



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Die Rolle des Ischämie-/Reperfusionsschadens (I/R) bei der
akuten Abstoßung nach allogener Lebertransplantation im
orthotopen Rattenmodell**

Agnes Katharina Eggerdinger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades einer
Doktorin der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation

1. Priv.-Doz. Dr. Edouard Matevossian

2. Prof. Dr. Bernhard Holzmann

Diese Dissertation wurde am 18.02.2021 bei der Technischen Universität eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 10.11.2021 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Allgemeiner Teil	4
1.1 Einführung	4
1.2 Die Lebertransplantation	5
1.2.1 Indikationen zur Lebertransplantation	5
1.2.2 Transplantationstechniken	9
1.2.3 Komplikationen nach Lebertransplantation	10
1.3 Die Pathophysiologie des Ischämie-/ Reperfusionsschadens	13
1.3.1 Ischämie	13
1.3.2 Konservierung	15
1.3.3 Reperfusion	16
1.4 Abstoßungsreaktion	19
1.4.1 Histokompatibilität / Antigenpräsentation	19
1.4.2 CD4+ / CD8+ T-Zellen und T-Zell-Rezeptor	20
1.4.3 T-Zell-Aktivierung und Interleukin-2-Rezeptor- α (CD25)	21
1.4.4 Zelluläre Rejektion / Humorale Rejektion	22
1.4.5 Apoptose / Nekrose	22
1.4.6 Klassifikation der Abstoßungsreaktion	24
1.4.6.1 Hyperakute Abstoßung	24
1.4.6.2 Akute Abstoßung	25
1.4.6.3 Chronische Abstoßung	27
1.5 Immunsuppressiva bei akuter Abstoßung	29
1.6 Die Lebertransplantation im Rattenmodell	30
1.6.1 Die Morphologie der Rattenleber	30
1.6.1.1 Makroskopische Anatomie	30
1.6.1.2 Lobierung	33
1.6.1.3 Gefäßversorgung	34
1.6.1.4 Ligamente	36
1.6.1.5 Gallengang und Gallenblase	36
1.6.2 Mikroskopische Anatomie	37
1.6.2.1 Leberläppchen	38
1.6.2.2 Portalvenenläppchen	40
1.6.2.3 Leberazinus	41
1.6.2.4 Das Gallengangssystem	42
1.6.3 Der zelluläre Aufbau der Leber	42
1.6.3.1 Hepatozyten	42
1.6.3.2 V.-Kupfferzellen	43

1.6.3.3	Ito-Zellen	44
1.6.3.4	Pit-Zellen	44
1.6.4	Technik der orthotopen Rattenlebertransplantation	45
1.7	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	48
2	Material und Methode	48
2.1	Genehmigung der Tierversuche	48
2.2	Versuchstiere	49
2.3	Versuchsgruppen	49
2.4	Chirurgisches Vorgehen	49
2.4.1	Vorbereitung und Anästhesie:	49
2.4.2	Spenderoperation	52
2.4.3	Perfusion	54
2.4.4	Empfängeroperation	56
2.4.5	Transplantation	57
2.4.5.1	Anastomose der suprahepatischen V. cava inferior	57
2.4.5.2	Anastomose der V. portae und infrahepatischen V. cava inferior	58
2.4.5.3	Anastomosierung der arteriellen Versorgung	59
2.4.5.4	Rekonstruktion des Gallengangs	59
2.5	Untersuchungsmethoden	60
2.5.1	Laborparameter	60
2.5.2	Konventionelle Histologie	61
2.5.3	Immunhistochemie	61
3	Ergebnisse	62
3.1	Auswertung der Laborparameter	62
3.1.1	Transaminasen	62
3.1.2	Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ -GT)	64
3.1.3	Lactatdehydrogenase (LDH)	65
3.2	Auswertung der konventionellen Histologie	65
3.3	Immunhistochemische Auswertung	67
4	Diskussion	70
4.1	Die Laborratte als Versuchstier	70
4.2	Interpretation der Ergebnisse	71
4.3	Klinische Relevanz	79
4.4	Eigene Anmerkungen zur durchgeführten Studie	84
4.5	Anmerkungen zur Transplantationsmedizin	85
5	Zusammenfassung	87

6	Literaturverzeichnis	89
7	Abbildungsverzeichnis	103
8	Tabellenverzeichnis	103
9	Abkürzungen	104
10	Danksagung	106

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einführung

Die Lebertransplantation (LTx) stellt heutzutage ein klinisch etabliertes Verfahren zur Therapie von zahlreichen irreversiblen Lebererkrankungen im Endstadium dar.

Diese Therapieoption ist jedoch limitiert durch den Mangel an Spenderorganen: Im Jahr 2019 wurden 1536 Lebertransplantationen im Eurotransplantraum (ET) durchgeführt. Dem steht die Anzahl von 2235 Neu-Registrierungen auf der Warteliste (nur Leber) gegenüber, so dass am Ende des Jahres 2019 noch immer 1417 Patienten auf der Warteliste für eine Lebertransplantation gemeldet waren. Im Jahr 2019 sind 389 Patienten verstorben, während sie auf der Warteliste registriert waren, aber kein Organ erhalten konnten (Eurotransplant 2020).

Aufgrund dieser Organknappheit und der Tatsache, dass manche Lebererkrankungen abhängig von der Entität foudroyant verlaufen, ist man in der Transplantationsmedizin bei vitaler Indikation häufig auf Organangebote mit erweiterten Spenderkriterien, sogenannte marginale Organe zur Bridging-Therapie – also zur Überbrückung bis der Patient mit einem guten Organ endgültig versorgt werden kann - aber auch als definitive Lösung, angewiesen. Zu marginalen Organen zählen Organe mit relativen morphologischen Defiziten (z.B. hohes Spenderalter, Steatosis hepatis, Z.n. kardiopulmonaler Reanimation), aber auch die prolongierte kalte Ischämiezeit führt zur Einteilung eines Organs als marginal und ist relevant bei der Organakzeptanz bezüglich der Transplantabilität.

Die prolongierte kalte Ischämiezeit korreliert bekanntermaßen mit dem Schweregrad und der Häufigkeit der akuten Transplantatabstoßungsreaktion nach LTx. Diese gefährdet wiederum das Outcome des Transplantierten zusätzlich, da die Morbidität durch den erhöhten Einsatz von Immunsuppressiva, die Wahrscheinlichkeit einer Re-Transplantation bei therapierefraktärer Abstoßung und die Mortalität des ohnehin meist komorbiden Empfängers steigen (Post, Douglas et al. 2005, Sanchez-Fueyo 2013).

Die akute Abstoßung nach Lebertransplantation stellt mit einer Inzidenz von 30-70%

trotz adäquater Immunsuppression immer noch ein relevantes klinisches Problem dar (Neuberger 1999). Zwar gibt es Studien mit extrakorporalen Hepatozytensystemen zur Überbrückung von Phasen mit eingeschränkter Transplantatfunktion, die vielversprechend erscheinen, ob aber damit ein „Bridging“ wie z.B. beim Kunstherz realisiert werden kann, müssen weitere Untersuchungen noch zeigen (Demetriou, Whiting et al. 1986, Nose 1989) (Nevens and Laleman 2012, Vaid, Chweich et al. 2012). Das Vermeiden der akuten Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantation ist somit noch immer von großer klinischer Bedeutung.

Daher war es zum einen das Ziel dieser experimentellen Studie im allogenen Rattenmodell der orthotopen Lebertransplantation herauszufinden, welche Art der Immunmodulation in der frühen Phase nach Organreperfusion stattfindet, und zum anderen die Rolle des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei der Ausbildung dieser rejektiven Immunmodulation zu charakterisieren.

1.2 Die Lebertransplantation

Mittlerweile hat sich die Lebertransplantation (LTx) als Standardverfahren zur Therapie von Lebererkrankungen im Endstadium etabliert (Starzl T. E. 1989). Während 1985 in Deutschland lediglich 58 Lebertransplantationen durchgeführt wurden, stieg die Anzahl im Jahre 2005 bereits auf 885 Lebertransplantationen. Heute beträgt die 1-Jahres-Überlebensrate nach Lebertransplantation weit über 80% und die 5-Jahres-Überlebensrate über 70% (Benckert, Jonas et al. 2005, Hashimoto, Sugawara et al. 2005).

1.2.1 Indikationen zur Lebertransplantation

Immer wenn bei einem Patienten eine akute oder chronische Lebererkrankung trotz Ausschöpfung aller konservativen Behandlungsoptionen progredient verläuft, ist eine Lebertransplantation zu erwägen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über verschiedene Indikationen für eine LTx.

Tabelle 1: Übersicht Indikationen zur Lebertransplantation

Leberparenchymerkrankungen

- Posthepatisch (Hepatitis B, C, D)
- Autoimmun
- Alkoholisch (nutritiv-toxisch)
- Idiopathisch (kryptogen)

Cholestatische Lebererkrankungen

- Primär biliäre Zirrhose (PBC)
- Sekundär biliäre Zirrhose
- Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)
- Sekundär sklerosierende Cholangitis (SSC)
- Extrahepatische Gallengangsatresie
- Progressive intrahepatische Cholestase (Morbus Byler)
- Alagille-Syndrom
- Kongenitale Fibrosen
- Graft-versus-Host-Disease (GvHD)
- Chronische Abstoßung
- Cholestatisch verlaufende Sarkoidose
- Medikamentös-toxische Cholestase
- Caroli-Syndrom

Vaskuläre Erkrankungen

- Fulminante Virushepatitis (A, B, C, D)
- Intoxikationen
 - Amanita phalloides (Knollenblätterpilz)
 - Paracetamol (Acetaminophen)
 - Halothan

- Tetrachlorkohlenstoff
- Ecstasy u.a.
- Akute Schwangerschaftsfettleber
- HELLP-Syndrom
- Budd Chiari Syndrom (thrombotischer Verschluss der Lebervenen)
- Primäre Nichtfunktion (frühes Transplantatversagen nach Ltx z.B. durch Leberarterienthrombose)

Primäre Stoffwechselerkrankungen

- α 1-Antitrypsinmangel
- Morbus Wilson
- Hämochromatose
- Tyrosinämie
- Galaktosämie
- Glykogen-Speicherkrankheiten
- Lysosomale Speicherkrankheiten
- Crigler-Najjar-Syndrom Typ 1
- Primäre Hyperoxalurie Typ 1
- Erythropoetische Protoporphyrurie
- Primäre Blutungsstörungen (ggf. mit Budd Chiari Syndrom)
- Störungen des Harnstoffzyklus (z.B. mit Citrullinämie)
- Familiäre Amyloidose

Sekundäre Stoffwechselerkrankungen

- Kurzdarmsyndrom

Maligne Erkrankungen

- Hepatozelluläres Karzinom (HCC) in Zirrhose innerhalb der Mailand-Kriterien

(ein Knoten mit einem max. Durchmesser von 5cm oder max. 3 Knoten, von denen der größte Knoten max. 3cm misst, keine Lymphknotenmetastasen, keine Gefäßinvasion, keine Fernmetastasen (Mazzaferro, Regalia et al. 1996)

- Lebermetastasen Neuroendokriner Tumore (strenge Indikationsstellung)
- Hepatoblastom (bei Kindern)
- Cholangiozelluläres Karzinom
- Selten: multiple, nicht resektable Leberadenome, Hämangioendotheliome

Andere Ursachen

- Leberzysten
- Lebertrauma Grad V - VI

Die Krankheitsbilder, die 2012 die häufigsten Indikationen für eine Lebertransplantation darstellten, sind in Abbildung 1 aufgeführt:

2012 DEUTSCHLAND		
Indikationen für eine Lebertransplantation		
DIE HÄUFIGSTEN ICD-10 HAUPTDIAGNOSEN (BEI NEUANMELDUNG) n=1.689		
K70	Alkoholische Leberkrankheit	489
K74	Fibrose und Zirrhose der Leber	443
C22	Bösartige Neubildung der Leber und der intrahepatischen Gallengänge	294
K72	Leberversagen, anderenorts nicht klassifiziert	134
K83	Sonstige Krankheiten der Gallenwege	124
Q44	Angeborene Fehlbildungen der Gallenblase, der Gallengänge u. der Leber	92
E83	Störungen des Mineralstoffwechsels	25
K76	Sonstige Krankheiten der Leber	22
E88	Sonstige Stoffwechselstörungen	20
I82	Sonstige venöse Embolie und Thrombose	15
		1.658
Bei einem Patienten sind mehrere Diagnosen möglich. Insgesamt: 19 Hauptdiagnosen bei 1.689		
Quelle: Eurotransplant		DSO 98

Abb. 1: Indikationen für eine Lebertransplantation. Quelle:DSO / Eurotransplant

Die folgende Tabelle 2 zeigt eine Aufstellung der vergangenen Jahre wie viele Lebertransplantationen je nach Grunderkrankung durchgeführt wurden.

