wurden Blutproben nach Lebertransplantation gewonnen, deren Lebern unterschiedlich lange Ischämiezeiten ausgesetzt waren. Anschließend erfolgte eine maschinelle Messung der Blutproben durch das IDEXX VetLab Station (Laboratory Information Management System, Vet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Deutschland).

Es wurden die Transaminasen Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) gemessen, die als Indikator für eine Leberschädigung angesehen werden konnten. Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) wurde gemessen, um die globale Gewebs-/ Organschädigung anzuzeigen. In die Untersuchung wurde auch die Blutglukosekonzentration mit eingeschlossen, um einen Parameter für die im Körper befindliche Energie zu definieren. Mit der Harnstoff-Stickstoff-Messung wurde das Ziel verfolgt, einen Parameter für die Nierendurchblutung zu erhalten sowie Hinweise auf katabole Stoffwechselsituationen erlangen zu können.

3.3 Histologische Auswertung

Die histologische Aufarbeitung der Schnitte erfolgte am Pathologischen Institut der Technischen Universität München. Die Beaufsichtigung erfolgte durch Dr. med. Gregor Babaryka.

Die Lebern wurden postoperativ entnommen und anhand der makroskopischen Lappengrenzen erfolgte eine verschlüsselte Unterteilung.

So stellten die Buchstaben „A-D“ die Ziffer des untersuchten Tieres nach einer Operation dar. Eine Systematisierung erfolgte durch die einzelnen Leberlappen.

Mit „A.1“ wurde der rechte und mit „A.2“ der linke Leberlappen, mit „A.3“ der Lobus caudatus und mit „A.4“ das restliche Lebergewebe verschlüsselt.

Eingebettet in Formaldehyd wurden die Proben am Pathologischen Institut zu histologischen Schnitten aufgearbeitet und diese untersucht. Angefärbt wurden diese mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung und einer Elastica-van-Gieson-Färbung.

In die Auswertung wurde auf folgende histologische Charakteristika geachtet: Hypoxische Vakuolisierung, sinusoidale Dilatation und Hyperämie, Zellödem, Zellnekrose und granuliertes Zytoplasma. Diese Parameter wurden in der Arbeit so ausgewählt, dass sie einen Indikator für einen I/R und somit einem Zelluntergang darstellten¹¹ (Bahnde R, 2008), 160 (Sanchez SC, 2014).

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter beratender Hilfestellung des Instituts für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München, vertreten durch Dr. rer. nat. Dipl.– Stat. Tibor Schuster. Für die statistischen Analysen wurde die *Software R*, Version 2.12.2¹⁵² verwendet.

Die Entwicklung des ATP/Protein-Quotienten sowie relevanter Blutparameter über die Ischämiezeit in Stunden wurde anhand von Streudiagrammen mit angepassten Glättungssplinefunktionen illustriert. Die statistische Unsicherheit des geschätzten funktionalen Zusammenhangs wurde mit Hilfe von 95%-Konfidenzintervallen veranschaulicht. Des Weiteren wurde ein lineares Regressionsmodell errechnet, um den Abfall des ATP/Protein-Gehalt in den ersten sieben Stunden der Ischämie statistisch zu evaluieren und eine entsprechende Signifikanzprüfung vorzunehmen. Dabei galt es die Nullhypothese „*kein Anstieg oder Abfall des ATP/Proteins innerhalb der ersten sieben Stunden der Ischämie*“ zu verwerfen. Darüber hinaus wurde geprüft, ob eine Assoziation der Histologie mit der zeitlichen Entwicklung der interessierenden Messgrößen vorliegt. Alle vorgenommenen statistischen Tests erfolgten zweiseitig zu einem Signifikanzniveau von 5%.

Die Histologie (Mittelwert über alle Leberlappeneinteilungen) im Vergleich mit dem ATP-Protein-Gehalt (Mittelwert der einzelnen ATP/Protein-Werte) über die Ischämiezeit wurde mit dem Korrelationskoeffizienten von Spearman quantifiziert.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der ATP/Protein-Untersuchung

Es konnte gezeigt werden, dass bei andauernder Ischämie, der ATP-Gehalt über die Zeit gemittelt sinkt, was in Tabelle 10 dargestellt wird.

Tabelle 10: Darstellung ATP/Protein-Werte anhand der Ischämiezeit sowie der 95% Konfidenzintervallen

Ischämiezeit [h]	Mittelwert ATP/Protein [µg/ml]	95% Konfidenzintervall; untere Grenze	95% Konfidenzintervall; obere Grenze
2	0,041	0,014	0,068
2,25	0,063	0,050	0,076
2,5	0,033	0,017	0,049
3	0,057	0,037	0,077
3,5	0,026	0,012	0,039
4	0,027	0,008	0,047
4,5	0,022	0,005	0,038
5	0,045	0,026	0,064
5,5	0,022	0,009	0,036
6	0,019	0,000	0,042
7	0,012	0,000	0,033
8	0,011	0,000	0,033

4. Ergebnisse

9	0,010	0,000	0,034
10	0,010	0,000	0,041

So konnte nach einer Ischämiezeit von zwei Stunden ein mittlerer ATP/Protein-Gehalt von 0,041 $\mu\text{g/ml}$ gemessen werden. Nach zweieinviertel Stunden stieg dieser auf 0,063 $\mu\text{g/ml}$ an. Es erfolgte ein erneuter Abfall nach zweieinhalb Stunden auf 0,033 $\mu\text{g/ml}$ und lag somit sogar noch unter den Ausgangswert. Eine halbe Stunde stieg der gemessene Wert wieder auf 0,057 $\mu\text{g/ml}$ an. Ab einer Ischämiezeit von dreieinhalb Stunden konnte ein kontinuierlicher Abfall des ATP/Protein-Gehalts verzeichnet werden. Die einzige Ausnahme bildete dabei der fünf Stunden Wert (0,045 $\mu\text{g/ml}$). Es erfolgte eine Reduktion von 0,026 $\mu\text{g/ml}$ bei dreieinhalb Stunden auf ein Plateau von 0,01 $\mu\text{g/ml}$, welches nach einer Ischämiezeit von sieben Stunden erstmalig zu verzeichnen war.

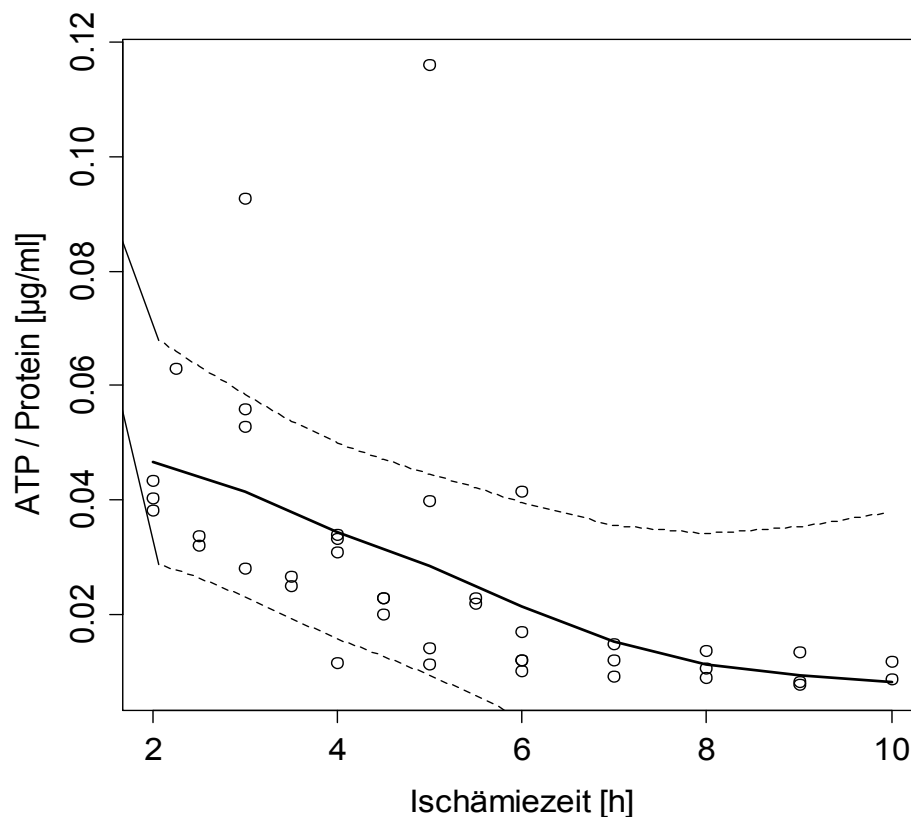


Abbildung 30: Darstellung der ATP/ Protein-Werte gegen die Ischämiezeit

Aus der *Abbildung 30* ist erkenntlich, dass im Mittel eine deutliche Abnahme der ATP/Protein-Werte während den ersten sieben Stunden der Ischämie zu verzeichnen ist. Die lineare Regressionsanalyse ergab einen statistisch signifikanten mittleren Abfall pro Stunde von $0,0067\mu\text{g/ml}$ (95% Konfidenzintervall: $[0,0019; 0,0115]$, $p=0,010$). Zusätzlich ist der funktionelle Zusammenhang (zeitliche Trend entsprechend der angepassten Glättungssplinefunktion) als durchgezogene Linie mit dem dazugehörigen Konfidenzbereich in der *Abbildung* wiedergegeben.

Es folgt darauf ein Plateau des ATP-Protein-Gehalts, welcher sich bei einem Wert von $0,01\mu\text{g/ml}$ stabilisiert.

4.2 Ergebnisse der histologischen Auswertung

Anhand der histologischen Auswertung manifestierten sich drei unterschiedliche Befunde, die sich deutlich voneinander abgrenzen ließen.

Aufgrund dieser Tatsache erfolgte die Einteilung in drei Grade, welche folgende Charakteristika aufwiesen:

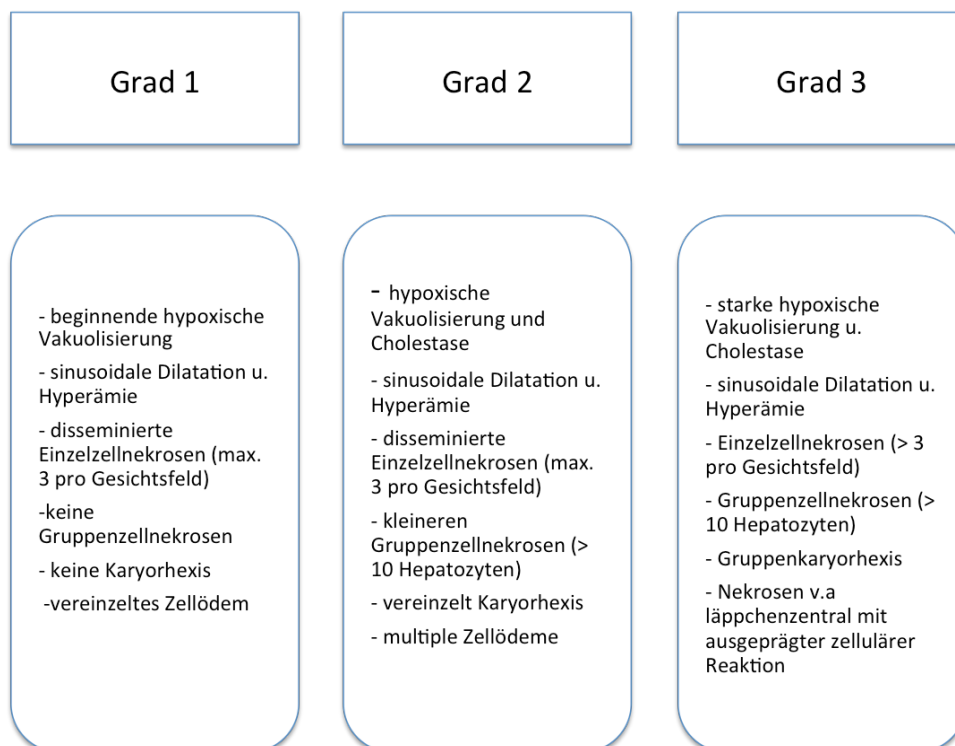


Abbildung 31: histologische Kriterien zur Gradeinteilung

4. Ergebnisse

Jede Ischämiezeit wurde mit n=4 Tieren gemessen. Dabei wurde jede neu untersuchte Leber in einer bestimmten Ischämiezeit noch einmal wie folgt systematisiert.

I.1= rechter Leberlappen

I.2= linker Leberlappen

I.3= Lobus caudatus

I.4= Restgewebe der Leber

Bei den Messungen wurden I.4 als Restgewebe nicht in die Auswertung miteinbezogen, da diese nicht charakteristischen Organbereichen zugeordnet werden konnte und demnach keine qualitativ hochwertige Aussage möglich war.

Zweistündige Ischämie

Aus *Abbildung 32* ist zu entnehmen, dass bei einer zweistündigen Ischämiezeit, eine Dominanz des histologischen Grad 1 vorherrscht. Bei Tier A zeigen der rechte Leberlappen, der linke Leberlappen sowie der Lobus caudatus einen histologischen Grad von 1 an. Ebenso bei den Tieren B und C. Alleinig bei Tier D fällt ein histologischer Grad 2 am linken Leberlappen auf.

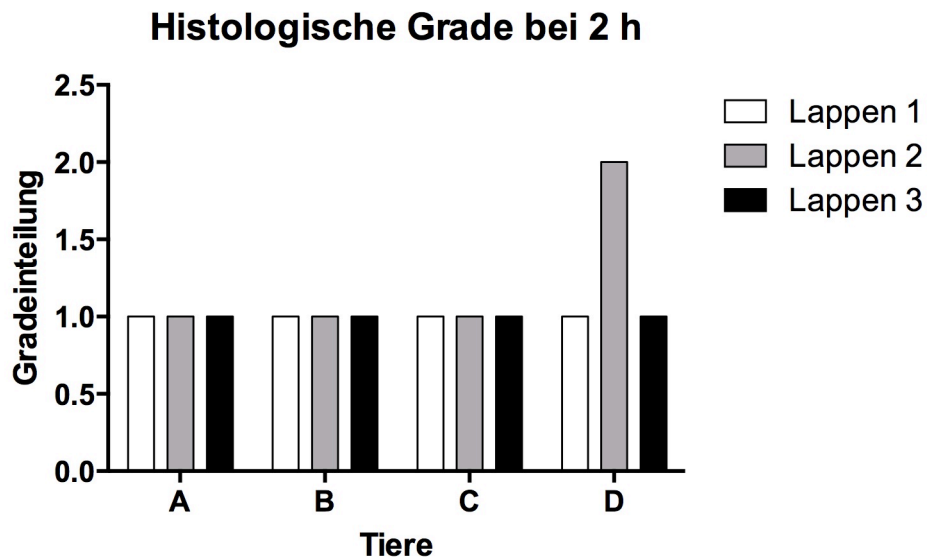


Abbildung 32: Gradeinteilung anhand der Ischämiezeit bei 2h

Vierstündige Ischämie

Nach vierstündiger Ischämiezeit zeigt sich in *Abbildung 33*, dass bereits Variationen innerhalb des Auftretens der histologischen Grade zu verzeichnen sind. Bei Tier A tritt nun am linken Leberlappen ein histologischer Grad 2 auf. Keine Änderung des histologischen Grades lässt sich bei Tier B feststellen. Auch Tier C zeigt eine weitere ischämische Schädigung mit einem histologischen Grad 2 des linken Leberlappens an. Bei Tier D wurden in allen Leberlappen Grade zwischen 2 und 3 gemessen.