Tabelle 2: Lebertransplantationen je Grunderkrankung. Quelle: Eurotransplant

Liver transplants (deceased donor) in All ET, by year, by primary disease										
Primary disease	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Acute Hepatic failure	178	159	144	144	144	154	147	150	144	164
Benign Liver Tumor	41	56	61	50	51	36	52	55	63	51
Biliary Atresia	40	28	31	38	35	23	28	29	30	39
Cholestatic Liver Disease/Cirrhosis	165	167	219	191	214	228	217	223	271	241
Malignant neoplasms	364	373	359	316	338	332	358	373	398	370
Metabolic diseases	93	96	90	71	76	96	82	63	99	72
Non-cholestatic cirrhosis	838	809	721	692	717	687	652	596	617	570
Other	74	81	64	60	71	82	74	73	70	64
Total	1793	1769	1689	1562	1646	1638	1610	1562	1692	1571

statistics.eurotransplant.org : 2417P_All ET_liver : 05.10.2020

Die Dringlichkeit einer Lebertransplantation wird mit dem *MELD-Score* („model for endstage liver disease“) erfasst, der 1998 vom *US Department of Health and Human Services* festgelegt wurde und seither den bis dahin gültigen *Child-Turcotte-Pugh-Score* ablöste. (Wiesner, McDiarmid et al. 2001)

1.2.2 Transplantationstechniken

Orthotope Lebertransplantation

Aktuell stellt die orthotope Transplantation der Leber eines hirntoten Spenders die Standardmethode dar. Hier wird dem kranken Patienten die eigene Leber entfernt und das Spenderorgan an gleicher Stelle implantiert.

Es erfolgt die End-zu-End-Anastomosierung der infrahepatischen und suprahepatischen *Vena cava inferior*, die Anastomosierung des *Truncus coeliacus* des Spenders auf die *Arteria hepatica communis* des Empfängers, die End-zu-End-Anastomosierung der Pfortader und schließlich die End-zu-Seit-Anastomosierung des Gallengangs. Der venöse Blutfluss zwischen der oberen und unteren Körperhälfte wird während der anhepatischen Phase durch einen femoro-axillären

Bypass sichergestellt.

Die „Piggy-back“-Technik

Hier wird die suprahepatische Spender-*Vena cava* mit dem Empfänger-Venenstern in End-zu-End-Technik anastomosiert. Die rechte Lebervene wird, wie die infrahepatische Spender-*Vena cava*, ligiert. Dies bringt den Vorteil, dass der Verlauf der *Vena cava inferior* nicht unterbrochen wird.

Die Rekonstruktion von Arterie, Pfortader und Gallengang erfolgt analog zur orthotopen Transplantation.

Die heterotope Lebertransplantation

Diese Art der Lebertransplantation spielt klinisch kaum eine Rolle. Hier wird das Spenderorgan zur Unterstützung der erkrankten Leber an einer anderen Stelle im Körper implantiert.

Die Splitlebertransplantation

Aufgrund des eklatanten Organmangels gewinnt die Splitlebertransplantation, sowie die Verwandten-Lebertransplantation immer mehr an Bedeutung. Ursprünglich wurde diese Technik entwickelt, um Lebertransplantationen bei Kindern durchführen zu können. Später wurde die Technik erweitert, um zwei Leberhälften für je einen Erwachsenen (Spender und Empfänger) zur Verfügung zu haben.

1.2.3 Komplikationen nach Lebertransplantation

Bei immer mehr Erkrankungen wird heutzutage die Indikation zur Lebertransplantation gestellt. Diese ständige Erweiterung führt gleicherweise zu einer größer werdenden Kluft zwischen Angebot und Nachfrage.

Dieses Missverhältnis führt wiederum dazu, dass die Auswahlkriterien des Spenderorgans verändert werden, was eine Risikoerhöhung des Transplantatversagens mit sich bringt. Es ist also von großer Bedeutung, die Qualität eines Spenderorgans adäquat beurteilen zu können. Hierfür gibt es bislang noch keinen zufriedenstellenden objektiven Marker.

Nach einer Transplantation kann es zu einer Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem des Empfängers gegen das Transplantat kommen. Die Folgen erstrecken sich von Organdysfunktion bis zum völligen Verlust des transplantierten Organs (Wiesner, Demetris et al. 1998). Um dies zu verhindern, wird jeder transplantierte Patient einer immunsuppressiven Therapie zugeführt, deren Nebenwirkungen maßgeblich den klinischen Verlauf und die Lebensqualität der Patienten beeinflussen.

Entscheidend für die Prognose der Patienten ist es, ob es zu einer Ausheilung oder einer Rekurrenz der Grunderkrankung kommt. Dies ist vor allem bei viralen Hepatitis-Erkrankungen, der alkoholtoxischen Leberzirrhose und bei Tumorerkrankungen möglich. Die immunsuppressive Therapie bewirkt hierbei zudem eine Risikoerhöhung, da ein funktionierendes Immunsystem zur Kontrolle dieser Erkrankungen erforderlich ist.

Heute liegt die 1-Jahres-Überlebensrate nach Transplantation zwar bei nahezu 90%, allerdings erreicht das Organüberleben nicht die Überlebenszeit der Patienten, was an der Retransplantationsrate von 5-7% sichtbar wird (Starzl and Demetris 1990, Pfitzmann, Nussler et al. 2008). Trotz verbesserter Operationstechniken und der Optimierung der immunsuppressiven Therapie kann es heute noch zu erheblichen Problemen und Störungen kommen.

In ca. 22-23% der Lebertransplantationen kommt es zur sogenannten *primary dysfunction* (PDF) bzw. zur *early allograft dysfunction* (EAD). In 6% der Fälle tritt sogar eine *primary non function* (PNF) auf (Ploeg, D'Alessandro et al. 1993, Deschenes, Belle et al. 1998, Pfitzmann, Nussler et al. 2008). Die PNF ist für den Empfänger lebensbedrohlich und erfordert in den meisten Fällen eine sofortige Retransplantation. Die PDF des Transplantats stellt einen der Hauptgründe für Morbidität und Mortalität nach Lebertransplantationen dar (Howard, Klintmalm et al. 1990, Ploeg, D'Alessandro et al. 1993). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine initiale schlechte Organfunktion = *initial poor function* (IPF) das Risiko einer frühen Abstoßungsreaktion erhöht. Es kam bei 35,7 % der Patienten, bei denen das Transplantat eine IPF zeigte, zu einer steroidresistenten Abstoßung, während bei

Patienten mit initial guter Organfunktion eine Abstoßung nur bei 12,7% zu beobachten war.

Folgende Faktoren führen zu einer Risikoerhöhung des Transplantatversagens bzw. einer Nichtfunktion nach Transplantation:

- Behandlung des Spenders auf der Intensivstation länger als 3 Tage
- Spenderalter über 49 Jahre
- Kaltischämiezeit des Transplantats länger als 18h
- Leberverfettung von über 30% (führt in 25% der Fälle zur PNF) (Nadig, Periyasamy et al. 2004)
- Größenmismatch: Transplantat zu klein für den Empfänger
- Niereninsuffizienz vor der Lebertransplantation
- Hypernatriämie von über 155 mmol/l des Spenders (Ploeg, D'Alessandro et al. 1993)

Ferner führt eine lange Organkonservierung zu einer Zunahme von Tumor-Nekrose-Faktor (TNF-) Rezeptoren, E-Selektin und Laminin während der Reperfusion, was wiederum zu einer akuten Abstoßungsreaktion führen kann.(Mueller, Platz et al. 1996)

Auch operationstechnische Probleme wie ein Leberarterienverschluss können zu einer PNF führen und eine Retransplantation nötig machen (Calmus 2008, Torres-Quevedo, Moya-Herraiz et al. 2009). Die häufigste Indikation für eine Retransplantation ist die Thrombose der Leberarterie (31,6%), gefolgt von der Rekurrenz der Grunderkrankung, z.B. dem Rezidiv einer Hepatitis-C-Leberzirrhose, (30,4%). Die *primary non function* ist für 21,5% der Retransplantationen verantwortlich.(Torres-Quevedo, Moya-Herraiz et al. 2009)

Aufgrund des bereits beschriebenen Organmangels werden verschiedene Anstrengungen unternommen, um auch sogenannte marginale Organe zu transplantieren und deren Organfunktion nach Transplantation zu verbessern.(Mor, Klintmalm et al. 1992)

Folgende Kriterien führen zur Klassifizierung als marginales Organ (Briceno, Marchal et al. 2002, Nadig, Periyasamy et al. 2004, (Briceno, Marchal et al. 2002, Nadig, Periyasamy et al. 2004, Nickkholgh, Weitz et al. 2007, Schemmer, Nickkholgh et al. 2007, Silberhumer, Pokorny et al. 2007, Pratschke, Loehe et al. 2009):

- Spenderalter > 65 Jahre
- Spender BMI > 30
- Verfettung der Spenderleber
- Hybernatriämie >155 mmol/l
- Aktive oder ausgeheilte Hepatitis-B-Infektion (Anti-HBc positiv)
- Hepatitis-C-positiver Spender (HCV-Ag, Anti-HCV)
- Sepsis mit positiver Blutkultur
- Drogenabhängigkeit
- Kaltischämiezeit > 14h
- Intensivtherapie / invasive Beatmung länger als eine Woche
- Erhöhte Leberwerte
 - Transaminasen > 3 ULN (Upper Limit of Normal)
 - Bilirubin > 3mg/dl

1.3 Die Pathophysiologie des Ischämie-/ Reperfusionsschadens

1.3.1 Ischämie

Bei der Perfusion wird das zu explantierende Organ in-situ mit einer kalten Konservierungslösung gespült. Das Ziel dieses Vorgehens ist es, das Blut vollständig aus dem Spenderorgan zu entfernen und das Organ möglichst schnell auf eine Temperatur von 4-8°C herunterzukühlen, um den Energiebedarf und den Sauerstoffverbrauch des Zellstoffwechsels auf ein Minimum zu reduzieren (Siewert 2006).

Durch die Perfusion mit der Konservierungslösung wird bei einer Organentnahme die Blutzufuhr und damit die Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr unterbrochen. Dadurch werden die Zellen dazu gezwungen, ihre Energiegewinnung von aerob auf anaerob umzustellen. Die jetzt ablaufende anaerobe Glykolyse liefert im Gegensatz zur aeroben Energiegewinnung nur noch 2 mol Adenosintriphosphat (ATP) pro mol

Glukose, was zu einer Verarmung der Hepatozyten an ATP führt, da der Stoffwechsel der Zellen zunächst normal weiter läuft.

Bei der anaeroben Glykolyse wird aus Pyruvat Laktat gebildet, welches ohne Sauerstoff nicht verstoffwechselt werden kann. Die Folgen sind eine zunehmende Abnahme des pH-Werts im Gewebe mit anschließender Gewebsazidose. Durch diese Veränderung des Säure-Basen-Haushalts nimmt die Aktivität der Enzyme ab, wodurch es schließlich zum Ausfall der Glykolyse kommt (Saikumar, Dong et al. 1998).

Als Folge einer zweistündigen Anoxie fällt der ATP-Gehalt in den Hepatozyten um 85%. Gleichzeitig sinkt der pH-Wert im Gewebe von 7,41 auf 7,06 (Gasbarrini, Borle et al. 1992). Dadurch kommt es zum Erliegen der Energieversorgung durch ATP und somit zum Ausfall ATP-abhängiger Prozesse (Karwinski, Husoy et al. 1989). Da die ATP-Bildung durch die sauerstoffabhängige Phosphorylierung in den Mitochondrien nicht mehr stattfinden kann und das noch vorhandene ATP schnell verbraucht ist, fehlt den ATP-abhängigen Ionenpumpen, wie z.B. der Na^+/K^+ -ATPase, rasch das ATP für die Aufrechterhaltung ihrer Funktionen. Als Folge kommt es zu Ionenverschiebungen und zum Verlust des regelhaften Membrangradienten. Dies führt zu einem intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Anstieg und damit zu einer Senkung des Membranpotenzials (Gasbarrini, Borle et al. 1992). Durch die intrazelluläre Akkumulation von Na^+ steigt der osmotische Druck und es kommt zum Wassereinstrom in die Zelle mit konsekutiver Zellschwellung und -schädigung (Carini, Autelli et al. 1995). Durch den Einstrom von extrazellulärem Calcium werden in der Zelle Proteasen und Phospholipasen analog zu apoptotischen Vorgängen aktiviert. Dies führt zum Abbau von Zellproteinen und zur weiteren Zellschädigung (Kuznetsov, Schneeberger et al. 2004). Die Folge sind Membranschäden, die zu einer gesteigerten Permeabilität und zu weiteren Elektrolytverschiebungen führen. Diese resultieren in Veränderungen von elektrischen Potentialen an der Zellmembran, sowie der Mitochondrienmembran, welche wiederum zelluläre Enzymaktivitäten beeinflussen (Florine-Casteel, Lemasters et al. 1991).

Der Energiemangel führt zu einer Akkumulation der Xanthin-Oxidase, welche durch Proteolyse aus der Xanthin-Dehydrogenase entsteht (Engerson, McKelvey et al. 1987). Die Xanthin-Oxidase produziert reaktive Sauerstoffradikale, die ebenfalls das Gewebe schädigen. Sie spielt damit eine wichtige Rolle bei der Entstehung des

ischämie-induzierten Gewebeschadens (Yokoyama, Beckman et al. 1990).

1.3.2 Konservierung

Die Organkonservierung durch Aufbewahrung des Transplantats in Eiswasser ist eine der wichtigsten Maßnahmen um den Ischämie-/Reperfusionsschaden möglichst gering zu halten. Bei Normothermie zeigen sich schon nach 10-12 Minuten Ischämie irreversible Schäden als Folge des Sauerstoffmangels (Wolff and Otto 1978). Wird das Organ um 10°C abgekühlt, vermindert sich die Aktivität der meisten Enzyme 1,5- bis 2-fach. Dies bedeutet eine Verringerung der Stoffwechselaktivität auf ca. ein Zwölftel bei Abkühlung des Organs auf 1°C (Belzer and Southard 1988).

Durch die Aufbewahrung des Transplantats in 4°C-kalter Lösung wird der Stoffwechsel und der Energieverbrauch reduziert und damit auch die Auswirkungen des Hypoxie-bedingten Schadens. Durch Verminderung des ATP-Verbrauchs hält das intrazelluläre ATP länger vor (Sorrentino, Van Ness et al. 1991). Der Abfall des ATP-Gehalts bei warmer Ischämie beträgt bereits nach 120 Minuten 87%. Außerdem zeigt sich auch eine geringere Regeneration des ATP nach Rezirkulation bei längerer Warm-Ischämie (Kamiike, Burdelski et al. 1988).

Bei Hypothermie wird weniger Xanthin-Dehydrogenase in Xanthin-Oxidase umgewandelt. Daher entstehen bei der Reperfusion und der damit verbundenen Wiedererwärmung weniger Sauerstoffradikale. Auch die anaerobe Glykolyse und damit die Laktatbildung werden reduziert, so dass die Gewebsazidose weniger stark ausfällt (Viebahn, de Groot et al. 1991).

Andererseits verstärkt die hypotherme Organkonservierung die Zellschädigung durch intrazelluläre Ödembildung, indem sie durch Verlangsamung der in der Zellmembran befindlichen Ionenpumpen eine Beeinträchtigung des Membranpotenzials begünstigt (Raison 1973).

Ferner kommt es bei der kalten Konservierung zu einer vermehrten Expression der mitochondrialen Phospholipase-C (PLC-dl). Diese Lipase ist mitverantwortlich für die Calcium-Aufnahme der Mitochondrien in den Hepatozyten. Eine vermehrte

Expression führt zu einem erhöhten Calcium-Einstrom und so zu einer ausgedehnten Mitochondrienschädigung (Knox, Pierce et al. 2006).

Bei ausgedehnter hypothermer Konservierung kommt es außerdem zu einer erhöhten Freisetzung von TNF- α , was nach der Reperfusion zu der Aktivierung von polymorphnuklearen Neutrophilen (PMN) und dadurch zu einer Gewebsschädigung führt (Kataoka, Shimizu et al. 2002).

Allerdings laufen diese Aktivierungsprozesse durch die verminderte Enzymaktivität bei der kalten Ischämie langsamer ab, so dass sich die Ischämietoleranz während kalter und warmer Ischämie deutlich unterscheidet. Abhängig vom Organ zeigt sich eine Ischämietoleranz bei kalter Ischämie von bis zu 16 Stunden ohne erkennbare Spätfolgen (Porte, Ploeg et al. 1998). Die Zeit der warmen Ischämie im Rahmen der Operation muss allerdings so kurz wie möglich gehalten werden, da hier schon nach 30 Minuten deutliche Schäden auftreten (He, Ma et al. 2003, Kern, Bald et al. 2008).

1.3.3 Reperfusion

Bei der Reperfusion nach Ischämie entstehen bei der Oxidation von *Hypoxanthin* zu *Xanthin* und von *Xanthin* zu Harnsäure freie Sauerstoffradikale. Diese können nun die Zellmembran oder die Mitochondrienmembran angreifen und so zur Schädigung der Hepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen führen (McCord 1985, Pardini 1995, Bzeizi, Dawkes et al. 1997).

Abbildung 2 zeigt schematisch die Vorgänge bei Ischämie und Reperfusion:

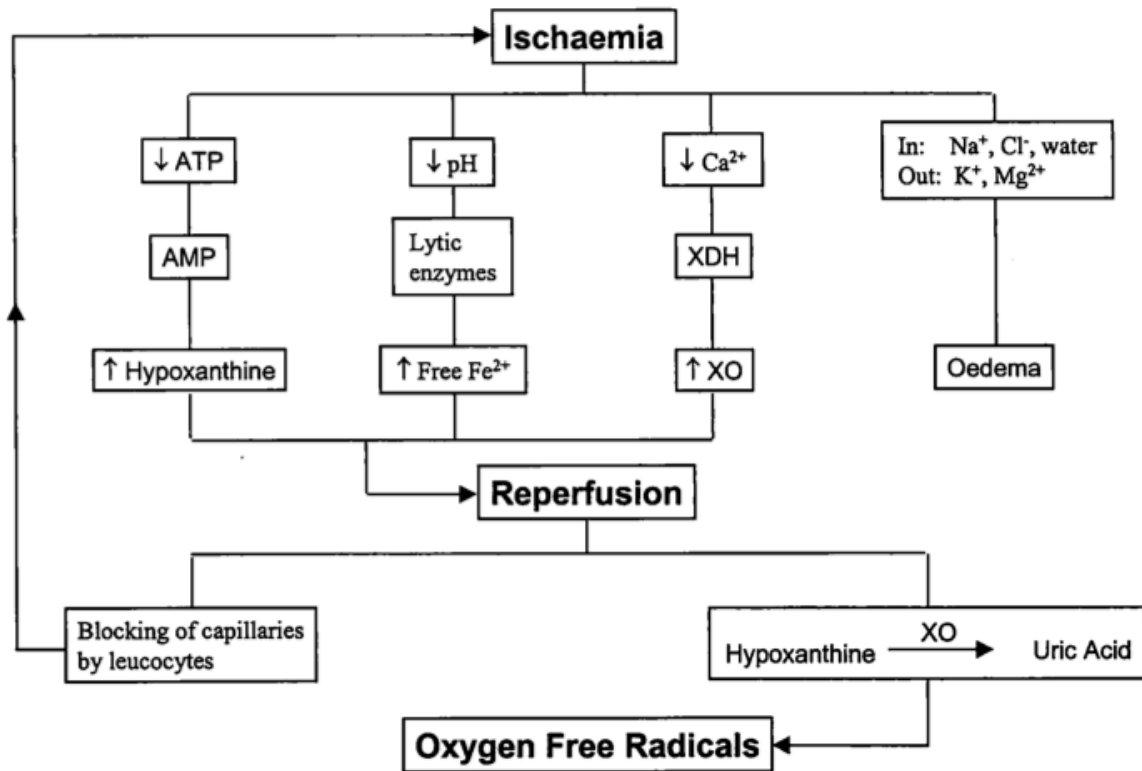


Abb 2: Vorgänge bei Ischämie und Reperfusion. Quelle: (Kotsch 2008)

Ferner werden durch die Sauerstoffradikale *v.-Kupffer-Zellen* aktiviert, die wiederum Entzündungsmediatoren wie *Zytokine* und weitere freie Radikale ausschütten und dadurch die Schädigung noch verstärken (Jaeschke and Farhood 1991). Diese von den *v.-Kupffer-Zellen* gebildeten Radikale können im Energiemangelzustand nicht adäquat beseitigt werden. Versuche haben gezeigt, dass insbesondere *v.-Kupffer-Zellen* für die Bildung von freien Sauerstoffradikalen und somit für die Organschädigung in der Initialphase der Reperfusion nach hypothermer Konservierung verantwortlich sind (Jaeschke and Farhood 1991, Shibuya, Ohkohchi et al. 1997). Es konnte auch gezeigt werden, dass durch eine Inaktivierung der *v.-Kupffer-Zellen* die Leber vor einem Ischämie-Reperfusionsschaden geschützt wird (Jaeschke and Farhood 1991).

Von den Sauerstoffradikalen werden zusätzlich polymorphkernige neutrophile Granulozyten aktiviert. Diese binden an die Endothelzellen und infiltrieren die Lebersinusoiden (Grisham, Hernandez et al. 1986, Kurokawa, Nonami et al. 1996). In Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Aktivierung der polymorphkernigen Granulozyten zu einer Minderung des Ischämie-Reperfusionsschadens führt (Grisham, Hernandez et al. 1986).

Die Ischämie und die anschließende Reperfusion führen zu Gewebeschäden, die insbesondere bei marginalen Organen nicht selten eine Organdysfunktion aufgrund einer Inflammation des Transplantats auf zellulärer und molekularer Ebene zur Folge haben. Hier kommt es zu einer inadäquat starken Aktivierung der *v.-Kupffer-Zellen* (Lindert, Caldwell-Kenkel et al. 1992).

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, das bei einer Reihe von Pathologien, unter anderem beim Ischämie-/Reperfusionsschaden eine Rolle spielt (Shuh, Bohorquez et al. 2013). TNF- α wird von vielen aktivierten Immunzellen gebildet, unter anderem von B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophilen. Das Immunsystem reagiert auf eine Leberschädigung mit einer Aktivierung dieser Zellen mit folgender TNF- α -Produktion. Ein erhöhter TNF- α -Spiegel wiederum verstärkt die Aktivierung der *v.-Kupffer-Zellen* und führt somit zu einer vermehrten Freisetzung von Sauerstoffradikalen. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Infiltration durch polymorphkernige Granulozyten und somit zur verstärkten Mikroangiopathie, die einen Grund für den Zellschaden in der initialen Phase der Reperfusion darstellt (Shibuya, Ohkohchi et al. 1997).

Ferner wurde gezeigt, dass es bei der Ischämie und der folgenden Reperfusion zur Modifikation und Hochregulation von Genen kommt. Dies geschieht zum Teil sogar mit Genen, die sonst nicht exprimiert werden. Es sind Gene betroffen, die für Adhäsionsmoleküle, Integrine und Hitzeschockproteine, vor allem aber für Entzündungsreaktionen und für die Apoptose verantwortlich sind (Lindert, Caldwell-Kenkel et al. 1992).

Auch die Reperfusion selbst ist verantwortlich für potentielle Schäden. Durch die Reoxygenierung werden freie Sauerstoffradikale gebildet (McCord 1985). Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Konzentration von freien Radikalen bzw. deren Aktivität bei Patienten mit schlechtem Transplantationsergebnis höher war als bei Patienten mit vergleichsweise gutem Transplantationsergebnis. Das Ausmaß des Anstiegs der freien Radikale steht also in direkter Beziehung zum Schweregrad der Organdysfunktion (Bzeizi, Dawkes et al. 1997).

Durch die Reperfusion wird der Blutfluss wiederhergestellt und die Ischämie beendet. Die entstandenen Schäden sind bis zu einer gewissen Zeit reversibel, wenn nicht die spezifische Ischämietoleranz überschritten wird. Ist dies der Fall, kommt es zum Absterben der Zelle (Schon, Hunt et al. 1993). Ist der Blutfluss wiederhergestellt, wird das Gewebe wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und die toxischen Metabolite abtransportiert. So kann sich wieder ein physiologischer pH-Bereich einstellen, wodurch Enzyme ihre Funktionen wiederaufnehmen können. Die Reperfusion ist also unverzichtbar für die Erholung und Funktionsaufnahme des Gewebes. Reichen jedoch die Enzym- und Zellfunktionen nicht aus, um die angefallenen Giftstoffe zu eliminieren und die aggressiven Radikale zu beseitigen, nehmen die toxischen Stoffe weiter zu und der Schaden dehnt sich aus, was als „sekundärer Schaden“ bezeichnet wird (Bzeizi, Dawkes et al. 1997).

1.4 Abstoßungsreaktion

1.4.1 Histokompatibilität / Antigenpräsentation

Ein Grund für eine Abstoßungsreaktion ist die HLA-Antigendifferenz der Gewebe zwischen Spender und Empfänger. Diese Antigene werden durch den „*major histocompatibility complex*“ (MHC) exprimiert (Dausset 1981, Hood, Steinmetz et al. 1982, Steinmetz, Winoto et al. 1982, Hood, Steinmetz et al. 1983). Der MHC hat eine Schlüsselrolle in beinahe allen Aspekten einer Immunantwort inne, insbesondere in der Transplantatabstoßung. Beim Menschen wird der MHC-Komplex als HLA (*human leukocyte antigen*) bezeichnet (Daar, Fuggle et al. 1984).