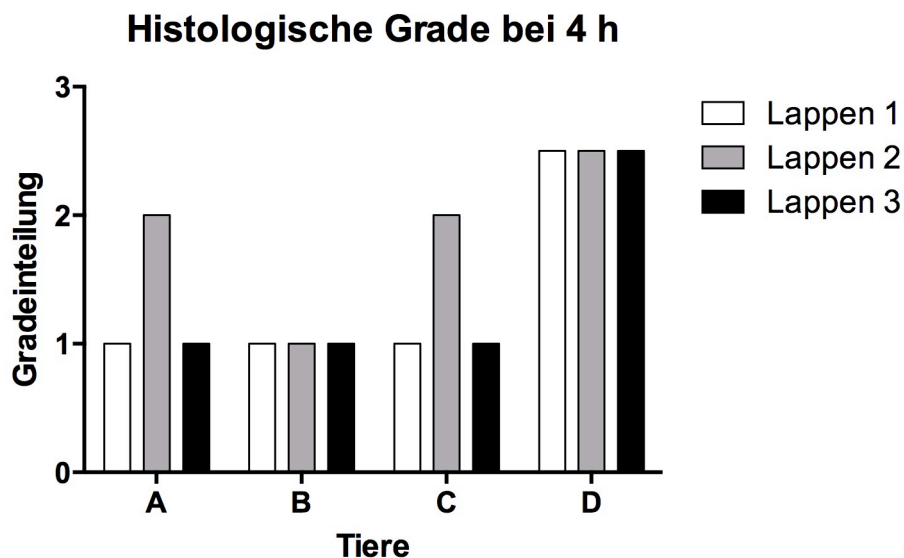


Abbildung 33: Gradeinteilung anhand der Ischämiezeit bei 4h

Achtstündige Ischämie

Durch eine achtstündige Ischämiezeit werden erneut andere histologische Grade in *Abbildung 34* beobachtet. So weist Tier A in seinem rechten Leberlappen in dieser Gruppe noch den Grad 1 auf. Der linke Leberlappen zeigt, wie nach vier Stunden, einen histologischen Grad 2. Der Lobus caudatus zeigt nun ebenfalls einen Grad 2. Bei Tier B werden der rechte Leberlappen und der Lobus caudatus weiterhin durch die Ischämie geschädigt, was durch den Grad 2 in der Histologie verdeutlicht wird. Der linke Leberlappen verbleibt bei einem Grad 1. Bei Tier C zeigen nun auch der rechte Leberlappen sowie der Lobus caudatus einen Grad 2 auf. Tier D weist nach acht Stunden nun histologische Grade 2 in allen Leberlappen auf.

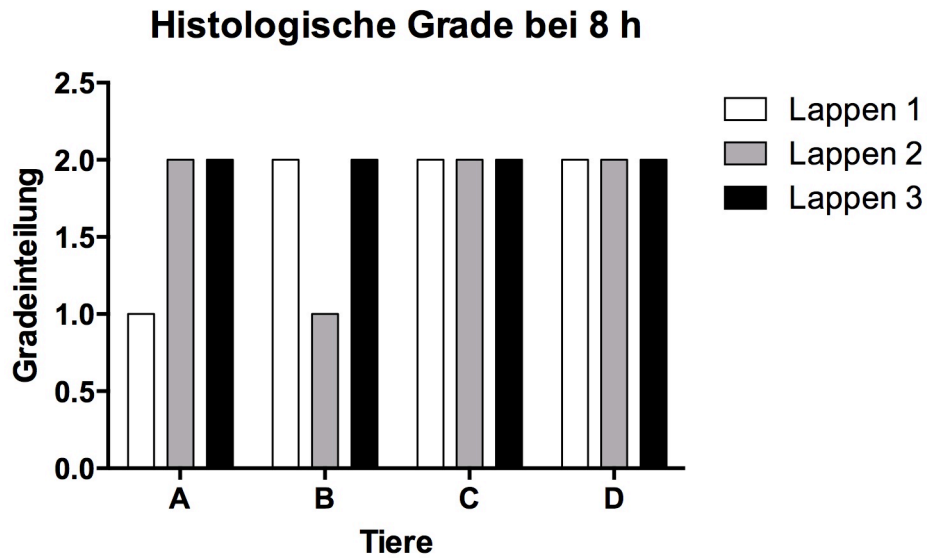


Abbildung 34: Gradeinteilung anhand der Ischämiezeit bei 8h

Abbildung 35 verdeutlicht die Progression der ischämischen Schädigung, welche durch den histologischen Grad messbar gemacht wird. Es lässt sich erkennen, dass bei einer Ischämie von zwei Stunden im Mittel ein histologischer Grad 1 vorliegt. Nach vier Stunden Ischämiezeit liegt im Mittel ein Grad zwischen 1 und 2 vor. Nach acht Stunden wird eine Progression der ischämischen Schädigung auf ungefähr einen histologischen Grad 2 festgestellt.

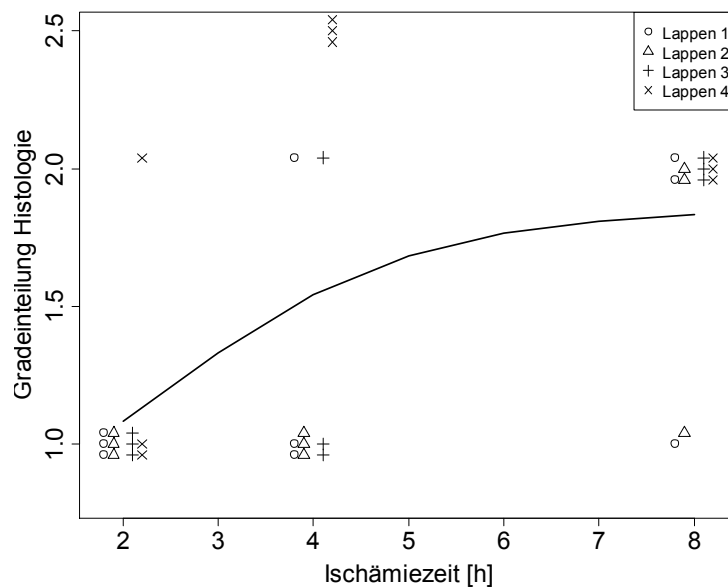


Abbildung 35: Auftragung der Gradeinteilung gegen die Ischämiezeit anhand der Mittelwerte

4.3 Ergebnisse der Blutwerte

In *Abbildung 36* wurde in einer Übersicht die gemessenen Laborwerte AST, ALT, LDH, Glucose und BUN anhand der Ischämiezeit aufgetragen. Es fällt dabei auf, dass eine Varianz zwischen den Messwerten vorliegt. Allein bei der Messung der LDH wird ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Ausgangswert von zwei Stunden und dem Endpunkt von acht Stunden gesehen.

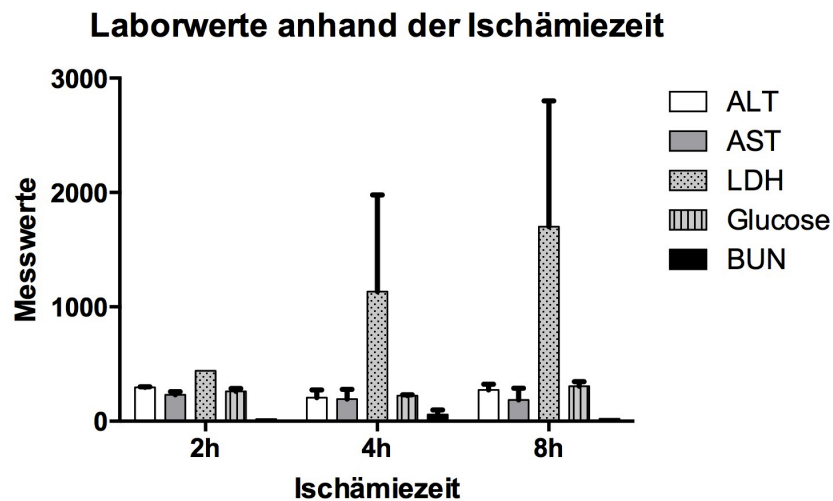


Abbildung 36: Laborwerte anhand der Ischämiezeit

Aus den *Abbildung 36* und *37* veranschaulichen, dass die Konzentrationen von ALT marginal schwanken. Nach zwei Stunden Ischämiezeit ist ein Wert von 297 U/l zu verzeichnen. Nach vier Stunden fällt dieser Wert auf 190 U/l. Der Endpunkt der Messung liegt nach acht Stunden bei einem Wert von 274 U/l.

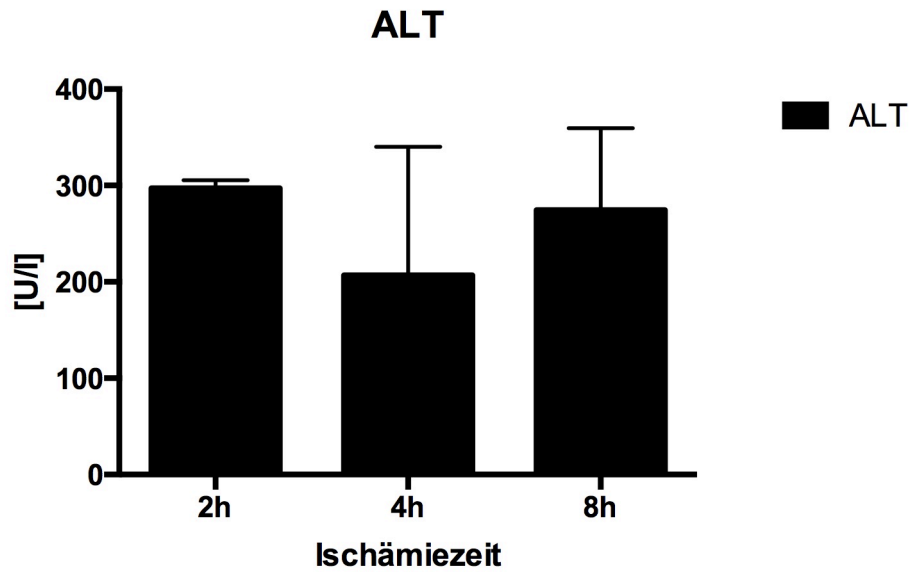


Abbildung 37: Auftragung der ALT Werte gegen die Ischämiezeit

Eine annähernd ähnliche Situation lässt sich bei der Messung von AST in *Abbildung 38* beobachten. Der Ausgangsmesswert nach zwei Stunden liegt bei 223 U/l. Danach lässt sich ein Abfall auf 193 U/l verzeichnen. Es folgt ein Anstieg nach acht Stunden auf 216 U/l.

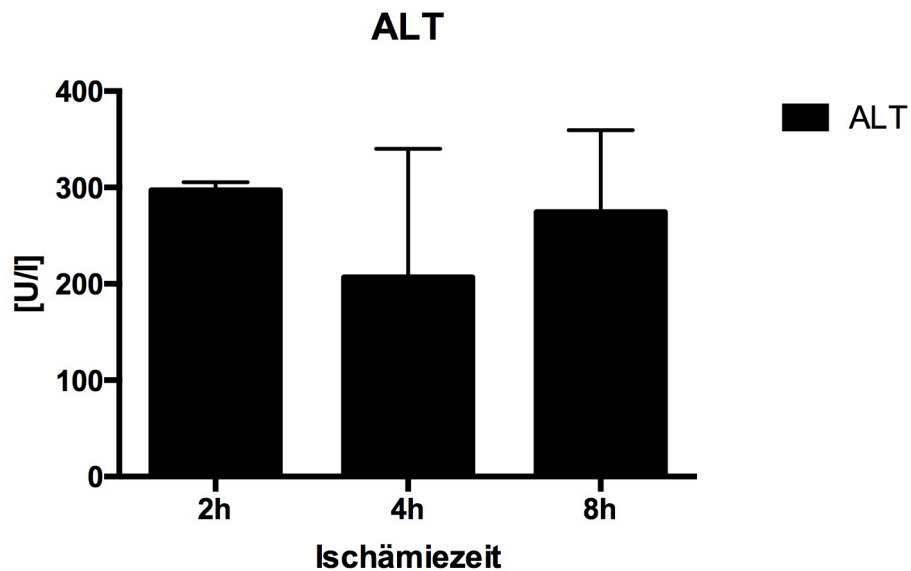


Abbildung 38: Auftragung der AST Werte gegen die Ischämiezeit

Abbildung 39 veranschaulicht die LDH Messung. Nach zwei Stunden sind Werte von 961 U/l zu messen. Nach zunehmender ischämischer Schädigung von vier und acht Stunden steigen diese Werte auf 1701 U/l an.

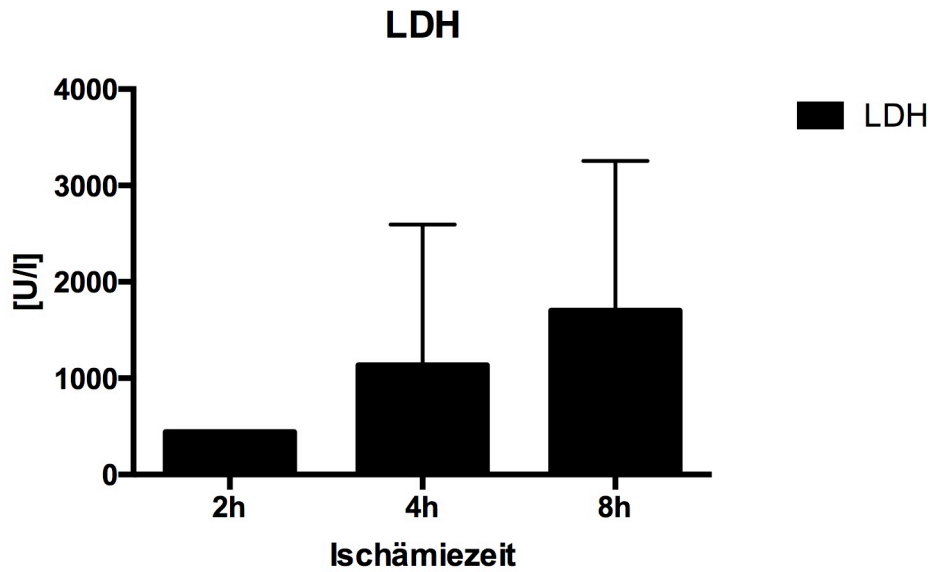


Abbildung 39: Auftragung der LDH Werte gegen die Ischämiezeit

Glucose fällt zunächst zwischen zwei und vier Stunden von Werten um 2261mg/dl auf 223mg/dl, wie sich in *Abbildung 40* zeigt. Nach acht Stunden lässt sich eine Steigerung auf 238 mg/dl messen.