Es gibt zwei Gruppen von HLA-Antigenen. Klasse I-Antigene (HLA -A, -B, -C) werden auf fast allen kernhaltigen Zellen im Körper exprimiert, während Klasse II-Antigene (HLA-D, -DR, -DQ,- DP) vor allem auf sogenannten „immunkompetenten“ Zellen wie B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert werden (Hood, Steinmetz et al. 1982, Steinmetz, Winoto et al. 1982, Hood, Steinmetz et al. 1983, Hood, Steinmetz et al. 1983, Meuer, Cooper et al. 1983, Daar, Fuggle et al. 1984, Daar, Fuggle et al. 1984, Fuggle, McWhinnie et al. 1986, Anton, Yewdell et al. 1997). An HLA-Antigenen der Klasse-I werden vor allem zytosolische Antigene (z.B. virale oder allogene Peptide) präsentiert, die mit Alloantikörpern und

zytotoxischen T-Zellen (Anton, Yewdell et al. 1997, Deng, Yewdell et al. 1997) interagieren. HLA-Antigene der Klasse-II sind wiederum der Angriffspunkt von T-Helferzellen. Hier werden exogene Peptide präsentiert, die zunächst von der Zelle aufgenommen und prozessiert wurden (Zhong, Reis e Sousa et al. 1997)

1.4.2 CD4+ / CD8+ T-Zellen und T-Zell-Rezeptor

Für die adaptive Immunantwort sind zwei Zelllinien, die T-Lymphozyten und die B-Lymphozyten von großer Bedeutung. T-Lymphozyten stammen wie alle anderen Blutzellen von derselben pluripotenten Stammzelle ab und werden wie diese im Knochenmark gebildet. Für die Differenzierung zu T-Lymphozyten spielt allerdings der Thymus die zentrale Rolle, ohne den eine effektive zellvermittelte Immunantwort nicht möglich wäre. Die Stammzellen müssen also das Knochenmark verlassen und über den Blutweg in den Thymus wandern. Dort erfahren die T-Lymphozyten eine positive Selektion (MHC-Restriktion) und eine negative Selektion (Prävention von Autoreaktivität). Bei der positiven Selektion werden T-Zellen, die Peptide im Komplex mit eigenen MHC-Molekülen erkennen, aber nicht stark binden, positiv ausgewählt. T-Zellen, die dieses Kriterium nicht erfüllen sterben durch Apoptose. Dies führt dazu, dass ein T-Lymphozyt sein spezifisches Antigenfragment nur gleichzeitig mit einem körpereigenem Histokompatibilitäts-Antigen (MHC-Molekül) erkennt (MHC-Restriktion). Im Gegensatz zur positiven Selektion werden bei der negativen Selektion solche T-Zellen, die stark an Eigen-MHC-Moleküle mit präsentierenden Eigenpeptiden binden, eliminiert. Dies verhindert eine Aktivierung des Immunsystems durch körpereigene Antigene (Autoreaktivität). Erst wenn sie diese Selektionsschritte erfolgreich durchlaufen haben, sind die T-Lymphozyten ausgereift, verlassen den Thymus und zirkulieren als immunkompetente Zellen in Blut und Gewebe (van Ewijk 1991, Kruisbeek 1993, Buer, Aifantis et al. 1997, Deng, Yewdell et al. 1997).

Reife T-Lymphozyten werden anhand ihres Phänotyps in 2 Gruppen unterteilt: CD4+ T-Lymphozyten (früher „T-Helferzellen“), die je nach Differenzierung eine zellvermittelte (Th₁) oder humorale (Th₂) Immunreaktion auslösen, und CD8+ T-Lymphozyten (früher „T-Killerzellen“). Diese erkennen an MHC-I-Komplexen präsentierte Antigene und werden dadurch aktiviert. Nach Aktivierung produzieren

sie zytotoxische Moleküle wie Perforin und Granzym B und lysieren ihre Zielzellen direkt, weshalb sie auch zytotoxische T-Zellen genannt werden (Macatonia, Taylor et al. 1989, Pichler 1997).

Die Erkennung des Antigens und die daraus folgende Aktivierung der T-Lymphozyten geschieht über den TCR/CD3-Komplex. Der TCR (T-Zell-Rezeptor) ist ein Heterodimer, bestehend aus einer α -Kette und einer β -Kette (Meuer, Cooper et al. 1983). Dieser steht in Verbindung mit dem CD3-Komplex, der die Signaltransduktion in die Zelle übernimmt (Reinherz, Meuer et al. 1982, Czitrom 1996).

Für die Interaktion des Antigens (plus MHC) mit den variablen Regionen des TCR sind antigenunabhängige akzessorische Moleküle nötig, welche die Interaktion verstärken. Dazu gehören CD4+ und CD8+. Während CD4+ an MHC Klasse-I der antigenpräsentierenden Zellen bindet, ist CD8+ für eine Bindung an Klasse-II-Moleküle vorgesehen. Die Folge ist eine verstärkte Bindung des Antigen/MHC-Komplexes an den TCR. Außerdem sind die akzessorischen Moleküle an der Signaltransduktion beteiligt (Czitrom 1996, Pichler 1997).

1.4.3 T-Zell-Aktivierung und Interleukin-2-Rezeptor- α (CD25)

Nach Aktivierung der T-Zellen wird eine Signaltransduktionskaskade ausgelöst, die vor allem in der Expression des Interleukin-2-Gens resultiert. Interleukin-2 fungiert sowohl als parakriner als auch als autokriner Wachstumsfaktor, d.h. Zielzellen sind sowohl die produzierenden T-Lymphozyten selbst als auch andere T-Zellen in der nahen Umgebung (Mosmann and Coffman 1989, Kane, Lin et al. 2000).

Die Wirkung von Interleukin-2 (IL-2) wird vermittelt über die Bindung an den Interleukin-2-Rezeptor. Dieser besteht aus drei Oberflächenproteinen:

IL-2-Rezeptor- α (CD25), - β (CD122) und - γ (CD132) (Boelaars-van Haperen, Baan et al. 2001). Während sich die α -Kette vor allem auf aktivierten T-Zellen befindet, werden die β -Kette und die γ -Kette auch im Ruhezustand exprimiert. Die α -Kette ist spezifisch für den IL-2-Rezeptor. Die β -Kette hingegen ist zusätzlich eine Komponente des Rezeptor-Komplexes für IL-15. Die γ -Kette ist sogar an mehreren

Rezeptorkomplexen wie IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 beteiligt (Siegel, Sharon et al. 1987, Leonard, Shores et al. 1995).

Durch die Exprimierung von IL-2-Rezeptor- α wird die Affinität von Interleukin-2 zum IL-2-Rezeptor- β erhöht, so dass nun das Signal bereits bei deutlich niedrigeren IL-2-Spiegeln übertragen werden kann. Folglich kann die Exprimierung des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) als Marker für die Aktivierung und die beginnende Proliferation nach erfolgter Immunstimulation angesehen werden (Minami, Kono et al. 1993).

1.4.4 Zelluläre Rejektion / Humorale Rejektion

Zur Transplantatabstoßung führen letztendlich zelluläre und humorale Immunmechanismen, die eine komplexe Abwehrkaskade in Gang setzen. Bei der zellvermittelten Immunreaktion kommt es durch Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen zu direktem Angriff auf die Zielzellen und zu deren Lyse. Durch die Aktivierung der B-Lymphozyten kommt es zur humoralvermittelten Immunreaktion durch deren Produktion antigenspezifischer Antikörper. Deren Bindung an die Zielzellen induziert die Aktivierung von Makrophagen (sog. „Opsonierung“) und der Komplementkaskade, und führt daher ebenfalls zur einer Lyse der Zellen (Tilney and Kupiec-Weglinski 1991, Bijur 1996, Horowitz, Friedlaender et al. 1996).

Neben diesen beiden spezifischen Immunreaktionen wird im Transplantat durch Makrophagen, Monozyten und Granulozyten zusätzlich eine unspezifische Entzündungsreaktion hervorgerufen. Durch diese Entzündung kommt es durch die Freisetzung vasoaktiver Substanzen und lokal gesteigerter Gerinnung zur Thrombosierung kleiner Transplantatgefäße (Aw 2003).

1.4.5 Apoptose / Nekrose

Die verschiedenen Immunreaktionen führen schließlich alle zum Absterben der Zelle. Im Gegensatz zur aktiv regulierten und physiologisch sinnvollen Apoptose ist die Nekrose der durch eine Noxe ausgelöste „Unfalltod“ der Zelle. Unter pathologischen Bedingungen können Apoptose und Nekrose koexistieren oder ineinander übergehen, aber es lassen sich beide Prozesse anhand charakteristischer

morphologischer und biochemischer Merkmale unterscheiden (Nicotera and Melino 2004, Galluzzi, Aaronson et al. 2009).

Der Begriff Apoptose bezeichnet das Absterben von Zellen nach einem definierten Programm, dem sogenannten „programmierten Zelltod“ (Kerr, Wyllie et al. 1972). Charakteristisch für apoptotische Zellen ist das Schrumpfen der Zellen, die Chromatinkondensation, die DNS-Fragmentierung sowie die Aufrechterhaltung der Membranintegrität (Ellis, Yuan et al. 1991). Im Verlauf der Apoptose schnüren sich exozytotische Membranvesikel von der Plasmamembran ab, die Zellfragmente enthalten und als apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) bezeichnet werden. Letztendlich werden diese Vesikel von Makrophagen aufgenommen und abgebaut. Da es zu keiner Freisetzung von zytosolischen Bestandteilen in den extrazellulären Raum kommt, bleibt beim apoptotischen Zelltod eine nennenswerte Entzündungsreaktion aus (Hengartner 2000).

Grundsätzlich handelt es sich bei der Apoptose um einen aktiven, ATP-abhängigen, sowie strikt regulierten biochemischen Prozess. Apoptose ist ein grundlegender Mechanismus und essentiell für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. Sie tritt physiologischerweise im Rahmen der Embryonalentwicklung und bei Involutionsprozessen auf. Außerdem spielt sie bei einer Vielzahl von pathologischen Situationen eine zentrale Rolle, wie bei der Elimination infizierter Zellen, bei Autoimmunerkrankungen, degenerativen Erkrankungen, ischämischer Gewebsschädigung und insbesondere bei der Krebsentstehung, wo die Hemmung der Apoptose zu einer Zunahme der Zellzahl führt (Prof.Dr. Böker 2004).

Durch mechanische Läsionen, Unterversorgung mit Blut (Ischämie) oder Sauerstoff (Hypoxie) oder Bakterieninfektion der Zelle kann es zum nekrotischen Zelltod kommen. Durch die beschädigte Plasmamembran strömt Wasser in die Zelle und bringt diese zum Platzen. Als Folge gelangen zytosolische Bestandteile in den Extrazellularraum und rufen dort eine Entzündungsreaktion hervor, wodurch das betroffene Gewebe häufig vernarbt (Prof.Dr. Böker 2004).

Da die Nekrose nicht energieabhängig ist, kann es auch zum nekrotischen Zelltod kommen, wenn eine Apoptoseinduktion ohne ausreichende Energieversorgung vorliegt (Fink and Cookson 2005). Die Nekrose wird allgemein als Unfalltod der Zelle

beschrieben, doch weisen neuere Erkenntnisse darauf hin, dass auch hier spezifische Signalwege aktiviert werden. Da die beteiligten Signalwege auch im Verlauf der Apoptose aktiviert werden kam es zur Prägung des Begriffs Nekroptose oder programmierte Nekrose (Degterev and Yuan 2008, Hitomi, Christofferson et al. 2008, Vandenabeele, Galluzzi et al. 2010).

1.4.6 Klassifikation der Abstoßungsreaktion

Warum manche Transplantate gut vom Empfänger angenommen werden und lange eine gute Organfunktion zeigen während andere Transplantate durch akute oder chronische Abstoßung verloren gehen ist noch immer ungeklärt. Die traditionelle Einteilung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation ist bis heute im Wesentlichen unverändert (Snover, Freese et al. 1987, Adams and Neuberger 1990, Heublein, Haverich et al. 1990, Solez, Axelsen et al. 1993, Portmann, Slapak et al. 1995). Sie richtet sich weniger nach immunologischen oder pathologischen Mechanismen als nach dem zeitlichen Auftreten/Verlauf der Abstoßungsreaktion, so dass sie vereinfacht in *hyperakut*, *akut* und *chronisch* eingeteilt wird. Diese Klassifikation ist klinisch relevant, obwohl Definitionen, die morphologische und immunologische Vorgänge berücksichtigen, in Bezug auf diagnostische und therapeutische Relevanz von Vorteil wären. Die Morbidität und Mortalität transplantierten Patienten kann durch eine frühe Diagnosestellung und effektive Therapie der Abstoßungsereignisse deutlich gesenkt werden. Sowohl Häufigkeit als auch Schwere akuter Abstoßungsreaktionen stellen einen Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Abstoßung dar, die sehr häufig zum Transplantatverlust führt (Almond, Matas et al. 1993, Demetris, Murase et al. 1997, Wiesner, Batts et al. 1999). Die Verhütung von Abstoßungsreaktionen ist demnach nicht nur von Vorteil für den Patienten und seine Regeneration, sondern senkt zugleich den Bedarf an knappen Spenderorganen.