Abbildung 40: Auftragung der Glucose Werte gegen die Ischämiezeit

In *Abbildung 41* wird die Messung von Harnstoff veranschaulicht. Zunächst wird nach zwei Stunden Ischämiezeit ein Wert von 19mg/dl verzeichnet, welcher auf 58mg/dl

nach vier Stunden ansteigt. Nach acht Stunden fällt dieser Wert wieder auf den Ausgangswert von 19mg/dl.

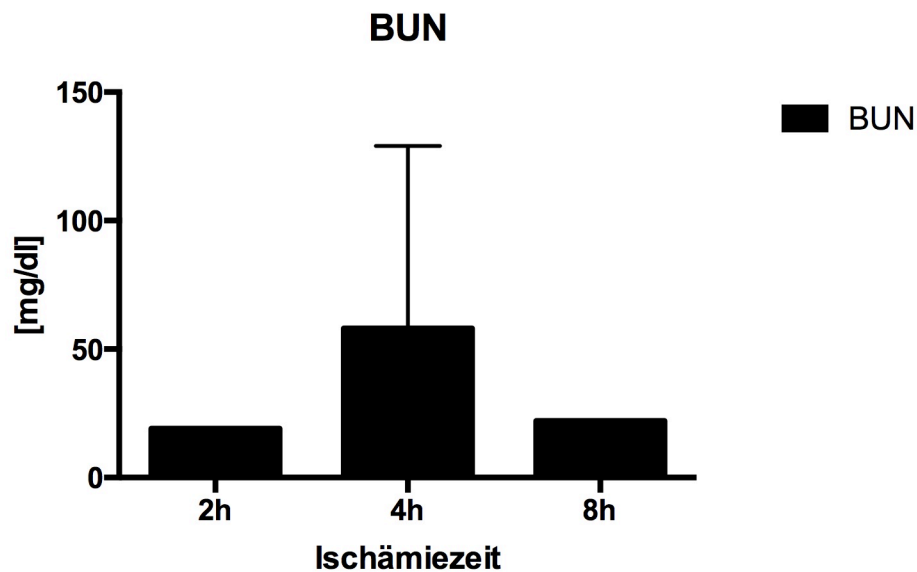


Abbildung 41: Auftragung der Harnstoff Werte gegen die Ischämiezeit

4.4 Korrelation zwischen ATP-Gehalt und Histologie

Es wird der mittlere Wert der histologischen Gradeinteilung mit dem mittleren Wert des ATP/Protein-Wert anhand der Ischämiezeit verglichen. Eine Zuordnung zu den einzelnen Lappen ist obsolet, da die Auswertung allein im Hinblick auf die Ischämiezeit erfolgt ist.

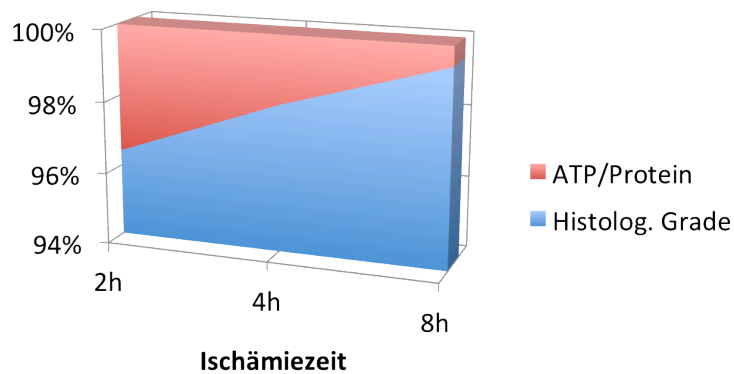


Abbildung 42: Prozentuale Darstellung der histologischen Grade und der Mittelwerte ATP/Protein bezogen auf die Ischämiezeit

Aus *Abbildung 42* lässt sich erkennen, dass der histologische Grad invers mit dem ATP/Protein Wert korreliert.

Nach zweistündiger Ischämiezeit wird in der Histologie im Mittel ein Grad 1 gesehen. Der Mittelwert der ATP/Protein Werte liegt dabei bei $0,04\mu\text{g/ml}$. Bereits nach vier Stunden kann ein mittlerer histologischer Grad zwischen 1 und 2 beobachtet werden, wobei der mittlere ATP/Protein-Wert bei $0,03\mu\text{g/ml}$ liegt. Nach achstündiger Ischämiezeit fällt dieser ATP/Protein- Wert auf $0,01\mu\text{g/ml}$. Zeitgleich kann ungefähr ein histologischer Grad 2 (1,8) gesehen werden.

Daraus lässt sich schließen, dass es mit steigender Ischämiezeit, zu einer progredienten Zellschädigung kommt, was durch eine Erhöhung des bestimmten histologischen Grades ausgedrückt wird, beziehungsweise der ATP/Protein-Gehalt abfällt.

Die *Tabelle 11* zeigt eine statistisch signifikante inverse Korrelation der mittleren ATP-Protein Werte und der mittleren histologischen Gradeinteilung ($\rho = -0,85$, $p=0,003$).

Tabelle 11: Korrelation des mittleren ATP/Protein-Gehalts mit der Histologie

		Mittelwert Gradeinteilung der Histologie		
		Correlation Coefficient	Sig. (2-tailed)	N
Spearman's rho	Mittelwert ATP/Protein	- 0,854	0,003	9

Der Korrelationskoeffizient für den zeitlichen Anstieg der Gradeinteilung betrug $\rho = +0,85$, $p = 0,003$. Ein zeitlicher Effekt und ein Effekt der ATP/Protein-Werte lassen sich aufgrund des Versuchsdesigns allerdings nicht differenzieren. Es fallen die ATP/Protein-Werte über die Zeit monoton ab, dennoch kann keine eindeutige Aussage gemacht werden, ob die Ischämiedauer, der eigentliche Faktor ist, welcher die histologische Gradeinteilung beeinflusst, oder ob es die ATP/Protein-Werte sind, welche die histologischen Ergebnisse bedingen.

5. Diskussion

5.1 Das Ratten-Tiermodell

Für die Versuchsreihe wurde ein Tiermodell ausgewählt, das annähernd ähnliche Bedingungen zu der humanen Transplantation generierte. Die Ratte als Versuchstier eignete sich hierfür besonders, da die Anatomie der Rattenleber der menschlichen Leber bis auf wenige Ausnahmen gleich.

Dieser Umstand ermöglichte es ähnliche Operationstechniken anzuwenden. Es bedurfte nur minimalen Abänderungen in der Operationsabfolge, um die Operation standardisiert durchzuführen.

Ebenso begründete sich der Einsatz der Tiere auf dem Etablissement in der Forschung. Die Zusammenarbeit mit den Veterinärmedizinern sorgte dafür, dass die Tiere eine artgerechte Haltung erfuhren und stets mit Umsicht Versuche durchgeführt wurden. Eine langjährige Erfahrung durch Arbeiten mit den Tieren ermöglichte darüberhinaus einen gezielteren Einsatz von Analgetika und Narkotika. Eine exakte Schmerzdosis wurde für jeden Versuch am Tier vorgeschrieben und die Dosis der

Narkotika wurde nach bestimmten laborinternen sowie staatlichen Regelungen festgelegt.

Die Tiere konnten ohne besondere Voraussetzungen in einem gemeinsamen Käfig gehalten werden, was zugleich eine Kostenersparnis darstellte. Die Gruppengröße belief sich dabei auf fünf bis sechs Tieren. Zugleich wurden den Tieren ein Tag-/Nachtrhythmus garantiert. Bei einer ausreichenden Hygiene, blieben ansteckende Keime und Infektionskrankheiten den Tieren erspart und die späteren Untersuchungsergebnisse wurden nicht verfälscht. Allerdings musste auch bedacht werden, dass diese Zuchttiere eine Verlagerung für Erkrankungen und Krankheiten hatten. Im Portfolio der Firma Charles River werden zum Beispiel eine hohe Rate an Spontantumoren, vor allem Nebennierentumore, Tumore der Hirnanhangsdrüse, Schilddrüsenkarzinome oder Erkrankungen, die das blutbildende System betreffen¹⁷ (Baum A, 1995), genannt.

Problematisch in der Versuchsdurchführung erweist sich die Tatsache, dass genetische Faktoren nicht beeinflusst werden konnten und kein definierter Gesundheitsstatus der Tiere präoperativ vorgelegen hatte. So ist es ungewiss geblieben, ob die Tiere womöglich schon eine vorbestehende Schädigung der Leber zum Beispiel aufgrund einer Stoffwechselerkrankung aufwiesen oder ob das histologische Resultat alleinig auf die ischämische Schädigung zurückzuführen war. Eine vorherige Biopsie und Blutentnahme hätte zweifelslos diese Fragen beantworten können. Die Biopsie ist allerdings unterlassen worden, um den Tieren präoperativen Stress zu ersparen.

Durch die Wahl einer finalen Versuchsreihe sind postoperative Störgrößen wie Infektionen und Krankheiten auf ein Minimum reduziert worden, die eine Verfälschung der Werte verursachen können. Die Frage, ob sich allerdings durch eine längere Beobachtungszeit Unterschiede in den Resultaten gezeigt hätten, bleibt daher ungewiss.

5.2 Die Operationstechnik

Eine Herausforderung der experimentellen Versuchsreihe stellten die anatomischen Größenverhältnisse der Ratte dar, weswegen unter Zuhilfenahme eines Mikroskops die Operation durchgeführt wurde.

Divergent der humanen Operationstechnik verhielt sich die Perfusionsphase der Spenderleber in-situ. Die Spenderleber wurde ebenfalls in CUSTODIOL®-Lösung und auf Eis gekühlt. Eine Abwandlung fand sich darin, dass die Leber direkt mit der Perfusionslösung durchspült wurde. Die Leber wurde in-situ des Empfängers vor Anastomosierung und Öffnung des Pfortaderflusses gereinigt sowie die Lumina der Gefäße kontrolliert. Eine etwaige Thrombosierung der intrahepatischen Lebergefäße konnte so ausgeschlossen werden und Anastomoseninsuffizienzen nach Naht konnten erkannt werden. Dies ließ eine Einschätzung über die Leberperfusion zu.

Aufgrund Zuhilfenahme von mikrochirurgischen Bedingungen, erfolgte nicht jede Anastomosierung der Gefäße mittels einer Naht. Eine Vereinfachung wurde beim Gallengang angewendet. Es wurde ein Gallengangssplint bzw. Gallengangscuff beim Spender zur anatomischen Orientierung und späterem vereinfachten Auffinden verwendet. Dadurch kam es zum einen zu einer leichteren Adaptation von kleinsten Strukturen und zum anderen konnte der zeitliche Aufwand reduziert werden. Eine solche Vereinfachung findet sich in der humane Lebertransplantation nicht.

Diese Modifikationen sind allerdings minimal, sodass das Rattenmodell weiterhin als Modell genutzt werden kann, um die Lebertransplantation chirurgisch anschaulich und detailgetreu zu untersuchen.

Nachteilig könnte sein, dass durch die Verwendung von Splints, neue Gefäßschäden entstehen könnten oder womöglich eine Potenzierung des ischämischen Schadens eintreten würde. Diese Hypothese konnte in der Literatur nicht bestätigt werden, es wird davon ausgegangen, dass sich die Verwendung von Splints in der Praxis nicht nachteilig auswirkt¹²³ (Matevossian E, 2009).

5.3 Messungen und Messfehler

5.3.1 Irregularität der Konservierungs-/Perfusionslösung

Der Einsatz von Konservierungs-/Perfusionslösung ist in der Transplantationsmedizin unabdingbarer Standard und bildet das Fundament für den Erfolg einer Transplantation.

An der TU München wird im Rahmen der Organentnahme und Organkonservierung, koordiniert durch die Deutsche Stiftung Organtransplantation, für gewöhnlich die Perfusionslösung CUSTODIOL® verwendet.

CUSTODIOL® setzt sich hauptsächlich aus den Aminosäuren Histidin, Tryptophan und Ketoglutarat, gelöst in Natriumchlorid-Lösung, zusammen¹⁵⁷ (Ringe B, 2005). Die Lösung wird nach dem Erfinder Hans-Jürgen Bretschneider als „Bretschneider-Lösung“ bezeichnet³⁰ (Bretschneider HJ, 1975). Sie zeichnet sich durch einen niedrigen Kalzium und Natriumgehalt aus. Durch eine dem Wasser ähnliche Viskosität (2η) ist die Perfusion in das Gewebe erleichtert²² (Bilzer M, 2002).

Durch Zusatz von Eisenbinder (LK-614; 1-(N-hydroxy-N-methylcarbamide)-3,4-dimethoxybenzol) wird freies Eisen gebunden, wodurch die Bildung von Radikalen und reaktive Sauerstoffspezies reduziert werden¹¹³ (Loganathan S, 2010). Die Zugabe von Aminosäuren hilft dem Schutze der Plasmamembranen der Leberzellen. Hier ist vor allem Glycin zu erwähnen²⁰⁵ (Weinberg, 1990), ²¹² (Zarrinpar A, 2012). Alanin reduziert den Natriumeinstrom in die Zelle und verhindert so eine ödematöse Schwellung der Zellen, was in einer Apoptose münden kann¹¹ (Bahde R, 2008).

CUSTODIOL® wirkt sich außerdem günstig auf die hepatische Mikrozirkulation, indem es zu keiner Formänderung der Erythrozyten kommt⁶⁸ (Feng X-N, 2006), die Perfusion der Sinusoide verbessert wird und die Einwanderung von Leukozyten verringert wird¹³⁸ (Olschewski P, 2008). Des Weiteren zeichnet sich CUSTODIOL® eine geringe Rate an bililären Komplikationen aus⁵ (Arai M, 2000).

Durch die positiven Eigenschaften und der standardmäßigen Verwendung an der Technischen Universität München, erschien es sinnvoll, auch diese Lösung für die Versuchsreihe einzusetzen. Zu Anbeginn der ersten Versuchsreihe im Rahmen der ATP-Messung wurde allerdings aus Kostengründen²¹ (Bellamy, 2008) auf die teuer produzierte CUSTODIOL®-Perfusionslösung verzichtet und stattdessen auf eine selbst hergestellte Nährlösung zurückgegriffen, die sich wie folgt zusammensetzte: DMEM base, NaHCO₃, L-Glutamin + FCS + HEPES + Glucose.

Eine Streitfrage mag bestehen bleiben und es muss hinterfragt werden, ob nicht zu Beginn der ATP-Messung CUSTODIOL® hätte verwendet werden sollen anstatt der selbsthergestellten Nährlösung. Rechtfertigen lässt sich die Entscheidung für die selbst hergestellte Nährlösung aufgrund der geringeren Kosten bei der hohen Anzahl an Versuchsdurchführungen. Zudem erschien es gleichgültig, welche industriell hergestellte Perfusionslösung verwendet werden sollte, da eventuelle Nachteile und

schädliche Wirkungen bei allen untersuchten Proben vorzufinden sein müssten, und so in der Auswertung erkannt würden. Natürlich hätte im Hinblick auf die Ischämiezeit und den ATP-Gehaltverlauf eine Lösung gewählt werden sollen, bei der es Erfahrungswerte in diesem Bereich bereits gab. Zu nennen wären die Voruntersuchungen anhand von Transaminasen in der Literatur¹¹⁷ (Mangus RS, 2006). Es wurde beschrieben, dass die ATP Produktion bei der Verwendung der „University-of-Wisconsin-Lösung“ um 30-40% höher ausfalle als bei anderen Lösungen. Die Frage, ob es durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Medien, zu einer eingeschränkten Korrelnanz der Ergebnisse kommen konnte, blieb offen. Prinzipiell waren in beiden Medien Puffer und Aminosäuren als Basis zugesetzt, wodurch ähnliche Qualitäten der Lösungen angenommen werden konnte. Die Ergebnisse beider Versuche zeigten zudem eine positive Korrelation und ließen sich miteinander vergleichen. Bei weiteren Studien dieser Art sollte allerdings ein Augenmerk auf die Verwendung gleicher Medien bei beiden Versuchen gelegt werden. So könnte es auch sein, dass starke Schwankungen, wie sie innerhalb der ATP-Messung beobachtet wurden, eventuell auf das Nährmedium zurückzuführen waren. Um einen Vergleich zwischen beiden Lösungen ermöglichen zu können, sollten in Zukunft die Versuchsreihen mit beiden Nährlösungen durchgeführt werden. Möglicherweise fanden auch Reaktionen innerhalb der selbsthergestellten Nährlösung statt, die nicht vorherzusehen waren und somit das Resultat beeinflusst haben. So konnte keine exakte Auskunft über die Funktionalität und Reinheit der Nährmedien getroffen werden. Eventuelle Verunreinigungen durch Bakterien, Pilze oder Viren wurden deshalb nicht erfasst.

Tabelle 12: Zusammensetzung von CUSTODIOL®

Bestandteil	Menge
Natriumchlorid	15,0 mmol
Kaliumchlorid	9,0 mmol
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	4,0 mmol
Histidinhydrochlorid x H ₂ O	18,0 mmol
L-Histidin	180,0 mmol

Tryptophan	2,0 mmol
Mannitol	30,0 mmol
2-Oxoglutarsäure	1,0 mmol
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	0,015 mmol

Tabelle 13: Zusammensetzung von der selbsthergestellten Nährlösung

Bestandteil	Menge
DMEM base + NaHCO ₃	0,35 g/l
L-Glutamin	2mM
FCS	5%
HERPES	20 mM
Glucose	25 mM
pH-Wert	pH 7,25

Ein weiterer, sich auf die Messungen auswirkender Punkt, ist die Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen. Beide Versuchsreihen, sowohl die ATP-Messung als auch die Transplantation der Lebern, wurden mit jeweils n=4 Tieren, also viermal hintereinander zu den definierten Zeitpunkten durchgeführt. Es konnte eine klare Tendenz bei den jeweiligen Auswertungen gezeigt werden, dennoch könnte eine größere Wiederholungsrate in den einzelnen Gruppen zu markanteren Ergebnissen führen. Dabei sollten allerdings stets der ethische Aspekt immer genau geprüft werden und nicht außer Sicht gelassen werden, wieviele Tiere für den Versuch benötigt werden, um eine Tendenz abzeichnen zu können. Unnötiger Einsatz der Tiere für die Versuche wäre aus ethischer Sicht nicht zu vertreten.

5.3.2 Finale Versuchsreihe

Die Tiere wurden nach Entnahme der Lebern für die ATP-Bestimmung sowie nach erfolgreicher Lebertransplantation euthanasiert.

Favorisiert wurde dieses Vorgehen aus mehreren Gründen: Zum einen wurde so den Tieren unnötiges postoperatives Leid erspart. Zum anderen konnten dadurch direkt die zu untersuchenden Parameter anhand der Ischämiezeit gemessen werden. Es gab keine Interferenz möglicher postoperativer Störfaktoren wie Haltung der Tiere, Nahrung oder mögliche Infektionen.

5.4 Histologische Färbemethoden

Die histologische Untersuchung diente dazu, die Auswirkungen der ischämischen Schädigung bildlich fassbar zu machen.

Verwendet wurde zwei Standardfärbungen, eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung und eine Elastica-van-Gieson-Färbung.

Die Elastica-van-Gieson-Färbung bestand aus zwei Farbstoffen. Pikrofuchsin färbte dabei Gewebestrukturen gelb. Der zweite Farbstoff, Säurefuchsin, diente zur Anfärbung des kollagenen Bindegewebes in rot. Anschließend folgte dabei eine Färbung mit Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert. Am Ende der Färbungsreihen wurden so elastische Fasern und Zellkerne schwarz, Kollagenfasern rot und Muskulatur sowie Zytoplasma gelb dargestellt.

Bei der histologischen Untersuchung wurden folgende Parameter erfasst und ausgewertet: Vakuolisierung, sinusoidale Dilatation, Hyperämie, Zellödem, Einzelzell- und Gruppenzellnekrosen, Karyorhexis. Dies geschah in Anlehnung an die BANFF-Arbeitsgruppe (eine Kooperation von Pathologen, Hepatologen, Chirurgen und Immunologen, die sich mit der Histopathologie, der Funktionalität und der Integrität von Lebern bei Transplantationen beschäftigt¹⁴).

Dabei stellten Vakuolisierung, sinusoidale Dilatation und Hyperämie Zeichen einer akuten Abstoßungsreaktion dar. Parameter für eine ischämische Schädigung fanden in Einzelzell- und Gruppenzellnekrosen und Karyorhexis. Auf eine reine histologische Untersuchung nach den BANFF-Kriterien wurde verzichtet, da diese explizit für eine akute Abstoßung definiert wurden. Mit der Auswahl von syngenen Ratten wurde eine akute Abstoßung als unwahrscheinlich angesehen, weswegen keine Notwendigkeit

bestand, die BANFF-Kriterien in die Untersuchung bewusst miteinzubeziehen. Es stand lediglich die ischämische Schädigung und als Folge derer der Zelluntergang im Vordergrund.

Eine Systematisierung der Ergebnisse resultierte in einer Einteilung in histologische Grade. Dabei wurden nur die Befunde in die Systematisierung miteinbezogen, die tatsächlich auch in der Histologie zu sehen waren. Um die Qualität der Graduierung zu verbessern und gegebenenfalls weitere Unterschiede herausstellen zu können, wäre es von Vorteil eine größere Anzahl an Proben in weiteren Versuchsreihen zu untersuchen.

Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass eine messbare Schädigung der Leber nach Ischämie nach zehn Stunden kalter Ischämiezeit eintritt¹⁶⁹ (Selzner N, 2002). Nach diesem Zeitpunkt sollten die Organe nicht mehr für eine Lebertransplantation verwendet werden. Aufgrund der Ergebnisse der ATP-Voruntersuchungen wurden bei den histologischen Untersuchungen die Ischämiezeiten von zwei, vier und acht Stunden festgelegt. Zweifelsohne hätten auch spätere Ischämiezeiten herangezogen werden können, doch dort fand keine wesentliche Änderung des ATP-Spiegels mehr statt, weshalb nur auf die aussagekräftigen Werte zurückgegriffen wurde. Untersuchungen von diversen Autoren zeigen auch, dass vor allem TNF- α und IL-6 als proinflammatorische Zytokine, die Leberregeneration anregen¹⁸⁵ (Sudo K, 2008), 186 (Taki-Eldin A, 2012), 209 (Yang H, 2012). Je länger dabei die Konservierung und somit die Ischämie dauerte, desto weniger waren diese Zytokine vorzufinden. Nachteilig wirkte sich dieser Aspekt in dem Sinne aus, da diese der Leberregeneration dienen¹⁶⁹ (Selzner N, 2002). Ebenso wurde eine Zunahme der Makrosteatosis nach zehn Stunden Ischämiezeit beobachtet, welche ebenfalls zu einem Transplantatversagen führen konnte¹⁵⁹ (Salizzoni M, 2003). Vor allem bei steatotischen Lebern fanden sich erniedrigte Werte an Caspase 3 und 8 sowie Cytochrom C, die letztendlich in einer Apoptose mündeten¹⁶⁸ (Selzner M, 2000).

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen könnte so in weiteren Versuchsreihen unter Verwendung der Ergebnisse dieser Versuchsreihen, ein verbessertes Scoring-System ausgearbeitet werden.

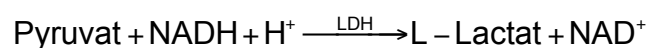
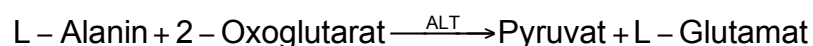
5.5 Aussagekraft der Blutwerte

Gemessen wurden die Blutwerte Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Lactatdehydrogenase (LDH), Glucose (Gluc) und Harnstoff (BUN).

Mit der Messung der Alanin-Aminotransferase (ALT), früher auch als Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) bezeichnet, konnte ein Leberschaden laborchemisch angezeigt werden.

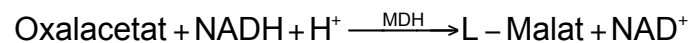
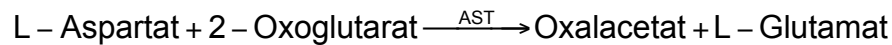
Dabei ist die ALT spezifisch für Lebererkrankungen. 85% des Enzyms befinden sich im Zytoplasma und weitere 15% in den Mitochondrien¹⁰⁴ (Hagemann O, Laborlexikon, 2014). Allerdings sollte bedacht werden, dass auch eine Stauungsleber, bedingt durch Rechtsherzversagen, für erhöhte Werte verantwortlich gemacht werden kann. Ebenso kann eine Schädigung der Leberzellen durch Infektionen, Virushepatiden, Krebserkrankungen oder durch das eigene Immunsystem zu einer Erhöhung der Transaminasen führen. Beispiele wären hierfür eine Fettleber, ein Lebertumor oder eine Toxoplasmose-Infektion. Bekommen die Zellen nicht mehr genügend Sauerstoff, sei es durch sauerstoffaufbrauchende Lokalprozesse, Schwellung oder durch Unterbrechung der Blutzufuhr, erleidet die Leber eine ischämische Schädigung, die sich in einer Erhöhung der ALT messen lässt.

Dabei erfolgt die Messung über eine Indikatorreaktion, die die Abnahme von NADH misst:



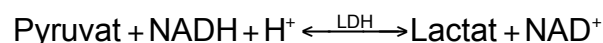
Eine erhöhte Aspartat-Aminotransferase (AST) bzw. Glutamat-Oxalacetat-Transferase, ist ebenfalls ein Indikator für einen Leberschaden, allerdings ist sie nicht spezifisch für die Leber. Lokalisiert ist das Enzym noch in den Herz- und Skelettmuskelzellen, wovon wiederum 80% in den Mitochondrien vorzufinden sind und nur 20% im Zytoplasma¹⁰³ (Hagemann O, Laborlexikon, 2014).

Laborchemisch wird hier ebenfalls die Abnahme von NADH gemessen:



Um eine Transaminasenerhöhung auf eine Leberschädigung zurückführen zu können, eignet ist der *DeRitis-Quotient* (AST/ALT). Ist das Ergebnis dabei größer als 1, so dies mit einer schweren Leberzellschädigung vereinbar. Die Schädigung hat dabei ihren Ursprung in der Leber.

Die Lactatdehydrogenase, LDH, dient ebenfalls dem Nachweis von Gewebsschädigungen. Sie zeigt eine Erhöhung bei einer Vielzahl von Erkrankungen an, unter anderem Herzmuskelerkrankungen, hämolytische Erkrankungen, Skelettmuskelerkrankungen, Leber- und Gallenwegserkrankungen sowie Lungenembolien. Grund dafür ist, dass das Isoenzym fünf Subformen aufweist, welche eine Dominanz in unterschiedlichen Organen aufweisen. So ist vor allem die *LDH 1* im Herz und die *LDH 5* in der Leber und im Skelettmuskel zu finden. Bei enzymatischer Testung wird die Tatsache ausgenützt, dass Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ durch die Lactatdehydrogenase zu Lactat und NAD^+ umgewandelt werden. Die Abnahme von NADH lässt sich dabei durch eine kinetische Indikatorreaktion messen und so die Gesamt-LDH bestimmt werden:



Die Messung der Glucose wurde durchgeführt, da der Blutzuckerwert auch bei einer Leberschädigung erniedrigt sein kann. Ebenso führt eine Niereninsuffizienz und auch ein kataboler Metabolismus, verursacht durch z.B Anorexie,¹⁰³ (Hagemann O, Laborlexikon, 2014) zu einer erniedrigten Glukose. Auch paraneoplastische Syndrome wie z.B ein Insulinom oder gewisse Enzymdefekte (Fruktoseintoleranz etc) können zu einem erniedrigten Glukosewert führen.

Als Farbreaktion und letztendlich als Messwert dient die Absorptionszunahme von NADH :



Harnstoff ist ein Abbauprodukt des Proteinstoffwechsels. Gebildet wird Harnstoff in der Leber aus Ammoniak und Kohlendioxid. Fast vollständig ausgeschieden wird Harnstoff über die Niere. Folglich ist es einsichtig, dass eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration vor allem bei schwerer Niereninsuffizienz und bei kataboler Stoffwechsellage zu finden ist.