1.4.6.1 Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßung ist eine schwere immunologische Reaktion gegen das Gefäßsystem des Transplantats, die innerhalb von Minuten bis Stunden nach Transplantation auftritt und auf präformierte zytotoxische Antikörper zurückzuführen ist. Die initiale Antikörperbildung am Gefäßendothel führt zu einer Aktivierung der

Komplement- und Gerinnungskaskade. Dies hat die Invasion von Granulozyten und eine intravasale Gerinnung zur Folge, die wiederum Stauung, Ödem und interstitielle Blutungen nach sich ziehen. Schlussendlich führen diese Prozesse zum Zelltod und Transplantatverlust schon nach Minuten bis Stunden (Gubernatis, Kemnitz et al. 1989, Adams and Neuberger 1990).

Lange Zeit wurde geglaubt, dass die hyperakute Abstoßung bei Lebertransplantationen nicht auftritt, sogar wenn bei AB0-Inkompatibilität oder bei positivem Crossmatch (Kreuzprobe zwischen Empfänger-Serum und Milzzellen des Spenders zur Ermittlung von Antikörpern gegen das gespendete Gewebe) transplantiert wurde. Mittlerweile konnte sie allerdings tierexperimentell induziert werden und wird heute, jedoch sehr selten, bei frühen Transplantatverlusten nach initialer Transplantatfunktion als Ursache angesehen. Die hyperakute Abstoßung ist für Nieren-, Herz- und heute auch für Lebertransplantate gut dokumentiert, kann aber durch Verwendung Blutgruppen-kompatibler Organe und durch die adäquate Durchführung von Kreuzproben zwischen Spenderlymphozyten und Empfängerserum fast immer vermieden werden (Kissmeyer-Nielsen, Olsen et al. 1966, Gubernatis, Kemnitz et al. 1989).

1.4.6.2 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung betrifft ca. 70% der Patienten nach Lebertransplantation und stellt die Hauptursache des frühen Transplantatverlusts dar (Kirby, McMaster et al. 1987, Pichlmayr and Gubernatis 1987, Snover, Freese et al. 1987). Sie zeigt sich ab dem dritten Tag, in der Regel jedoch eine Woche nach Transplantation. Spezifische zelluläre immunologische Reaktionen, teilweise mit humoraler Komponente, aber auch unspezifische Entzündungsreaktionen sind für die akute Abstoßung verantwortlich. Immunsuppressiva können an verschiedenen Stellen dieser Reaktionen angreifen.

Das Parenchym des Transplantats exprimiert *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse-I-Antigene. Die MHC Klasse-II-Antigene werden neben weiteren Klasse-I-Antigenen von den Blutgefäßen exprimiert. Außerdem wandern in das Gewebe spezielle Leukozyten ein, die *Antigen-präsentierenden Zellen* (APC), welche

eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Immunantwort im Empfänger spielen. Abbildung 3 zeigt schematisch wie diese Aktivierung im Gewebe abläuft.

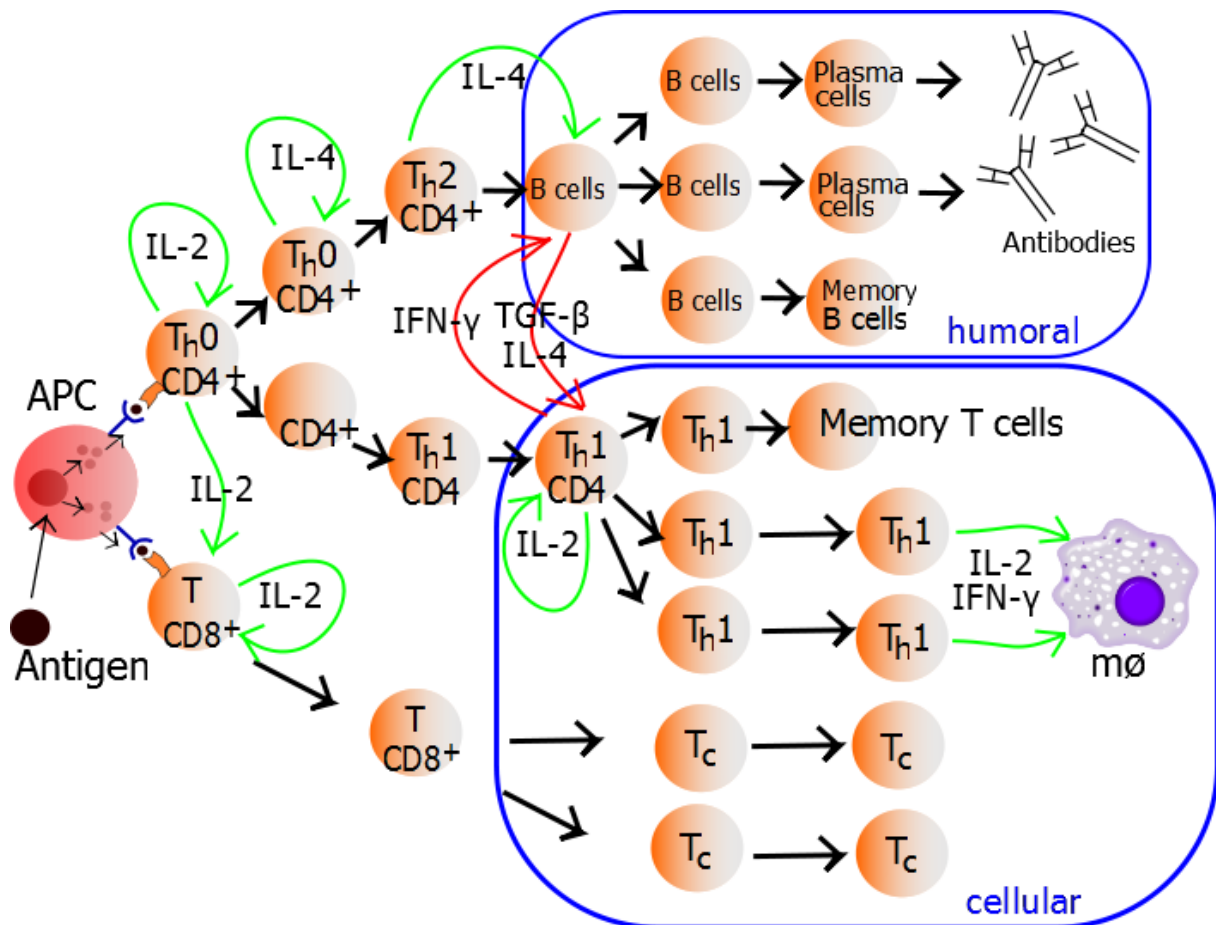


Abb. 3: Übersichtsschema zur Lymphozytenaktivierung Rang, H.P.; Pharmakology; Page 223 (2008).(Rang 2008)

Im Empfänger sind T-Lymphozyten, sogenannte CD4+ T-Helferzellen und CD8+ zytotoxische T-Zellen, zusammen mit B-Lymphozyten und anderen inflammatorischen Zellen, wie Makrophagen, für die gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort verantwortlich.

Erkennen die T-Helferzellen die fremden MHC Klasse-II-Antigene des Spenders, kommt es zu einer massiven Zellaktivierung und Proliferation. Die nun von den T-Helferzellen ausgeschütteten Zytokine, wie Interferon-gamma (IFN- γ) sowie die Interleukine (IL) IL-2 und IL-4 aktivieren verschiedene immunologische Prozesse. Durch IL-2 und IL-4 werden bestimmte immunologische Reaktionen, wie die Aktivierung spezifischer T- und B-Zell-Antworten angestoßen. Da nun aber IFN- γ für die Aktivierung von unspezifischen inflammatorischen Vorgängen entscheidend ist,

sind sowohl die spezifischen als auch die unspezifischen Aspekte des Abstoßungsprozesses zu berücksichtigen (Tilney and Kupiec-Weglinski 1991).

IL-2 wird zur Zellteilung und Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen benötigt, die wiederum im aktiven Zustand das Transplantat infiltrieren und MHC Klasse-I-Antigene erkennen können. IL-4 ist für die Aktivierung der humoralen Komponente zuständig. Es vermittelt die Aktivierung der B-Lymphozyten, die dann die Anti-Spender-Antikörper bilden, die am Abstoßungsprozess beteiligt sind. Bei der Aktivierung der unspezifischen inflammatorischen Reaktionen spielt IFN- γ eine wichtige Rolle. Durch Aktivierung von Makrophagen und Regulation der Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel ermöglicht es die zelluläre Infiltration des Transplantats. Außerdem führt es an Parenchymzellen zur vermehrten Expression von Spender-MHC-Antigenen, während es an Antigen-präsentierenden Zellen die Effektivität der Antigen-Präsentation steigert.

Histologisch findet man bei der akuten Abstoßung nach Lebertransplantation ein interstitielles Ödem, eine periportale Infiltration von Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen sowie eine Endothelitis mit Destruktion der Gallengänge (Snover, Freese et al. 1987, Matevossian 2001).

Klinische Zeichen sind eine systemische Reaktion mit Fieber und Unwohlsein. Die Gallenflüssigkeit wird blass und wässrig und die Produktionsmenge nimmt ab. Die früheste biochemische Veränderung ist normalerweise ein starker Anstieg im Serum-Bilirubin, auf den dann leichte Anstiege der alkalischen Phosphatase und der Transaminasen folgen können (Adams and Neuberger 1990).

1.4.6.3 Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung ist die progrediente Funktionsminderung des Transplantats in Abwesenheit anderer Erkrankungen, die sich über Monate bis Jahre, frühestens jedoch 6-12 Wochen nach Transplantation entwickeln kann.

Humorale und zelluläre Pathomechanismen führen zu einer Schädigung der Gefäße im Sinne einer Transplantatvaskulopathie. Gründe für die Entstehung der

chronischen Abstoßung sind sowohl immunologischer als auch nicht-immunologischer Natur, da das Endothel durch immunologische Stimuli, wie Antikörper oder Zytokine (IFN- γ , TNF- α) und nicht immunologische Stimuli, wie virale Infektionen (CMV) oder physikalische Ursachen (Hypertension) aktiviert werden kann. In Abbildung 4 ist eine Übersicht über die immunologischen Prozesse bei chronischer Transplantatabstoßung dargestellt.

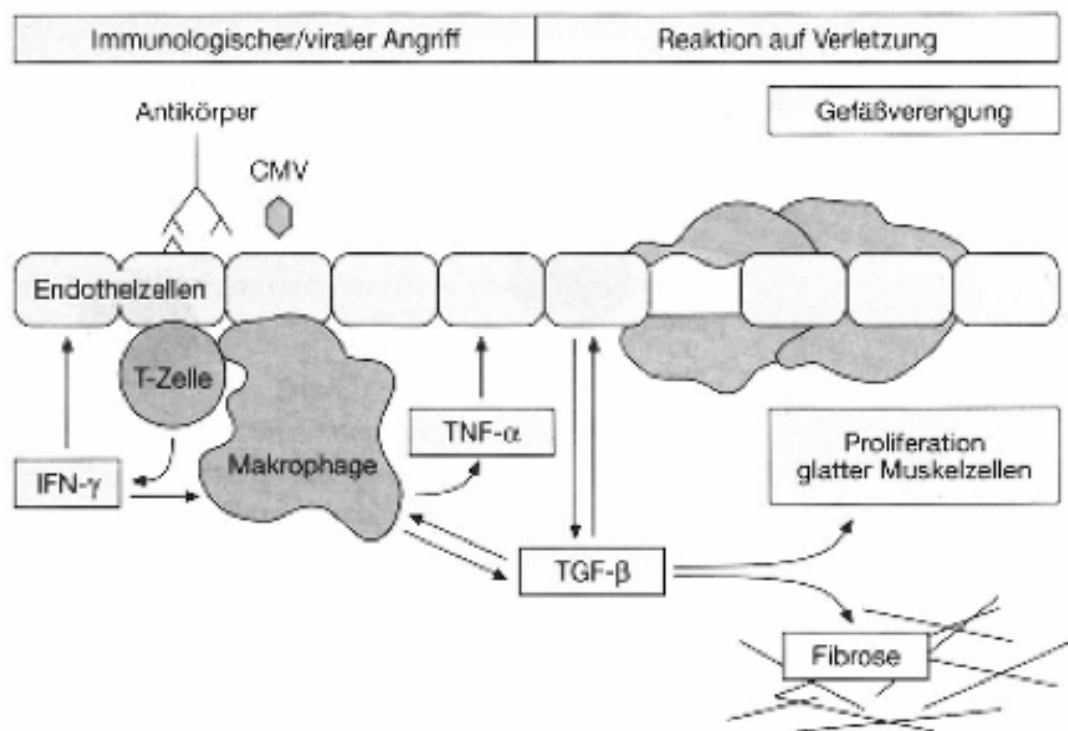


Abb. 4: Immunologische Mechanismen der chronischen Transplantatabstoßung. Quelle: (Matevossian 2001)

Histopathologisch kommt es bei der chronischen Abstoßung an den Arterien und Arteriolen zur Intima-Proliferation und dadurch zunehmend zur konzentrischen Lumeneinengung. Ferner kommt es im Interstitium zur Fibrose und es manifestiert sich ein sogenanntes „vanishing bile duct“- Syndrom, ähnlich, wie es bei der primär biliären Zirrhose beobachtet wird. Klinisch zeigt sich bei den betroffenen Patienten zunächst ein Anstieg des Serum-Bilirubins (Snover, Sibley et al. 1984, Demetris, Lasky et al. 1985, Ludwig, Wiesner et al. 1987): (Demetris, Murase et al. 1997).