Bei einer Erniedrigung des Wertes dagegen liegt die Ursache dagegen in einer Malnutrition, einer Zöliakie oder in einem Leberparenchymschaden¹⁰⁵.

Laut Angaben der Firma Charles River findet sich bei den männlichen Lewis-Ratten ein Maximalwert des ALT von 551 U/l, AST bei 710 U/l, Glucose 463 U/l und Bun 24 U/l. Diese Messwerte wurden allerdings in den eigenen firmeninternen Laboratorien gemessen. Die vorgenommenen Messungen während der Versuchsreihe erreichten nie den Maximalwert bei ALT, AST oder Glucose. Bei der Harnstoffmessung wurden allerdings deutlich höhere Werte erzielt. Ungewiss verbleibt hierbei die Vergleichbarkeit der Werte untereinander, da Parameter oftmals laborabhängig sind, weswegen kein Vergleich und somit keine Aussagen zwischen den im Experiment gemessenen Werten und den Firmenangaben von Charles River gemacht werden können.

Mit diesem Hintergrundwissen müsste bei prolongierter Ischämie und folgender Leberzellschädigung ein Anstieg von ALT, AST und LDH zu erwarten sein. Experimentell blieb diese Bestätigung allerdings aus.

Vielmehr wurde eine Stagnation der Werte verzeichnet (zwischen 250 und 300 U/l). Es konnte ein Abfall um rund 17% verzeichnet werden (300 auf 250 U/l), der den Ausgangswert nicht überschritt.

In der Histologie sowie in der ATP-Messung wurde eindeutig eine Schädigung verzeichnet. Die Laborwerte zeigten sich demnach nicht konkordant zu den Vormessungen. Den Erwartungen entsprechend stieg die LDH an. Der Zelluntergang war proportional mit der ischämischen Schädigung. Die Glucose fiel, wie zu erwarten, zunächst ab, stieg dann aber nach acht Stunden wieder an, entgegen den Erwartungen. Auch bei der Harnstoffmessung wurden Werte verzeichnet, die nach den Vorüberlegungen gegenteilig ausfallen hätten müssen. Es hätte eine Abnahme der Werte nach Vorüberlegungen erfolgen sollen, was allerdings nicht bestätigt werden konnte.

Fehlerquellen, die sich für diese Unterschiede finden lassen, mögen in der maschinellen Auswertung liegen. Es wurde die IDEXX VetLabStation zur Messung der Laborparameter verwendet. Dabei musste aufgrund von Softwareaktualisierungen auch mehrmals neue Eichungs-Disketten während laufender Versuchsdurchführungen verwendet werden. Dadurch wurden eventuell die Referenzwerte geändert und jede neue Messung erhielt divergente Ergebnisse, was zur Beeinträchtigung der Auswertung geführt haben könnte. Obwohl die Proben nach Versuchsende eingefroren wurden, lieferten die Nachmessungen stets unterschiedliche Ergebnisse, was die obige Theorie stützt. Möglich könnte auch sein, dass das Einfrieren molekulare Reaktionen veranlasste, die eine Änderung der Messung bewirkten. Demnach wurde die Entscheidung gefällt, die Laborparameter nicht miteinzubeziehen.

6. Zusammenfassung

Anhand des Rattenmodells wird in dieser Arbeit die Vitalität von Lebern beurteilt und nachfolgend erörtert, inwieweit sich der I/R auf die ATP Produktion, diverse Blutparameter (AST, ALT, LDH, Glucose, BUN) und die Histologie auswirkt.

Es wurde zunächst ein Versuchsaufbau entwickelt, welcher sich in vier Teilschritte gliederte. Im ersten Teilschritt wurde ATP mithilfe des „*ATPlite Luminescence ATP Detection Assay System*“ an Spenderlebern der Ratte zu bestimmten Ischämiezeiten gemessen (2h – 10h), um den Abfall des ATP über die Zeit beobachten zu können. Dabei wurden n=4 Tiere je Ischämiezeit in die Auswertung miteingeschlossen. Um mögliche Störgrößen wie Masse und Gewicht der einzelnen Lebern zu reduzieren, wurde gleichzeitig eine Proteinbestimmung an den Lebern vorgenommen.

Anschließend erfolgte eine orthotope Lebertransplantation an Rattenlebern in piggy-back-Technik zu bestimmten klinisch relevanten Ischämiezeiten: zwei Stunden, vier Stunden und acht Stunden nach Entnahme der Lebern. Die Gefäßanastomosen erfolgten dabei durch fortlaufende Naht. Die Tiere wurden nach Einstellen eines suffizienten Kreislaufes euthanasiert und die Lebern der Histologie zugeführt. Anhand vordefinierter Kriterien erfolgte eine histologische Aufteilung der

Leberpräparate in Grade. Ebenfalls wurden hier n=4 Tiere zu den bestimmten Ischämiezeitpunkten in die Auswertung aufgenommen.

Dabei sollte durch die Gradeinteilung eine Progredienz der ischämischen Schädigung verdeutlicht werden: von einer milden Schädigung (Grad 1) zu einer ausgeprägten Schädigung (Grad 3).

Eine Messung der Blutwerte (AST, ALT, LDH, BUN, Glucose) sollte Bezug auf den bestehenden Stoffwechsel nach ischämischer Schädigung nehmen.

Es zeigte sich in der Auswertung eine deutliche Abnahme des ATP/Protein-Gehalts. Ausgehend von 0,041µg/ml nach einer Ischämiezeit von zwei Stunden, fiel dieser Wert auf ein Plateau von 0,011µg/ml nach acht Stunden. Statistisch konnte ein mittlerer Abfall von 0,0067µg/ml mit einer Signifikanz von $p=0,010$ ermittelt werden.

In der histologischen Auswertung zeigte sich nach einer zweistündigen Ischämiezeit vermehrt ein- von uns definierter- Grad 1. Eine Zunahme der Schädigung konnte auf histologischer Ebene nach vier Stunden verzeichnet werden, es zeigte sich vermehrt ein Grad 2. Nach acht Stunden konnte lediglich im Mittel ein Grad 2 festgestellt werden.

Bezüglich der weiteren durchgeführten Untersuchung, der Serologie, wichen die Messwerte bei den einzelnen Messungen signifikant voneinander ab, so dass der Entschluss fiel, diese nicht in die finale Beurteilung mitaufzunehmen.

Dennoch konnte anhand der mitochondrialen Permeabilität der Lebertransplantate das Ausmaß des I/R histologisch evaluiert und quantifiziert werden.

Es zeigte sich, dass das Ausmaß der mitochondrialen Schädigung bei prolongierter Transplantatischämie sensitivere Ergebnisse liefert als die bisher klinisch etablierte konventionelle histologische Auswertung. Die konventionelle Histologie verschleiert demnach den reellen Zustand und die Vitalität der explantierten Lebern, da bei konventionellen histopathologischen Wertungen das Ausmaß der ischämischen Schädigung später messbar ist als der ATP-Abfall.

Aus diesem Grunde sollte verstärkt ein Augenmerk darauf gelegt werden, die mitochondriale Schädigung als definitive Evaluation zur Bemessung einer Organeignung für eine Transplantation heranzuziehen.

So ist die ATP-Messung sensitiver, da diese in der vorliegenden Arbeit über einen Ischämiezeitraum von 2-7 Stunden kalter Ischämiezeit eine relevante Abnahme

verdeutlicht, während die histopathologische Untersuchung selbst nach achtstündiger Ischämiezeit noch keine deutliche Organschädigung anzeigt.

Ein Prognose-Score zur Identifizierung marginaler Organe lässt sich theoretisch anhand der mitochondrialen Schädigung mittels ATP Abfall mit einer höherer klinischer Relevanz erstellen. Fällt der ATP-Wert innerhalb der ersten zwei Stunden nur um ein Hundertstel (2h: 0,04 [$\mu\text{g/ml}$]; 4h: 0,03 [$\mu\text{g/ml}$]), so wirkt sich das erst verzögert in einer sichtbaren ischämischen Schädigung in der Histologie aus.

Um einen definitiven Score zu ermitteln, sollten allerdings die Messergebnisse mit humanem Materialproben validiert werden. Des Weiteren wäre eine zeitliche Beschleunigung der ATP-Messung von Nöten, um ein effizienteres Arbeiten ermöglichen zu können. Die Messungen des ATP-Gehalts dauerte während der Erstellung dieser Arbeit nahezu einen halben Tag, was die Umsetzung für das Heranziehen des Scores ebenfalls erschwert.

7. Literaturverzeichnis

1. Abradelo M, Sanabria R, Caso O, Álvaro E, Moreno E, Jiménez C. Split liver transplantation: where? when? how? *Transplant Proc.* 2012;44(6):1513-1516. doi:10.1016/j.transproceed.2012.05.002.
2. Alexander JW, Zola JC. Expanding the donor pool: use of marginal donors for solid organ transplantation. *Clin Transplant.* 1996;10(1 Pt 1):1-19.
3. Angeli P, Gines P. Hepatorenal syndrome, MELD score and liver transplantation: an evolving issue with relevant implications for clinical practice. *J Hepatol.* 2012;57(5):1135-1140. doi:10.1016/j.jhep.2012.06.024.
4. Anthuber M, Farkas S, Rihl M, Menger MD, Jauch KW, Schildberg FW, Messmer K. Conditioning of liver grafts by donor bolus pretreatment with epoprostenol. *Transplantation* 1996;62(1):13-17.
5. Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A(2) receptors and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cells against Storage/Reperfusion injury in rat livers. *Hepatology.* 2000;32(2):297-302. doi:10.1053/jhep.2000.8896.
6. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Pathologie: Histopathologische Diagnose. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Pathologie. AWMF-Leitlinien-Register Nr 035/004; unter: [https:// www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/035-004_Histopathologische_Diagnose.pdf](https://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Leitlinien/Evidenzbasierte_Leitlinien/035-004_Histopathologische_Diagnose.pdf)&ie=UTF-8&oe=UTF-8&gfe_rd=ctrl&ei=KgURU-DIKqje8gfm3YCICg&gws_rd=cr. Veröffentlicht November 2009. Aufgerufen Februar 2014.
7. Asrani SK, Kim WR. Model for end-stage liver disease: end of the first decade. *Clin Liver Dis.* 2011;15(4):685-698. doi:10.1016/j.cld.2011.08.009.

8. ATPlite™ Luminescence Assay System, 5000 Assay Kit | PerkinElmer. <http://www.perkinelmer.com/Catalog/Product/ID/6016947>. Aufgerufen Mai 2014.
9. Attia M, Silva MA, Mirza DF. The marginal liver donor – an update. *Transplant International*. 2008;21(8):713-724. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00696.x.
10. Aviles AJ, Theodorou S, Sekosen M, Schraufnagel D, Ramasastry S. Challenging Alexis Carrel: a study in alternate microvascular techniques. *Neurol Res*. 2004;26(8):809-815. doi:10.1179/016164104X5129.
11. Bahde R, Palmes D, Gemsa O, Minin E, Stratmann U, de Groot H, Rauen U, Spiegel HU. Attenuated cold storage injury of rat livers using a modified HTK solution. *J. Surg. Res*. 2008;146(1):49-56. doi:10.1016/j.jss.2007.08.011.
12. Baker LA, Watt IN, Runswick MJ, Walker JE, Rubinstein JL. Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(29):11675-11680. doi:10.1073/pnas.1204935109.
13. Banff schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document. Demetris AMD, Batts KP, Dhillon AP, Ferrell L, Fung J, Geller SA, Hart J, Havry P, Hogmann WJ, Hubscher S, Kemnitz J, Koukoulis G, Lee RG, Lewin KJ, Ludiwg J, Markin RS, Petrovic LM, Philipps JM, Portmann B, Reakela J, Randhawa P, Reinholt FP, Rexnes M, Robert M, Schlitt H, Solez K, Snover D, Taskinen E, Thung SN, Tillery WG, Wiesner RH, Wight DDG, Williams JW, Yamabe H. *Hepatology*. 1997;25(3):658-663. doi:10.1002/hep.510250328.
14. Banff Working Group on Liver Allograft Pathology, Demetris AMD. Importance of liver biopsy findings in immunosuppression management: Biopsy monitoring and working criteria for patients with operational tolerance. *Liver Transplantation*. 2012;18(10):1154-1170. doi:10.1002/lt.23481.
15. Barry JM, Murray JE. The First Human Renal Transplants. *The Journal of Urology*. 2006;176(3):888-890. doi:10.1016/j.juro.2006.04.062.

16. Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis. An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol*. 1995;19(12):1409-1417.
17. Baum A, Pohlmeier G, Rapp KG, Deerberg F. Lewis rats of the inbred strain LEW/Han: life expectancy, spectrum and incidence of spontaneous neoplasms. *Exp Toxicol Pathol*. 1995;47(1):11-18. doi:10.1016/S0940-2993(11)80275-7.
18. Beauchesne PR, Chung NSC, Wasan KM. Cyclosporine A: a review of current oral and intravenous delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2007;33(3):211-220. doi:10.1080/03639040601155665.
19. Becker NS, Barshes NR, Aloia TA, Nguyen T, Rojo J, Rodriguez JA, O'Mahony CA, Karpen SJ, Goss JA. Analysis of recent pediatric orthotopic liver transplantation outcomes indicates that allograft type is no longer a predictor of survivals. *Liver Transplantation* 2008;14(8):1125–1132. doi:10.1002/lt.21491.
20. Belghiti J, Noun R, Sauvanet A. Temporary portocaval anastomosis with preservation of caval flow during orthotopic liver transplantation. *Am J Surg*. 1995;169(2):277-279. doi:10.1016/S0002-9610(99)80151-2.
21. Bellamy CA, Nicely B, Mattice BJ, Teaster R. Comparative analysis of clinical efficacy and cost between University of Wisconsin solution and histidine-tryptophan-ketoglutarate. *Prog Transplant*. 2008;18(3):166-171; quiz 172.
22. Bilzer M, Schauer RJ, Gerbes Alexander L. Prävention von Ischämie-Reperfusionsschäden: Schutz der Leber bei Resektion und Transplantation. *Dtsch Arztebl* 2002; 99(28-29):A-1980 / B-1669 / C-1563.
23. Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler: 74 Tabellen. Georg Thieme Verlag, 2006
24. Bismuth H, Morino M, Castaing D, Gillon MC, Descorps Declere A, Saliba F, Samuel D. Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. *Br J Surg* 1989;76(7):722-724.
25. Blome B. Deutsche Stiftung Organtransplantation: Zahl der Organspender in 2013 weiter stark gesunken. DSO, Frankfurt am Main, 2014. Unter:

- <http://www.dso.de/dso-pressemitteilungen/einzelansicht/article/zahl-der-organspender-in-2013-weiter-stark-gesunken.html>.
26. Bonn: Die erste Lebertransplantation in Deutschland: Kultur-in-Bonn.de. <http://www.kultur-in-bonn.de/magazin/bonn-passac/anzeige/article/die-erste-lebertransplantation-in-deutschland-1213012402.html>. Aufgerufen März 2014.
 27. Boucher A, Lord H, Collette S, Morin M, Dandavino R. Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients: Evolution of approach through three eras. *Transplant. Proc.* 2006;38(10):3506-3508. doi:10.1016/j.transproceed.2006.10.127.
 28. Boyer PD. Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. *FEBS Lett.* 2002;512(1-3):29-32.
 29. Boyer PD. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:717-749. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717.
 30. Bretschneider HJ, Hübner G, Knoll D, Lohr B, Nordbeck H, Spieckermann PG. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 1975;16(3):241-260.
 31. Broelsch CE, Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Baker AL, Lichtor JL. Application of reduced-size liver transplants as split grafts, auxiliary orthotopic grafts, and living related segmental transplants. *Ann Surg.* 1990;212(3):368-375; discussion 375-377.
 32. Brunt EM. Surgical assessment of significant steatosis in donor livers: the beginning of the end for frozen-section analysis? *Liver Transpl.* 2013;19(4):360-361. doi:10.1002/lt.23609.
 33. Büchler M, Hurault de Ligny B, Madec C, Lebranchu Y, French Thymoglobuline Pharmacovigilance Study Group. Induction therapy by anti-thymocyte globulin (rabbit) in renal transplantation: a 1-yr follow-up of safety and efficacy. *Clin Transplant.* 2003;17(6):539-545.