Risikofaktoren für die Entstehung einer chronischen Abstoßung sind vorausgegangene akute Abstoßungsreaktionen, niedrige Immunsuppressiva-Spiegel

(aufgrund verminderter Aufnahme, erhöhter Ausscheidung, reduzierter Patienten-Compliance), Infektionen und ein starker Ischämie-/Reperfusionsschaden (Howard, Klintmalm et al. 1990, Almond, Matas et al. 1993, Demetris, Murase et al. 1997).

1.5 Immunsuppressiva bei akuter Abstoßung

Durch den Einsatz immunsuppressiver Substanzen kann das Auftreten von akuten Abstoßungen verhindert oder zumindest das Ausmaß der Abstoßungen verringert werden. Es gibt verschiedene Wirkstoffe mit unterschiedlichen Angriffspunkten. Steroide spielen nach wie vor eine große Rolle sowohl in der Unterdrückung der akuten Abstoßung als auch in der Erhaltungstherapie (Post, Douglas et al. 2005). Sie hemmen die entzündliche Reaktion, indem sie den Vorgängen entgegenwirken, die durch IFN- γ vermittelt werden. Außerdem unterdrücken Steroide die Aktivierung inflammatorischer Zellen, hemmen die Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel und von MHC-Antigenen im Transplantat und sie reduzieren die Aktivität Antigen-präsentierender Zellen. In hohen Dosen bewirken sie sogar die direkte Apoptose von aktivierten Lymphozyten (Matevossian 2001).

Das Rückgrat einer jeden immunsuppressiven Therapie heutzutage bilden die Calcineurin-Inhibitoren wie *Cyclosporin A* und *Tacrolimus* (Post, Douglas et al. 2005). Beide unterdrücken die Bildung von Zytokinen, die bei der Aktivierung von spezifischen und unspezifischen Mechanismen der Abstoßung eine zentrale Rolle spielen (Matevossian 2001).

Die neuesten Substanzen im immunsuppressiven Schema sind Antimetabolite wie *Mycophenolat Mofetil* (MMF) und *Mycophenolsäure*. Sie unterdrücken wie ältere Medikamente dieser Gruppe, z.B. *Azathioprin*, die massive Zunahme der aktivierten Lymphozyten im Rahmen der Immunantwort. *Mycophenolat Mofetil* hemmt die klonale Expansion der B-Lymphozyten sowie deren Antikörperproduktion (Matevossian 2001, Post, Douglas et al. 2005).

Abbildung 5 zeigt die Wirkung einer im klinischen Alltag angewandten Triple-Therapie:

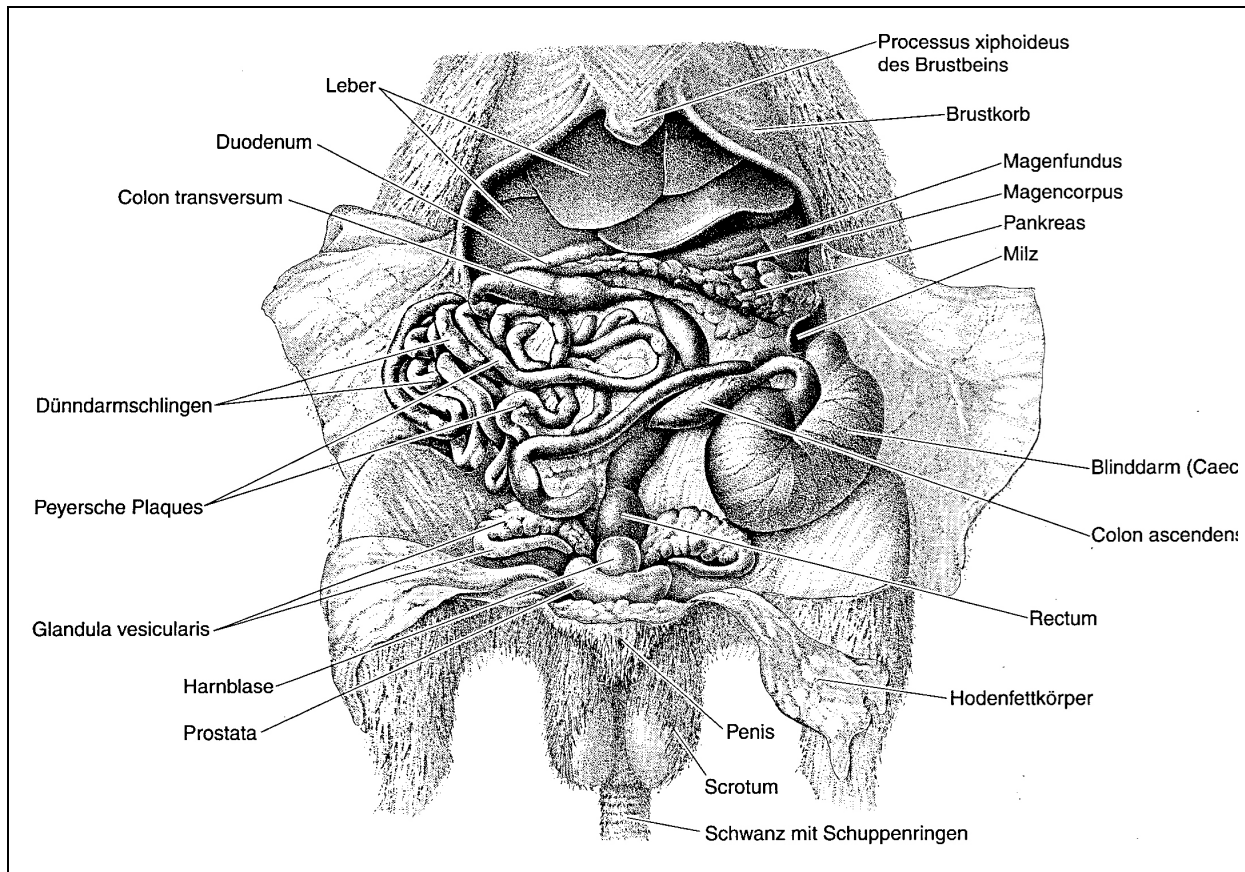


Abb 6: Situs Ratte Männlich; Quelle: Kükenthal (2002) (Storch V. 2002)

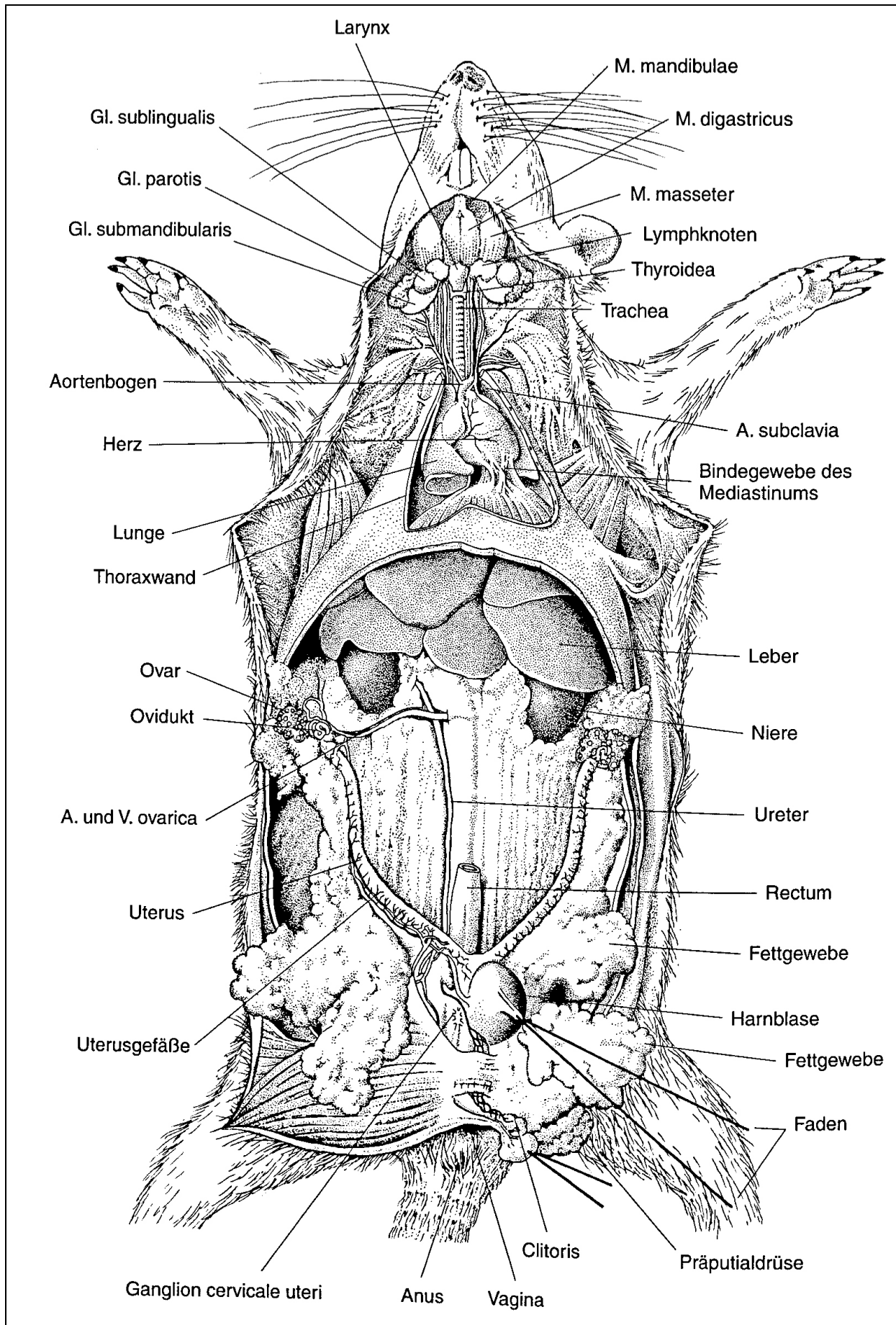


Abb. 7: Situs Ratte Weiblich; Quelle: Kükenthal (2002) (Storch V. 2002)

1.6.1.2 Lobierung

Die Nomina anatomica veterinaria (Nomenclature. 2005) legt folgende anatomische Termini fest:

- Lobus hepatis dexter
 - Lobus hepatis dexter lateralis
 - Lobus hepatis dexter medialis

- Lobus hepatis sinister
 - Lobus hepatis sinister lateralis
 - Lobus hepatis sinister medialis

- Lobus quadratus
- Lobus caudatus
 - Processus papillaris
 - Processus caudatus

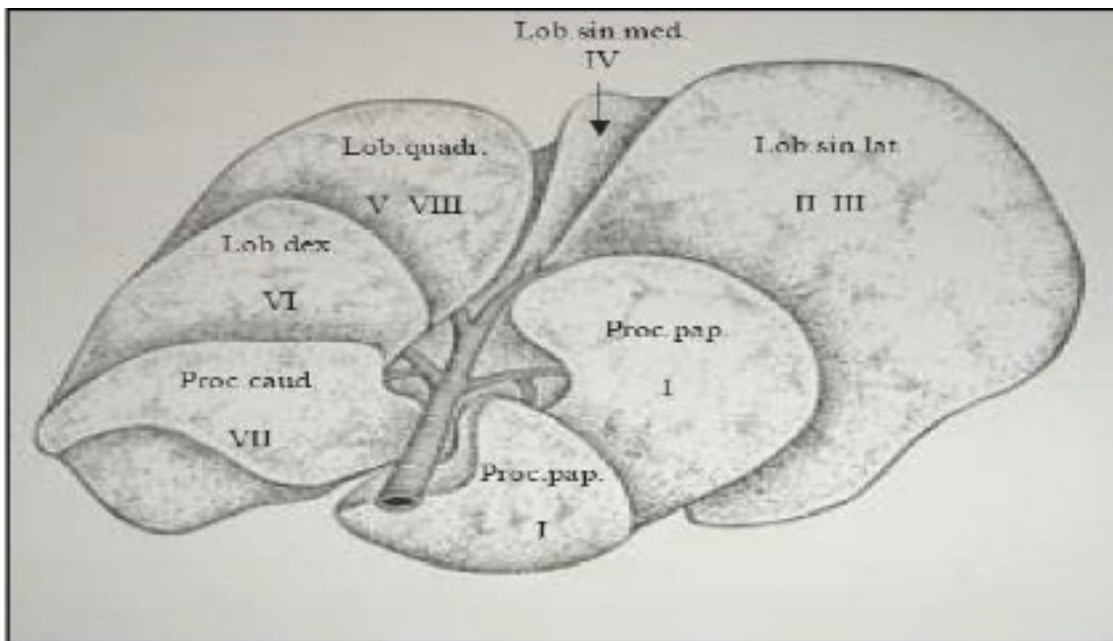


Abb. 8: Leberlappen; FÖDRA (1991)

Abbildung 8 gibt eine Übersicht über die Einteilung der Leber in die Leberlappen. Die Leber setzt sich also aus 4 Lappen zusammen, die wiederum unterteilt werden

können. Ventral liegen der *Lobus quadratus* und der *Lobus hepatis sinister*. Weiter dorsal befinden sich der *Lobus hepatis dexter* und der *Lobus caudatus*.

Der *Lobus quadratus* wird durch die *Fissura umbilicalis* in einen linken und einen rechten Anteil unterteilt. Dort setzt das *Ligamentum falciforme* an, über welches der *Lobus quadratus* am Diaphragma aufgehängt ist. Der rhombenförmige *Lobus hepatis sinister* wird zum Teil vom *Lobus quadratus* verdeckt und verdeckt wiederum den *Lobus caudatus*. Der *Lobus hepatis dexter* wird durch eine tiefe frontale Fissur in zwei gleiche, pyramidenförmige (laterale und mediale) Anteile unterteilt. Anders als beim Menschen, wo der rechte Leberlappen deutlich größer ist als der linke, haben bei der Ratte rechter und linker Leberlappen annähernd die gleiche Größe (Martins and Neuhaus 2007). Der *Lobus caudatus* wird ebenfalls durch eine tiefe frontale Fissur in zwei Anteile gegliedert (*Proc. papillaris* und *Proc. caudatus*). Zwischen den beiden Processus verläuft der Ösophagus.

Die beim Menschen übliche portale Einteilung in 8 Segmente nach *Couinaud* kann bei der Ratte übernommen werden (Schmidt and Schmidt 1987). Sie ist in Abbildung 9 dargestellt.

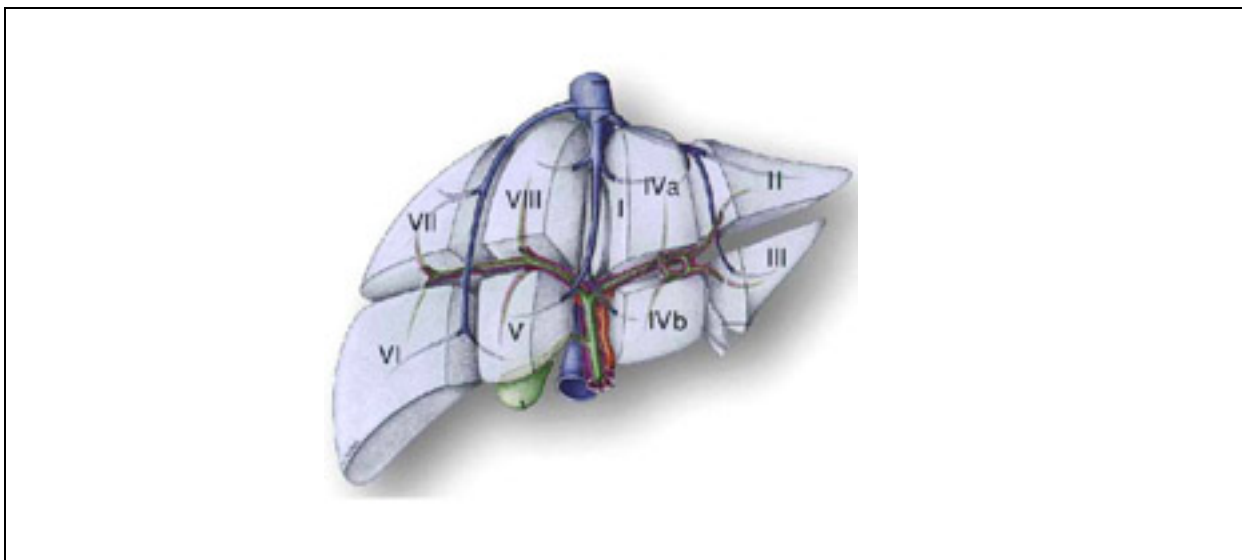


Abb. 9: Lebersegmente; Quelle: (www.onkochirurgie.de 2015)

1.6.1.3 Gefäßversorgung

Die Leber besitzt eine doppelte Blutversorgung. Den Hauptanteil mit 70-80% übernimmt die Pfortader (*Vena portae*), durch welche nährstoffreiches,

sauerstoffarmes Blut aus den unpaarigen Bauchorganen zur Leber fließt. 20-30% bekommt die Leber über die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*), die als Endast des *Truncus coeliacus* sauerstoffreiches arterielles Blut zur Leber transportiert.

Die Pfortader mit einem Durchmesser von 0,1 mm bis 2,0 mm (Wu, Xu et al. 2005) verläuft im *Ligamentum hepatoduodenale* und tritt gemeinsam mit der Leberarterie in die Leberpforte (*Porta hepatis*) ein. Hier spaltet sich die Pfortader in ihre Lappen- und Segmentäste auf. Über verschiedene Äste wird dann das Blut bis in die *Venae interlobulares* verteilt. Die *Rami terminales* aus den *Vv. interlobulares* versorgen schließlich das sinusoidale Kapillarnetz.

Für die arterielle Versorgung ist vor allem die *Arteria hepatica propria* zuständig. Nur der mediale und kraniale Anteil des *Lobus quadratus* werden zusätzlich von der *Arteria hepatica sinistra*, einem Endast der *Arteria gastrica sinistra*, versorgt. Die *Arteria hepatica propria*, deren Durchmesser zwischen 0,2mm und 0,8mm variiert (Wu, Xu et al. 2005), stammt aus der *Arteria hepatica communis*, die wiederum aus dem *Truncus coeliacus*, einem Ast aus der *Aorta*, abzweigt.

Die Aufzweigung der Arterien in ihre Lappen- und Segmentäste erfolgt bis zu den *Arteriae interlobulares* weitgehend analog zur Pfortader. Allerdings münden die Interlobulararterien nicht nur in das sinusoidale Kapillarnetz, sondern ergießen sich zusätzlich in das interlobuläre Gewebe.

Die *A. hepatica*, die *V. portae* und der Gallengang (*Ductus choledochus*), sowie deren Äste verlaufen stets gemeinsam zu den einzelnen Segmenten (Junquera LC 1996). In die Sinusoide tritt also sowohl das arterielle, wie auch das portal-venöse Blut ein. Nach Durchfließen der Sinusoide gelangt das arteriovenöse „Mischblut“ in die Zentralvenen (*Venae centrales*) im Leberläppchen. Am Außenrand des Leberläppchens stößt die Zentralvene auf eine Schaltvene. Diese verlaufen entlang der Läppchenbasis und vereinigen sich schließlich zu Sammelvenen. Das venöse Blut konfluert schließlich läppchen- und segmentweise zu den Lebervenen (*Venae hepaticae*), die dann in die *Vena cava inferior* münden (Junquera LC 1996) (Abb.10).

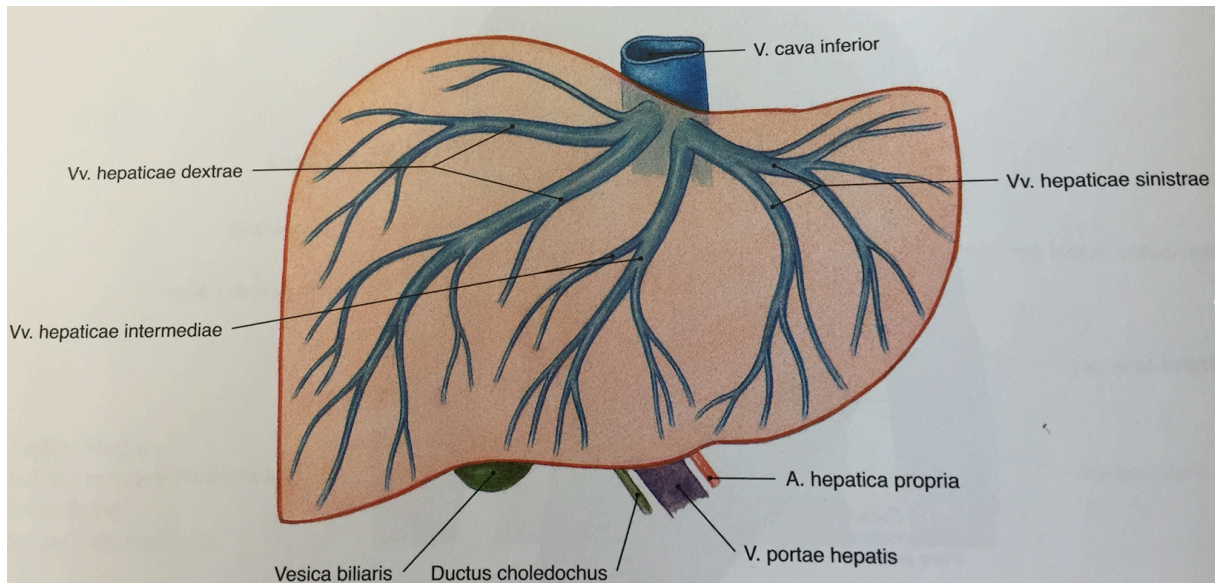


Abb. 10: Lebervenen. Quelle:(Putz R. 2007)

1.6.1.4 Ligamente

Das *Ligamentum falciforme* entspringt, wie schon erwähnt, an der *Fissura umbilicalis*, welche den *Lobus quadratus* in einen rechten und einen linken Teil unterteilt und stellt die Verbindung der Leber mit dem Zwerchfell und der Bauchwand dar. Im *Ligamentum falciforme* verläuft die obliterierte Nabelvene als *Ligamentum teres hepatis* (Martins and Neuhaus 2007).

Das ventral und lateral am Austritt der *Vena cava inferior* entspringende *Ligamentum coronarium* stellt eine weitere Verbindung zwischen Leber und Zwerchfell dar. Das kleine Netz (*Omentum minus*) zieht von der kleinen Magenkurvatur (*Curvatura gastrica minor*) zur Viszeralfläche der Leber und ist hier mit der Leberpforte verbunden. Es setzt sich aus dem *Ligamentum hepatogastricum* und dem *Ligamentum hepatoduodenale* zusammen. Der *Lobus quadratus* und der *Lobus hepatis dexter* sind über das *Ligamentum triangulare sinister* bzw. *dexter* mit dem Zwerchfell verbunden. Diese Bänder ziehen von der Leber aus nach dorsolateral (Martins and Neuhaus 2007).

1.6.1.5 Gallengang und Gallenblase

Der *Ductus choledochus* entsteht aus der Konfluenz der Gallengänge der Leberlappen und verläuft dann im *Ligamentum hepatoduodenale* dorsal am

Duodenum und ventral an Teilen des Pankreas. Er ist zwischen 12mm und 16mm lang und hat einen Durchmesser von ca. 1mm. Der Gallengang mündet ca. 20mm distal des *Pylorus* in einer 1mm breiten Papille in das Duodenum. Vor dieser Einmündung nimmt er Gänge aus der Bauchspeicheldrüse auf. Eine Gallenblase gibt es bei der Ratte nicht (S. 1958, Martins and Neuhaus 2007).

1.6.2 Mikroskopische Anatomie

Die Leber wird von einer dünnen bindegewebigen Kapsel, der *Glisson-Kapsel*, umgeben. Ihre Ausläufer strahlen ausgehend von der Leberpforte als feines Bindegewebsgerüst in das Leberinnere ein und gliedern das Parenchym in Läppchen. Außerdem umschließen sie die Gefäße der *Arteriae* und *Venae interlobulares* und die interlobulären Gallengänge. Jeweils ein Ast der A. und V. interlobulares zusammen mit einem Gallengang wird als *Glissonsche Trias* bezeichnet. Insgesamt ist aber der Bindegewebsanteil der Leber, insbesondere der Rattenleber, sehr gering.

Es gibt drei Konzepte zur Strukturierung des Leberparenchyms, diese sind in Abbildung 11 dargestellt.