34. Bundesärztekammer - Richtlinien für die Wartelistenführung und die Organvermittlung gem. § 16 Abs. 1 S. 1 Nrn. 2 u. 5 TPG. unter: <http://www.bundesaerztekammer.de/page.asp?his=0.7.45.8858.8870>. Aufgerufen März 2014.
35. Busuttil RW, Goss JA. Split Liver Transplantation. *Annals of Surgery March* 1999. 1999;229(3):313-321.
36. Busuttil RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003;9(7):651-663. doi:10.1053/jlts.2003.50105.
37. Calne R, Friend P, Moffatt S, Bradley A, Hale G, Firth J. Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. *Lancet* 1998;351(9117):1701-1702. doi:10.1016/S0140-6736(05)77739-4.
38. Calne RY, Williams R, Dawson JL, Ansell ID, Evans DB, Flute PT, Herbertson PM, Joysey V, Keates GH, Knill-Jones RP, Mason SA, Millard PR, Pena JR, Pentlow BD, Salaman JR, Sells RA, Cullum PA. Liver transplantation in man. II. A report of two orthotopic liver transplants in adult recipients. *Br Med J* 1968;4(5630):541-546.
39. Cameron AM, Ghobrial RM, Yersiz H, Farmer DG, Lipshutz GS, Gordon SA, Zimmerman M, Hong J, Collins TE, Gornbein J, Amersi F, Weaver M, Cao C, Chen T, Hiatt JR, Busuttil RW. Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Ann. Surg.* 2006;243(6):748-753; discussion 753-755. doi:10.1097/01.sla.0000219669.84192.b3.
40. Capaldi RA, Aggeler R. Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(3):154-160.
41. Casillas-Ramírez A, Mosbah IB, Ramalho F, Roselló-Catafau J, Peralta C. Past and future approaches to ischemia-reperfusion lesion associated with liver transplantation. *Life Sci.* 2006;79(20):1881-1894. doi:10.1016/j.lfs.2006.06.024.

42. Cholongitas E, Marelli L, Kerry A, Senzolo M, Goodier DW, Nair D, Thomas M, Patch D, Burroughs AK. Different methods of creatinine measurement significantly affect MELD scores. *Liver Transpl.* 2007;13(4):523-529. doi:10.1002/lt.20994.
43. Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, Senzolo M, Rolles K, Patch D, Burroughs, AK. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl.* 2006;12(7):1049-1061. doi:10.1002/lt.20824.
44. Christensen E. Prognostic models including the Child-Pugh, MELD and Mayo risk scores--where are we and where should we go? *J Hepatol.* 2004;41(2):344-350. doi:10.1016/j.jhep.2004.06.005.
45. Ciancio G, Gonzalez J, Shirodkar SP, Angulo JC, Soloway MS. Liver Transplantation Techniques for the Surgical Management of Renal Cell Carcinoma with Tumor Thrombus in the Inferior Vena Cava: Step-by-Step Description. *European Urology.* 2011;59(3):401-406. doi:10.1016/j.eururo.2010.07.028.
46. Clavien PA, Selzner M, Rüdiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V, Jochum W. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann. Surg.* 2003;238(6):843-850; discussion 851-852. doi:10.1097/01.sla.0000098620.27623.7d.
47. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000;232(2):155-162.
48. Cockfield SM, Moore RB, Todd G, Solez K, Gourishankar S. The prognostic utility of deceased donor implantation biopsy in determining function and graft survival after kidney transplantation. *Transplantation.* 2010;89(5):559-566. doi:10.1097/TP.0b013e3181ca7e9b.
49. Couinaud C. The paracaval segments of the liver. *J Hep Bil Pancr Surg.* 1994;1(2):145-151. doi:10.1007/BF01222238.

50. Crowley H, Lewis WD, Gordon F, Jenkins R, Khettry U. Steatosis in donor and transplant liver biopsies. *Human Pathology*. 2000;31(10):1209-1213. doi:10.1053/hupa.2000.18473.
51. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auburger AP. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J*. 1999;13(2):253-261..
52. Dello SAWG, Reisinger KW, van Dam RM, Bemelmans MH, van Kuppevelt TH, van den Broek MA, Olde Damink SW, Poeze M, Buurman WA, Dejong CH. Total intermittent Pringle maneuver during liver resection can induce intestinal epithelial cell damage and endotoxemia. *PLoS ONE* 2012;7(1):e30539. doi:10.1371/journal.pone.0030539.
53. Denmark SW, Shaw BW Jr, Starzl TE, Griffith BP. VENO-VENOUS BYPASS WITHOUT SYSTEMIC ANTICOAGULATION IN CANINE AND HUMAN LIVER TRANSPLANTATION. *Surg Forum*. 1983;34:380-382.
54. Deutsche Stiftung Organtransplantation. DSO: Gesetzliche Grundlagen. Unter: <http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/gesetzliche-grundlagen.html>. Aufgerufen Februar 2014.
55. Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W. Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. Georg Thieme Verlag; 2005.
56. Doyle MBM, Vachharajani N, Wellen JR, Anderson CD, Lowell Jeffrey A, Shenoy S., Brunt EM, Chapman WC. Short- and long-term outcomes after steatotic liver transplantation. *Arch Surg* 2010;145(7):653-660. doi:10.1001/archsurg.2010.119.
57. Drebber PDU, Torbenson M, Wedemeyer I, Dienes HP. Aktuelle Aspekte zur Histopathologie im Rahmen der Lebertransplantation. *Pathologe*. 2011;32(2):113-123. doi:10.1007/s00292-010-1405-z.

58. Ducerf C, Mechet I, Landry JL, DeLaRoche E, Berthoux N, Bourdeix O, Adham M, Bizollon T, Baulieux J. Hemodynamic profiles during piggyback liver grafts using arterial or portal revascularization. *J. Am. Coll. Surg.* 2000;190(1):89-93.
59. Dunkelberg JC, Trotter JF, Wachs M, Bak T, Kugelmas M, Steinberg T, Everson GT, Kam I. Sirolimus as primary immunosuppression in liver transplantation is not associated with hepatic artery or wound complications. *Liver Transpl.* 2003;9(5):463-468. doi:10.1053/jlts.2003.50079.
60. Dutkowski P, De Rougemont O, Clavien PA. Alexis Carrel: Genius, Innovator and Ideologist. *American Journal of Transplantation.* 2008;8(10):1998-2003. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02364.x.
61. Eason JD, Nair S, Cohen AJ, Blazek JL, Loss GE Jr. Steroid-free liver transplantation using rabbit antithymocyte globulin and early tacrolimus monotherapy. *Transplantation.* 2003;75(8):1396-1399. doi:10.1097/01.TP.0000062834.30922.FE.
62. Eiseman B. The puzzle people: memoirs of a transplant surgeon. *Arch Surg.* 1992;127(9):1009-1011.
63. Emre S, Umman V. Split liver transplantation: an overview. *Transplant Proc.* 2011;43(3):884-887. doi:10.1016/j.transproceed.2011.02.036.
64. Eurotransplant. Statistik Jahr 2013- Eurotransplant. unter: https://www.google.ch/search?client=safari&rls=en&q=http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php%3Ffile%3Dyear_20131.pdf&ie=UTF-8&oe=UTF-8&gfe_rd=ctrl&ei=7QERU4a5OaXe8geFmICYAg&gws_rd=cr. Veröffentlicht August 2014.
65. Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, Sessa WC, Qin J, Zhang P, Su B, Jacinto E. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J* 2008;27(14):1932-1943. doi:10.1038/emboj.2008.120.

66. Fairbanks KD, Eustace JA, Fine D, Thuluvath PJ. Renal function improves in liver transplant recipients when switched from a calcineurin inhibitor to sirolimus. *Liver Transpl.* 2003;9(10):1079-1085. doi:10.1053/jlts.2003.50183.
67. Falasca L, Tisone G, Palmieri G, Anselmo A, Di Paolo D, Baiocchi L, Torri E, Orlando G, Casciani CU, Angelico M. Protective role of tauroursodeoxycholate during harvesting and cold storage of human liver: a pilot study in transplant recipients. *Transplantation* 2001;71(9):1268-1276.
68. Feng X-N, Xu X, Zheng S-S. Current status and perspective of liver preservation solutions. *HBPD INT.* 2006;5(4):490-494.
69. Franklin TJ, Cook JM. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem J.* 1969;113(3):515-524.
70. Freeman RB Jr, Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, Merion R, Wolfe R, Turcotte J, Teperman L; UNOS/OPTN Liver Disease Severity Score, UNOS/OPTN Liver and Intestine, and UNOS/OPTN Pediatric Transplantation Committees. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl.* 2002;8(9):851-858. doi:10.1053/jlts.2002.35927.
71. Futai M, Omote H, Sambongi Y, Wada Y. Synthase (H(+)) ATPase): coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1458(2-3):276-288.
72. Geissler EK, Schlitt HJ. Immunosuppression for liver transplantation. *Gut.* 2009;58(3):452-463. doi:10.1136/gut.2008.163527.
73. Goldaracena N, Quiñonez E, Méndez P, Anders M, Orozco Ganem F, Mastai R, McCormack L.. Extremely Marginal Liver Grafts From Deceased Donors Have Outcome Similar to Ideal Grafts. *Transplantation Proceedings* 2012;44(7):2219-2222. doi:10.1016/j.transproceed.2012.07.113.
74. Van Golen RF, Reiniers MJ, Olthof PB, van Gulik TM, Heger M. Sterile inflammation in hepatic ischemia/reperfusion injury: present concepts and

- potential therapeutics. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(3):394-400.
doi:10.1111/jgh.12072.
75. Grafiken — Deutsche Leberstiftung. unter: <http://www.deutsche-leberstiftung.de/aktuelles/presseportal/bilder/grafiken>. 2014.
76. De Groot H, Rauwen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplant Proc*. 2007;39(2):481-484.
doi:10.1016/j.transproceed.2006.12.012.
77. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koeh G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat. Med*. 2002;8(2):128-135. doi:10.1038/nm0202-128.
78. Haddad EM, McAlister VC, Renouf E, Malthaner R, Kjaer MS, Gluud LL. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006;(4):CD005161.
doi:10.1002/14651858.CD005161.pub2.
79. Henry SD, Metselaar HJ, Van Dijck J, Tilanus HW, Van Der Laan LJW. Impact of steroids on hepatitis C virus replication in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1110:439-447. doi:10.1196/annals.1423.046.
80. Hesse UJ, Berrevoet F, Troisi R, Pattyn P, Mortier E, Decruyenaere J, de Hemptinne B. Hepato-venous reconstruction in orthotopic liver transplantation with preservation of the recipients' inferior vena cava and veno-venous bypass. *Langenbecks Arch Surg* 2000;385(5):350-356.
81. Hiranuma S, Ito K, Noda Y, Ozasa H, Koike Y, Horikawa S. Amelioration of hepatic ischemia/reperfusion injury in the remnant liver after partial hepatectomy in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2007;22(12):2167-2172. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04779.x.

82. Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Lagman M, Shimbo T, Suthanthiran M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 1999;397(6719):530-534. doi:10.1038/17401.
83. Holzniekemper T. *Organspende und Transplantation und ihre Rezension in der Ethik der abrahamitischen Religionen*. LIT Verlag Münster; 2005.
84. Hsu Y-HR, Sis B. Molecular transplantation pathology: the interface between molecules and histopathology. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(3):354-362. doi:10.1097/MOT.0b013e3283614c90.
85. <http://www.bundesaerztekammer.de/downloads/RiliOrgaLeber20130308.pdf>: Bundesärztekammer - Richtlinien für die Wartelistenführung und Organvermittlung zur Lebertransplantation. 2013.
86. Hübscher SG, Adams DH, Buckels JA, McMaster P, Neuberger J, Elias E. Massive haemorrhagic necrosis of the liver after liver transplantation. *J Clin Pathol*. 1989;42(4):360-370.
87. Imber CJ, St Peter SD, Lopez I, Guiver L, Friend PJ. Current practice regarding the use of fatty livers: a trans-Atlantic survey. *Liver Transpl*. 2002;8(6):545-549. doi:10.1053/jlts.2002.31747.
88. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*. 2003;125(4):1246-1257. doi:10.1016/S0016-5085(03)01209-5.
89. Jaeschke H, Mitchell JR. Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;160(1):140-147.
90. Jung GE, Encke J, Schmidt J, Rahmel A. Model for end-stage liver disease. *Chirurg*. 2008;79(2):157-163. doi:10.1007/s00104-008-1463-4.
91. Kakizoe S, Yanaga K, Starzl TE, Demetris AJ. Frozen Section of Liver Biopsy for the Evaluation of Liver Allografts. *Transplant Proc*. 1990;22(2):416-417.

92. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2012;298:229-317. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7.
93. Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation.* 1979;28(1):47-50.
94. Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury. *Transplant Proc.* 2002;34(7):2659-2661.
95. Kashfi A, Mehrabi A, Pahlavan PS, Schemmer P, Gutt Cn, Friess H, Gebhard MM, Schmidt J, Büchler MW, Kraus TW. A review of various techniques of orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplant. Proc.* 2005;37(1):185-188. doi:10.1016/j.transproceed.2004.12.257.
96. Kawahara T, Asthana S, Kneteman NM. m-TOR inhibitors: what role in liver transplantation? *J Hepatol.* 2011;55(6):1441-1451. doi:10.1016/j.jhep.2011.06.015.
97. Kern H, Bald C, Brill T, Fend F, von Weiher CH, Kriner M, Hüser N, Thorban S, Stangl M, Matevossian E. The influence of retrograde reperfusion on the ischaemia-/reperfusion injury after liver transplantation in the rat. *Int J Exp Pathol* 2008;89(6):433-437. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00616.x.
98. Kim J-S, Nitta T, Mohuczy D, O'Malley KA, Moldawer LL, Dunn WA Jr, Behrns KE. Impaired autophagy: A mechanism of mitochondrial dysfunction in anoxic rat hepatocytes. *Hepatology* 2008;47(5):1725-1736. doi:10.1002/hep.22187.
99. Kniepeiss D, Zink M, Iberer F, et al. Influence of retrograde flushing via the caval vein on the post-reperfusion syndrome in liver transplantation. *Clinical Transplantation.* 2004;18(6):638-641. doi:10.1111/j.1399-0012.2004.00231.x.
100. Koehl GE, Andrassy J, Guba M, Richter S, Kroemer A, Scherer MN, Steinbauer M, Graeb C, Schlitt H, Jauch K-W, Geissler EK. Rapamycin protects allografts from rejection while simultaneously attacking tumors in immunosuppressed mice. *Transplantation* 2004;77(9):1319-1326.

101. Kogure K, Ishizaki M, Nemoto M, Kuwano H, Makuuchi M. A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *J Hep Bil Pancr Surg.* 1999;6(2):171-175. doi:10.1007/s005340050101.
102. Krukemeyer MG, Lison AE. *Transplantationsmedizin: ein Leitfadens für den Praktiker ; [36 Tabellen].* Walter de Gruyter; 2006.
103. Laborlexikon, Dr. med. Olav Hagemann, GOT >>Facharztwissen für alle!<<. unter: <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infotrame/g/GOT.htm>. Aufgerufen März 2014.
104. Laborlexikon: Dr. med. Olav Hagemann, GPT >>Facharztwissen für alle!<<. <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infotrame/g/GPT.htm>. Aufgerufen März 2014.
105. Laborlexikon: Dr. med. Olav Hagemann, Harnstoff >>Facharztwissen für alle!<<. <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infotrame/h/Harnstoff.htm>. aufgerufen März 2014.
106. Lam P, Yoshida A, Brown K, Abouljoud M, Bajjoka I, Dagher F, Moonka DK. The efficacy and limitations of sirolimus conversion in liver transplant patients who develop renal dysfunction on calcineurin inhibitors. *Dig. Dis. Sci.* 2004;49(6):1029-1035.
107. Land W, Abendroth D. *Cyclosporin in der Transplantationsmedizin.* Georg Thieme Verlag; 2001.
108. Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology.* 2000;32(2):169-173. doi:10.1053/jhep.2000.9323.
109. Levy G, Grazi GL, Sanjuan F, Wu Y, Mühlbacher F, Samuel D, Friman S, Jones R, Cantisani G, Villamil F, Cillo U, Clavien PA, Klintmalm G, Otto G, Pollard S, McCormick PA. 12-month follow-up analysis of a multicenter, randomized, prospective trial in de novo liver transplant recipients (LIS2T) comparing cyclosporine microemulsion (C2 monitoring) and tacrolimus. *Liver Transpl.* 2006;12(10):1464-1472. doi:10.1002/lt.20802.

110. Levy G, Villamil F, Samuel D, Sanjuan F, Grazi GL, Wu Y, Marotta P, Boillot O, Muehlbacher F, Klintmalm G; LIS2T Study Group. Results of lis2t, a multicenter, randomized study comparing cyclosporine microemulsion with C2 monitoring and tacrolimus with C0 monitoring in de novo liver transplantation. *Transplantation* 2004;77(11):1632-1638.
111. Liu CL, Fan ST, Lo CM, Chan SC, Ng IO, Lai CL, Wong J. Interleukin-2 receptor antibody (basiliximab) for immunosuppressive induction therapy after liver transplantation: a protocol with early elimination of steroids and reduction of tacrolimus dosage. *Liver Transpl.* 2004;10(6):728-733. doi:10.1002/lt.20144.
112. LMU München. Klinikleitfaden Lebertransplantation. Lebertransplantation. unter: http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Medizinische-Klinik-und-Poliklinik-II/download/inhalt/downloads/klinikleitfaden/kapitel_40_lebertransplan.pdf&ie=UTF-8&oe=UTF-8&gfe_rd=ctrl&ei=FAQRU9TkHYze8geTj4D4DQ&gws_rd=cr. Aufgerufen März 2014.
113. Loganathan S, Radovis T, Hirschberg K, Korkmaz S, Koch A, Crack M, Szabó G. Effects of Custodiol-N, a novel organ preservation solution, on ischemia/reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2010;139(4):1048-1056. doi:10.1016/j.jtcvs.2009.09.034.
114. Magellan™ - Data Analysis Software. unter: <http://www.tecan.com/platform/apps/product/index.asp?MenuID=1381&ID=943&Menu=1&Item=21.7.9>. Aufgerufen März 2014.
115. Magliocca JF, Knechtle SJ. The evolving role of alemtuzumab (Campath-1H) for immunosuppressive therapy in organ transplantation. *Transpl Int.* 2006;19(9):705-714. doi:10.1111/j.1432-2277.2006.00343.x.
116. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology.* 2000;31(4):864-871. doi:10.1053/he.2000.5852.
117. Mangus RS, Tector AJ, Agarwal A, Vianna R, Murdock P, Fridell JA. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution (HTK) and University

- of Wisconsin solution (UW) in adult liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2006;12(2):226-230. doi:10.1002/lt.20552.
118. Marroquin CE, Marino G, Kuo PC, Plotkin JS, Rustgi VK, Lu AD, Edwards E, Taranto S, Johnson LB. Transplantation of hepatitis C-positive livers in hepatitis C-positive patients is equivalent to transplanting hepatitis C-negative livers. *Liver Transpl*. 2001;7(9):762-768. doi:10.1053/jlts.2001.27088.
119. Marti J, Fuster J, Navasa M, Ferrer J, Rimola A, Pelegrina A, Fondevila C, Garcia-Valdecasas JC. Effects of graft quality on non-urgent liver retransplantation survival: should we avoid high-risk donors? *World J Surg* 2012;36(12):2914-2922. doi:10.1007/s00268-012-1757-z.
120. Martins PNA, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int*. 2007;27(3):384-392. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01414.x.
121. Massarollo PC, Mies S, Raia S. Simultaneous arterial and portal revascularization in liver transplantation. *Transplant Proc*. 1998;30(6):2883-2884.
122. Matevosjan E. *Graftprotektive Strategien Zur Prävention Der Akuten Abstossung Und Reduzierung Des Ischämie-/Reperfusionsschadens Nach Orthotoper Lebertransplantation Im Rattenmodell*; Universitätsbibliothek München, 2010.
123. Matevossian E, Doll D, Hüser N, Brauer R, Sinicina I, Nährig J, Friess H, Stangl M, Assfalg V. Liver transplantation in the rat: single-center experience with technique, long-term survival, and functional and histologic findings. *Transplant. Proc*. 2009;41(6):2631-2636. doi:10.1016/j.transproceed.2009.06.024.
124. Mazzaferro V, Rondinara GF, Rossi G, Regalia E, De Carlis L, Caccamo L, Doci R, Sansalone CV, Belli LS, Armiraglio E, et al.. Milan multicenter experience in liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Transplant. Proc*. 1994;26(6):3557-3560.

125. McAlister VC. Clinical kidney transplantation: a 50th anniversary review of the first reported series. *The American Journal of Surgery*. 2005;190(3):485-488. doi:10.1016/j.amjsurg.2005.04.016.
126. Melin C, Miick R, Young NA, Ortiz J, Balasubramanian M. Approach to intraoperative consultation for donor liver biopsies. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137(2):270-274. doi:10.5858/arpa.2011-0689-RA.
127. Mendes-Braz M, Elias-Miro M, Jimenez-Castro MB, Casillas-Ramirez A, Ramalho FS, Peralta C. The Current State of Knowledge of Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury Based on Its Study in Experimental Models. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/298657.
128. Merion RM, Howell T, Bromberg JS. Partial T-cell activation and anergy induction by polyclonal antithymocyte globulin. *Transplantation*. 1998;65(11):1481-1489.
129. Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Renal homotransplantation in identical twins. 1955. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(1):201-204.
130. Natori S, Fujii Y, Kurosawa H, Nakano A, Shimada H. Prostaglandin E1 protects against ischemia-reperfusion injury of the liver by inhibition of neutrophil adherence to endothelial cells. *Transplantation*. 1997;64(11):1514-1520.
131. Navarro F, Le Moine MC, Fabre JM, Belghiti J, Cherqui D, Adam R, Pruvot FR, Letoublon C, Domergue J. Specific vascular complications of orthotopic liver transplantation with preservation of the retrohepatic vena cava: review of 1361 cases. *Transplantation* 1999;68(5):646-650.
132. Neff RT, Hurst FP, Falta EM, Bohlen EM, Lentine KL, Dharnidharka VR, Agodoa LY, Jindal RM, Yuan CM, Abbott KC. Progressive multifocal leukoencephalopathy and use of mycophenolate mofetil after kidney transplantation. *Transplantation* 2008;86(10):1474-1478. doi:10.1097/TP.0b013e31818b62c8

133. Neil DAH, Hübscher SG. Current views on rejection pathology in liver transplantation. *Transpl Int.* 2010;23(10):971-983. doi:10.1111/j.1432-2277.2010.01143.x.
134. Neuhaus P. Live donor/split liver grafts for adult recipients: when should we use them? *Liver Transpl.* 2005;(11 Suppl 2):S6-9. doi:10.1002/lt.20604.
135. Nishida S, Nakamura N, Vaidya A, Levi DM, Kato T, Nery JR, Madariaga JR, Molina E, Ruiz P, Gyamfi A, Tzakis AG. Piggyback technique in adult orthotopic liver transplantation: an analysis of 1067 liver transplants at a single center. *HPB (Oxford)* 2006;8(3):182-188. doi:10.1080/13651820500542135.
136. Noun R, Sauvanet A, Belghiti J. Appraisal of the order of revascularization in human liver grafting: a controlled study. *J Am Coll Surg.* 1997;185(1):70-73.
137. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, Arndorfer J, Christensen L, Merion RM. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N. Engl. J. Med.* 2003;349(10):931-940. doi:10.1056/NEJMoa021744.
138. Olschewski P, Hunold G, Eipel C, Neumann U, Schöning W, Schmitz V, Vollmar B, Neuhaus P, Puhl G. Improved microcirculation by low-viscosity histidine- tryptophan-ketoglutarate graft flush and subsequent cold storage in University of Wisconsin solution: results of an orthotopic rat liver transplantation model. *Transpl. Int.* 2008;21(12):1175-1180. doi:10.1111/j.1432-2277.2008.00741.x.
139. Olthoff KM, Brown RS Jr, Delmonico FL, Freeman RB, McDiarmid SV, Merion RM, Millis JM, Roberts JP, Shaked A, Wiesner RH, Lucey MR. Summary report of a national conference: Evolving concepts in liver allocation in the MELD and PELD era. December 8, 2003, Washington, DC, USA. *Liver Transpl.* 2004;10(10 Suppl 2):A6-22. doi:10.1002/lt.20247.
140. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care.* 2001;7(6):384-389.

141. Orlando G, Soker S, Stratta RJ, Atala A. Will Regenerative Medicine Replace Transplantation? *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(8):a015693. doi:10.1101/cshperspect.a015693.
142. Ormonde DG, de Boer WB, Kierath A, Bell R, Shilkin KB, House AK, Jeffrey GP, Reed WD Banff schema for grading liver allograft rejection: Utility in clinical practice. *Liver Transplantation and Surgery* 1999;5(4):261–268. doi:10.1002/lt.500050418.
143. Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, Tsoulfas G. Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury and Trauma: Current Concepts. *Arch Trauma Res.* 2013;2(2):63-70. doi:10.5812/at.12501.
144. Pascual J, Bloom D, Torrealba J, Brahmhatt R, Chang Z, Sollinger HW, Knechtle SJ. Calcineurin inhibitor withdrawal after renal transplantation with alemtuzumab: clinical outcomes and effect on T-regulatory cells. *Am. J. Transplant.* 2008;8(7):1529-1536. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02260.x.
145. Penko ME, Tirbaso D. An overview of liver transplantation. *AACN Clin Issues.* 1999;10(2):176-184.
146. Pichlmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H. [Transplantation of a donor liver to 2 recipients (splitting transplantation)--a new method in the further development of segmental liver transplantation]. *Langenbecks Arch Chir.* 1988;373(2):127-130.
147. Pillai AA, Levitsky J. Overview of immunosuppression in liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2009;15(34):4225-4233.
148. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation* 1993;55(4):807-813.
149. Post S, Palma P, Gonzalez AP, Rentsch M, Menger MD. Timing of arterialization in liver transplantation. *Ann Surg.* 1994;220(5):691-698.

150. Pratschke S, Loehe F, Graeb C, Jauch KW, Angele MK. [Usage of marginal organs for liver transplantation: a way around the critical organ shortage?]. *Zentralbl Chir.* 2009;134(2):107-112. doi:10.1055/s-0028-1098880.
151. Puhl G, Tullius S, Settmacher U, Neuhaus P. Die Protektion der Leber vor Schädigung durch Ischämie/Reperfusion- therapeutische Ansätze und klinische Erfahrungen, *TransplantLinc* 2005;(10):59.
152. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2011. Unter <http://www.R-project.org>.
153. Ramirez CB, Doria C, di Francesco F, Iaria M, Kang Y, Marino IR. Anti-IL2 induction in liver transplantation with 93% rejection-free patient and graft survival at 18 months. *J Surg Res.* 2007;138(2):198-204. doi:10.1016/j.jss.2006.08.025.
154. Reddy KS, Johnston TD, Putnam LA, Isley M, Ranjan D. Piggyback technique and selective use of veno-venous bypass in adult orthotopic liver transplantation. *Clin Transplant.* 2000;14(4 Pt 2):370-374.
155. Richardson AJ, Higgins RM, Liddington M, Murie J, Ting A, Morris PJ. Antithymocyte globulin for steroid resistant rejection in renal transplant recipients immunosuppressed with triple therapy. *Transpl Int.* 1989;2(1):27-32.
156. Richmond C. Jean Dausset. *The Lancet.* 2009;374(9698):1324. doi:10.1016/S0140-6736(09)61813-4.
157. Ringe B, Braun F, Moritz M, Zeldin G, Soriano H, Meyers W. Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution. *Transplant Proc.* 2005;37(1):316-319. doi:10.1016/j.transproceed.2004.12.009.
158. Rogiers X, Malagó M, Gawad K, Jauch KW, Olausson M, Knoefel WT, Gundlach M, Bassas A, Fischer L, Sterneck M, Burdelski M, Broelsch CE. In situ splitting of cadaveric livers. The ultimate expansion of a limited donor pool. *Ann. Surg.* 1996;224(3):331-339; discussion 339-341.

159. Salizzoni M, Franchello A, Zamboni F, Ricchiuti A, Cocchis D, Fop F, Brunati A, Cerutti E. Marginal grafts: finding the correct treatment for fatty livers. *Transpl. Int.* 2003;16(7):486-493. doi:10.1007/s00147-003-0572-8.
160. Sanches SC, Ramalho LN, Mendes-Braz M, Terra VA, Cecchini R, Augusto MJ, Ramalho FS. Riboflavin (vitamin B-2) reduces hepatocellular injury following liver ischaemia and reperfusion in mice. *Food and Chemical Toxicology* 2014;67:65-71. doi:10.1016/j.fct.2014.02.013.
161. Sankary HN, McChesney L, Frye E, Cohn S, Foster P, Williams J. A simple modification in operative technique can reduce the incidence of nonanastomotic biliary strictures after orthotopic liver transplantation. *Hepatology.* 1995;21(1):63-69.
162. Sass DA, Reich DJ. Liver Transplantation in the 21st Century: Expanding the Donor Options. *Gastroenterology Clinics of North America.* 2011;40(3):641-658. doi:10.1016/j.gtc.2011.06.007.
163. Sawada S, Suzuki G, Kawase Y, Takaku F. Novel immunosuppressive agent, FK506. In vitro effects on the cloned T cell activation. *J Immunol.* 1987;139(6):1797-1803.
164. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann. Surg.* 2004;239(2):220-231. doi:10.1097/01.sla.0000110321.64275.95.
165. Schemmer P, Enomoto N, Bradford BU, Bunzendahl H, Raleigh JA, Lemasters JJ, Thurman RG. Activated Kupffer cells cause a hypermetabolic state after gentle in situ manipulation of liver in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2001;280(6):G1076-1082.
166. Schlitt H, Loss M, Scherer M, Becker T, Jauch KW, Nashan B, Schmidt H, Settmacher U, Rogiers X, Neuhaus P, Strassburg C. Aktuelle Entwicklungen der Lebertransplantation in Deutschland: MELD-basierte Organallokation und „incentives“ für Transplantationszentren. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2011;49(01):30-38. doi:10.1055/s-0029-1245946.

167. Schlitt HJ, Barkmann A, Böker KH, Schmidt HH, Emmanouilidis N, Rosenau J, Bahr MJ, Tusch G, Manns MP, Nashan B, Klempnauer J. Replacement of calcineurin inhibitors with mycophenolate mofetil in liver-transplant patients with renal dysfunction: a randomised controlled study. *Lancet* 2001;357(9256):587-591.
168. Selzner M, Rüdiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology*. 2000;32(6):1280-1288. doi:10.1053/jhep.2000.20528.
169. Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF-alpha/IL-6-dependent mechanism. *Hepatology*. 2002;36(4 Pt 1):812-818. doi:10.1053/jhep.2002.35535.
170. Shaked A, Ghobrial RM, Merion RM, Shearon TH, Emond JC, Fair JH, Fisher RA, Kulik LM, Pruett TL, Terrault NA; A2ALL Study Group. Incidence and severity of acute cellular rejection in recipients undergoing adult living donor or deceased donor liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2009;9(2):301-308. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02487.x.
171. Shaw BW Jr, Martin DJ, Marquez JM, Kang YG, Bugbee AC Jr, Iwatsuki S, Griffith BP, Hardesty RL, Bahnson HT, Starzl TE. Venous bypass in clinical liver transplantation. *Ann. Surg.* 1984;200(4):524-534.
172. Smak Gregoor PJH, van Gelder T, van Riemsdijk-van Overbeeke IC, Vossen ACTM, IJzermans JNM, Weimar W. Unusual presentation of herpes virus infections in renal transplant recipients exposed to high mycophenolic acid plasma concentrations. *Transpl Infect Dis.* 2003;5(2):79-83.
173. Sollinger HW. Mycophenolates in transplantation. *Clin Transplant.* 2004;18(5):485-492. doi:10.1111/j.1399-0012.2004.00203.x.
174. Sprague LD, Beregov V, Von Sternbach G, Brischwein M, Otto AM, Adam M, Wolf B, Molls M. Multiparametric sensor-chip based technology for monitoring metabolic activity: A proof-of-principle study with live tissue. *Clin. Lab.* 2006;52(7-8):375-384.

175. SpringerImages - Akute zelluläre Abstoßung nach Lebertransplantation. Unte: http://www.springerimages.com/Images/MedicineAndPublicHealth/1-10.1007_s00292-010-1405-z-0. Aufgerufen Februar 2014.
176. St. Peter SD, Post DJ, Rodriguez-Davalos MI, Douglas DD, Moss AA, Mulligan DC. Tacrolimus as a liver flush solution to ameliorate the effects of ischemia/reperfusion injury following liver transplantation. *Liver Transplantation*. 2003;9(2):144-149. doi:10.1053/jlts.2003.50018.
177. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, Blanchard H, Martin AJ Jr, Porter KA. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann. Surg.* 1968;168(3):392-415.
178. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, Schade RR, Shaw BW Jr, Hakala TR, Rosenthal JT, Porter KA. Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 1982;2(5):614-636.
179. Starzl TE. PETER BRIAN MEDAWAR. *J Am Coll Surg.* 1995;180(3):332-336.
180. Steffen R, Ferguson DM, Krom RA. A new method for orthotopic rat liver transplantation with arterial cuff anastomosis to the recipient common hepatic artery. *Transplantation*. 1989;48(1):166-168.
181. Steurer W. Hepatitis & More - 2007/2 - Immunsuppression nach Lebertransplantation. Unter: http://www.hepatitisandmore.de/archiv/2007-2/fobi_steurer.shtml. Aufgerufen März 2014.
182. Stewart SF, Hudson M, Talbot D, Manas D, Day CP. Mycophenolate mofetil monotherapy in liver transplantation. *Lancet*. 2001;357(9256):609-610.
183. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology*. 1994;20(4 Pt 1):829-838.
184. Strassburg CP. Indikationsstellung und Indikationen für eine Lebertransplantation. *Der Chirurg*. 2013;84(5):363-371. doi:10.1007/s00104-012-2418-3.

185. Sudo K, Yamada Y, Saito K, Shimizu S, Ohashi H, Kato T, Moriwaki H, Ito H, Seishima M. TNF- α and IL-6 signals from the bone marrow derived cells are necessary for normal murine liver regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 2008;1782(11):671-679. doi:10.1016/j.bbadis.2008.09.010.
186. Taki-Eldin A, Zhou L, Xie H-Y, Zheng S-S. Liver regeneration after liver transplantation. *Eur Surg Res.* 2012;48(3):139-153. doi:10.1159/000337865.
187. Tanaka K, Ogura Y. "Small-for-size graft" and "small-for-size syndrome" in living donor liver transplantation. *Yonsei Med J.* 2004;45(6):1089-1094.
188. Taniguchi Y, Frickhofen N, Raghavachar A, Digel W, Heimpel H. Antilymphocyte immunoglobulins stimulate peripheral blood lymphocytes to proliferate and release lymphokines. *Eur J Haematol.* 1990;44(4):244-251.
189. Taylor AL, Watson CJE, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;56(1):23-46. doi:10.1016/j.critrevonc.2005.03.012.
190. Theruvath TP, Snoddy MC, Zhong Z, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in liver ischemia and reperfusion: role of c-Jun N-terminal kinase 2. *Transplantation.* 2008;85(10):1500-1504. doi:10.1097/TP.0b013e31816fefb5.
191. Todo S, Furukawa H, Japanese Study Group on Organ Transplantation. Living donor liver transplantation for adult patients with hepatocellular carcinoma: experience in Japan. *Ann Surg.* 2004;240(3):451-459; discussion 459-461.
192. Turner AP, Knechtle SJ. Induction immunosuppression in liver transplantation: a review. *Transpl Int.* May 2013. doi:10.1111/tri.12100.
193. Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Ann Surg.* 1989;210(5):649-652.
194. Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Ann Surg.* 1989;210(5):649-652.

195. Urata K, Kawasaki S, Matsunami H, Hashikura Y, Ikegami T, Ishizone S, Momose Y, Komiyama A, Makuuchi M. Calculation of child and adult standard liver volume for liver transplantation. *Hepatology* 1995;21(5):1317-1321.
196. Velidedeoglu E, Desai NM, Campos L, Olthoff KM, Shaked A, Nunes F, Zeldin G, Stewart C, Blumberg E, Abrams J, Markmann JF. The outcome of liver grafts procured from hepatitis C-positive donors. *Transplantation* 2002;73(4):582-587.
197. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blanche G, Lang P, Grinyo J, Halloran PF, Solez K, Hagerty D, Levy E, Zhou W, Natarajan K, Charpentier B; Belatacept Study Group. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2005;353(8):770-781. doi:10.1056/NEJMoa050085.
198. Vivarelli M, Burra P, La Barba G, Canova D, Senzolo M, Cucchetti A, D'Errico A, Guido M, Merenda R, Neri D, Zanella M, Giannini FM, Grazi GL, Cillo U, Pinna AD. Influence of steroids on HCV recurrence after liver transplantation: A prospective study. *J. Hepatol.* 2007;47(6):793-798. doi:10.1016/j.jhep.2007.07.023.
199. Wagener G, Raffel B, Young AT, Minhaz M, Emond J. Predicting early allograft failure and mortality after liver transplantation: the role of the postoperative model for end-stage liver disease score. *Liver Transpl.* 2013;19(5):534-542. doi:10.1002/lt.23634.
200. Washburn K, Halff G, Mieles L, Goldstein R, Goss JA. Split-liver transplantation: results of statewide usage of the right trisegmental graft. *Am J Transplant.* 2005;5(7):1652-1659. doi:10.1111/j.1600-6143.2005.00933.x.
201. Washburn K. Model for End Stage Liver Disease and hepatocellular carcinoma: a moving target. *Transplant Rev (Orlando).* 2010;24(1):11-17. doi:10.1016/j.trre.2009.10.002.
202. Watson CJ, Friend PJ, Jamieson NV, et al. Sirolimus: a potent new immunosuppressant for liver transplantation. *Transplantation.* 1999;67(4):505-509.

203. Weber J, Senior AE. ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Lett.* 2003;545(1):61-70.
204. Weber J, Senior AE. Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* 1997;1319(1):19-58. doi:10.1016/S0005-2728(96)00121-1.
205. Weinberg JM, Venkatachalam MA, Garzo-Quintero R, Roeser NF, Davis JA. Structural requirements for protection by small amino acids against hypoxic injury in kidney proximal tubules. *FASEB J.* 1990;4(15):3347-3354.
206. Wight DG. Aspects of liver transplant pathology with emphasis on rejection and its mechanisms. *J Clin Pathol.* 1994;47(4):296-299.
207. Workgroup on expanded criteria organs for liver transplantation. *Liver Transplantation.* 2005;11(10):1184-1192. doi:10.1002/lt.20569.
208. Yadav SS, Howell DN, Steeber DA, Harland RC, Tedder TF, Clavien PA. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology.* 1999;29(5):1494-1502. doi:10.1002/hep.510290505.
209. Yang H, Zhu Y, Liu Q, Zhou R, Zhao G, Lü Y. [The impact of ischemic postconditioning on the tumor necrosis factor- α /IL-6/signal transducers and activators of transcription-3 signal pathway of liver regeneration]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* 2012;50(10):909-913.
210. Yantorno SE, Kremers WK, Ruf AE, Trentadue JJ, Podestá LG, Villamil FG. MELD is superior to King's college and Clichy's criteria to assess prognosis in fulminant hepatic failure. *Liver Transpl.* 2007;13(6):822-828. doi:10.1002/lt.21104.
211. Zamboni F, Franchello A, David E, Rocca G, Ricchiuti A, Lavezzo B, Rizzetto M, Salizzoni M. Effect of macrovesicular steatosis and other donor and recipient characteristics on the outcome of liver transplantation. *Clin Transplant* 2001;15(1):53-57.

212. Zarrinpar A, Busuttil RW. Immunomodulating options for liver transplant patients. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012;8(6):565-578; quiz 578. doi:10.1586/eci.12.47.

8. Danksagungen

Ich möchte mich vor allem bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. E. Matevossian für die Ermöglichung dieser Arbeit bedanken. Ich danke ihm für seine kontinuierliche Unterstützung, seine Geduld und Weitergabe seines Wissens, insbesondere der chirurgischen Fertigkeiten. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die positive Atmosphäre während der gesamten Arbeitsphase.

Außerdem möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. A. Otto und Herrn J. Hintermair für die freundliche Unterstützung bei den Labor-Auswertungen und Bereitsstellung der experimentellen Räume am IMETUM bedanken. Für die histologische Bearbeitung und Hilfestellung bei der histopathologischen Auswertung gilt mein Dank Herrn Dr. med. G. Babaryka. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. T. Schuster für die statistische Auswertung bedanken.

Im Allgemeinen möchte ich ein herzliches Dankeschön an die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des IMETUMs und des Zentrums für präklinische Forschung der TU München aussprechen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Frau A. Eggerdinger, ohne deren Hilfe die Versuchsreihen sowie die Organisation erheblich erschwert gewesen wären. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit im OP!

Auch Herrn A. Schuster möchte ich für die gemeinsame Arbeit und Vermittlung seiner chirurgischen Fertigkeiten danken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. med. C. Bald, Herrn Dr. med. H. Kern, Herrn P. Heiler für ihre Unterstützung und wertvolle Ratschläge bedanken.

Tiefe Dankbarkeit gilt meinen Eltern und meiner Familie, für die Ermöglichung meines Studiums der Humanmedizin sowie dieser Promotion. Einen besonderen Dank gilt dabei auch Frau K. Seitz und Frau N. Reichle für die stilistische Korrektur meiner Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Herrn T. Kremer für seine Geduld und unermüdliche Unterstützung bedanken!