1. klassisches Leberläppchen
2. Portalvenenläppchen
3. Leberazinus

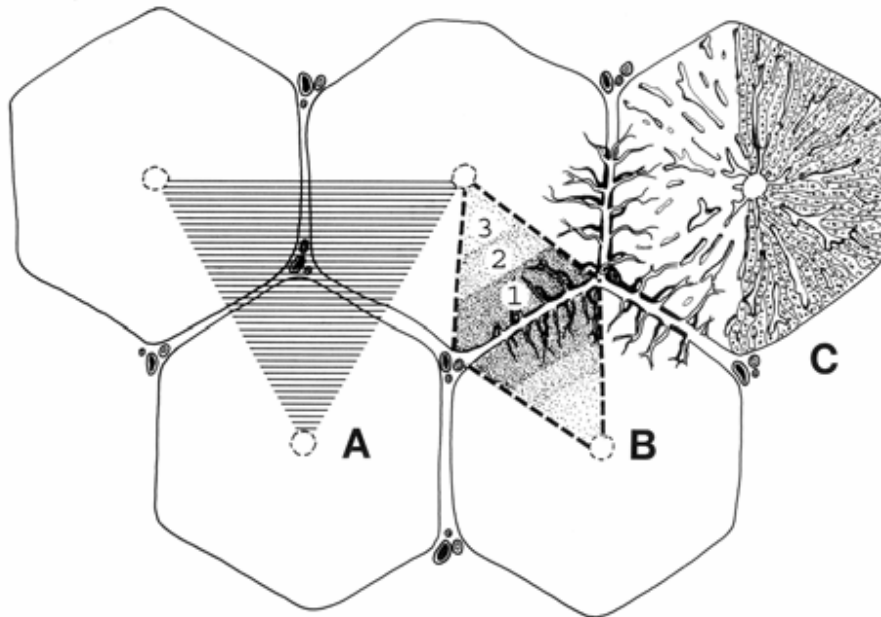


Abb. 11: Gliederung der Leber; LIEBICH (1999)

A: Portalvenenläppchen mit Lebertrias

B: Leberazini mit zonaler Gliederung nach Rappaport

C: klassisches Leberläppchen mit Zentralvene

1: periportale Zone

2: midzonale Zone

3: perizentrale Zone

1.6.2.1 Leberläppchen

Das Leberläppchen stellt die anatomische Grundeinheit der Leber dar. Hier steht die Zentralvene im Mittelpunkt. Durch die radiäre Anordnung der Leberzellbälkchen und der Sinusoide kommt es zu der charakteristischen sechseckigen Struktur, deren Zentrum die Zentralvene bildet (Storch V. 2002).

Die periportalen Felder zwischen den Leberläppchen sind aus lockerem Bindegewebe aufgebaut und enthalten die *Aa. und Vv. interlobulares* sowie einen Gallengang. Wie schon erwähnt, werden diese Strukturen als *Glisson-Trias* bezeichnet. Aus dem Periportalfeld werden die benachbarten Leberläppchen mit Blut versorgt. Die Endverzweigungen der Pfortader und der Leberarterie verschmelzen schon in der Peripherie der Läppchen, sodass das Läppchen von einem Mischblut durchströmt wird, dessen Sauerstoffgehalt in der Peripherie höher ist als im Läppchenzentrum.

Das klassische Leberläppchen setzt sich aus radiär angeordneten Leberzellen, den sogenannten Leberzellbalken, zusammen. Diese laufen auf die Zentralvene zu. Dazwischen liegen die Sinusoide (dünnwandige, relativ weite kapillarähnliche Blutgefäße), die in die Zentralvene einmünden (Storch V. 2002). Zuflüsse bekommen die Sinusoide aus den Endästen der Triasgefäße. Die Sinusoide besitzen keine Basalmembran. Ihre Innenauskleidung besteht zum Großteil aus Endothelzellen, es finden sich jedoch auch *v.-Kupffer-, Ito- und Pitzellen*.

Zwischen Endothel und Leberzellen befindet sich ein schmaler Bindegewebsraum, der sogenannte *Disse'sche Raum* (Storch V. 2002). Über Poren und intrazelluläre Öffnungen steht das Kapillarlumen mit dem *Disse'schen Raum* in Verbindung. Die *Mikrovilli* der *Hepatozyten* ragen in den *Disse'schen Raum* hinein und führen so zu direktem Kontakt zwischen Leberzelle und Kapillarblut. So kommt es zu einer großen Kontaktfläche zwischen Leberzellen und Leberkapillaren. Über Poren stehen benachbarte Sinusoide in Verbindung. Diese Verbindungen werden *intersinusoidale Sinusoide* genannt.

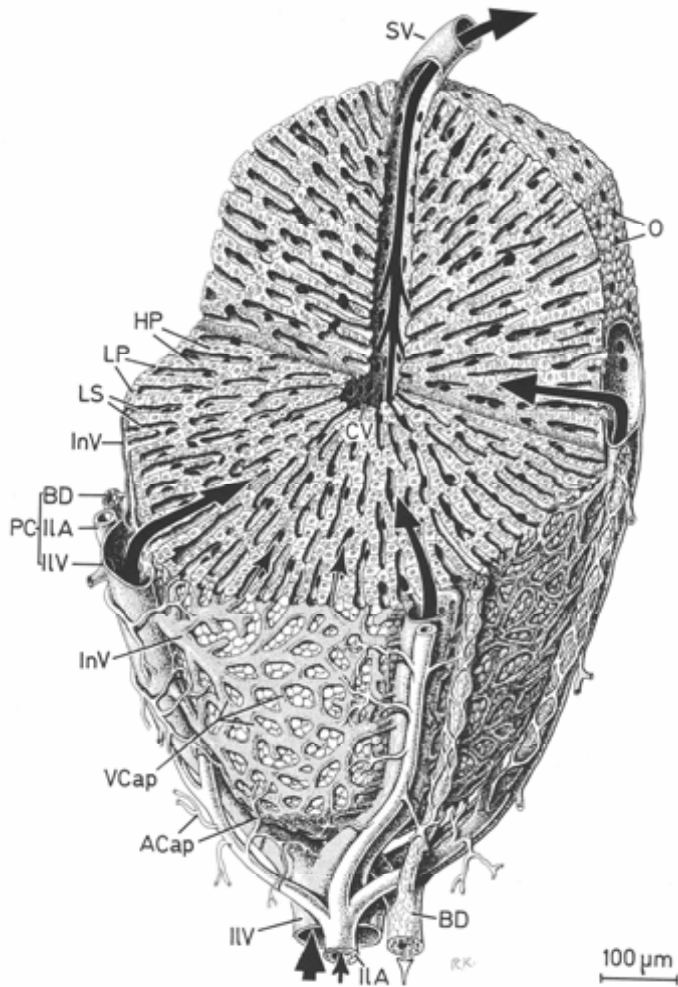


Abb. 12: klassisches Leberläppchen; KRSTIC 1991

ACap: arterielle Kapillaren

BD: Gallengang

HP: Hepatozytenplatten

IIA: interlobuläre Arterie

IIV: interlobuläre Vene

InV: interlobuläre Venolen

LP: Lamina terminalis

LS: Lebersinusoid

O: interzelluläre Öffnungen

PC: Trias

SV: sublobuläre Vene

VCap: venöse Kapillaren

1.6.2.2 Portalvenenläppchen

Beim Portalvenenläppchen stehen funktionelle Zusammenhänge im Vordergrund. Es besteht aus drei Zentralvenen, die sich um einen zentralen Gallengang anordnen

und beschreibt somit den Parenchymbereich, dessen Galle in den gemeinsamen interlobulären Gallengang fließt. Im Mittelpunkt steht also das Gallengangssystem und somit der exokrine Drüsencharakter der Leber.

1.6.2.3 Leberazinus

Als weitere funktionelle Einheit der Leber definierte *Rappaport* den Leberazinus (Rappaport, Borowy et al. 1954). Er legte dabei besonders Wert auf die mikrozirkulatorische Komponente des Azinus. Ein Leberazinus besteht aus einer Geweberegion, deren Achse von den Ästen der interlobulären Vene und Arterie, sowie dem Gallengang gebildet wird. Je eine *Glisson-Trias* bildet Anfang und Ende der Gefäßachse. Der Azinus hat im Anschnitt eine rhombenförmige Gestalt. Seine spitzen Eckpunkte werden von zwei benachbarten Zentralvenen gebildet.

Die Sinusoide verlaufen radiär von der Achse des Azinus auf die Zentralvenen zu. Entlang des Verlaufs der Sinusoide unterscheidet man drei Zonen, die sich anhand des Sauerstoffgehalts im Blut und anderer funktioneller Parameter unterscheiden (siehe dazu Abbildung 11):

- **Zone 1 = *periportale Zone***: spindelförmige Zone in der Nähe der Azinusachse; höchster Nährstoff- und Sauerstoffgehalt
- **Zone 2 = *midzonale Zone***: intermediäre Zone; Nährstoff- und Sauerstoffgehalt nimmt im Vergleich zu Zone 1 ab
- **Zone 3 = *periphere Zone***: Zentralvenenbereich; der Sauerstoffgehalt entspricht dem Blut einer Vene; die Nährstoffe wurden größtenteils schon resorbiert; enthält viele Stoffwechselmetabolite.

Aus diesem Sachverhalt ergibt sich die Erkenntnis, dass die Hepatozyten in Zone 3 am vulnerabelsten auf Hypoxie, Nährstoffmangel und Durchblutungsschwankungen reagieren.

1.6.2.4 Das Gallengangsystem

Die von den Hepatozyten gebildete Galle wird in einem eigenen Gangsystem gesammelt. Dieses System besteht aus Gallekapillaren, die keine epitheliale Gefäßwand besitzen. Vielmehr bildet die Oberflächenmembran der Hepatozyten ihre Begrenzung. Es kommt also durch eine Erweiterung des interzellulären Raumes zur Entstehung von Gallenkanälchen (*Canaliculi biliferi*), die sich dann zu einem tubulären Gangsystem zusammenschließen. Die Gallenkanälchen haben einen Durchmesser von ca. 1µm (Doerr 2000).

In den *Canaliculi biliferi* fließt die Galle in einer dem Blut entgegengesetzten Richtung und gelangt schließlich in Gallengänge, die noch außerhalb der periportalen Felder beginnen. Diese werden als *Hering-Kanälchen* bezeichnet und münden im periportalen Feld in die Gallengänge (*Ductus interlobulares biliferi*). Schließen sich mehrere *Ductus interlobulares* zusammen, entstehen immer größere Gallengänge (*Ductus biliferi*), die sich schlussendlich zum Hauptausführungsgang, dem *Ductus choledochus*, vereinigen. Dieser verlässt an der Leberpforte das Organ, verläuft im *Ligamentum hepatoduodenale* und nimmt vor der Einmündung ins Duodenum die Gänge des Pankreas auf. Die Ratte besitzt keine Gallenblase (H.B. 1980).

1.6.3 Der zelluläre Aufbau der Leber

Die Leber besteht zu ca. 80% aus zellulären Bestandteilen und zu ca. 20% aus einem Extrazellulärraum (Sinusoide, *Disse'scher* Raum, Gallengänge und extrazelluläre Matrix). Den größten Anteil am zellulären Volumen bilden mit ca. 74% die Hepatozyten. Den Rest der Zellen bilden die mesenchymalen, sinusoidalen Nicht-Parenchymzellen. Diese Gruppe setzt sich zusammen aus sinusoidalen Endothelzellen, *v.-Kupfferzellen*, *Ito-Zellen* und *Pit-Zellen*.

1.6.3.1 Hepatozyten

Hepatozyten sind 15-30 µm groß und haben eine sechseckige Form. Sie besitzen einen schmalen Gallepol, mit dem sie an die Gallencanaliculi grenzen, und einen breiten Blutpol, der an die Sinusoide grenzt (Storch V. 2002).

Ihren vielen verschiedenen Leistungen, wie Synthese, Umbau und Speicherung von Stoffen sowie Entgiftung des Organismus entsprechend, weisen sie einen vielfältigen Zellorganellenbestand auf. Hepatozyten können je nach Funktionszustand mehrere polyploide Zellkerne besitzen. Auf Grund der hohen Stoffwechselleistung der Leber haben die Hepatozyten eine hohe Anzahl an Mitochondrien, die als Kraftwerke der Zellen Energie liefern. Das raue endoplasmatische Retikulum liegt in den Hepatozyten als dichtes Netz vor und ist für die Proteinsynthese (Globuline, Fibrinogen, Gerinnungsfaktoren etc.) verantwortlich. Das glatte endoplasmatische Retikulum hingegen ist im Plasma der Hepatozyten diffus verteilt. Es ist am Fettstoffwechsel beteiligt (Synthese von Lipoproteinen, Phospholipiden, Cholesterin, Triglyceriden und freien Fettsäuren) und spielt eine zentrale Rolle bei der Biotransformation endogener und exogener toxischer Substanzen. Außerdem ist es für die Produktion und Sekretion der Galle verantwortlich, welche dann am Gallepol in die Gallencanaliculi abgegeben wird. Der Golgi-Apparat speichert die im rauen und glatten endoplasmatischen Retikulum gebildeten Substanzen. Gleichzeitig ist er der Bildungsort zahlreicher Enzyme und von intrazellulären Membranen.

Innerhalb der Zellen befinden sich weiterhin Einschlusskörper wie Glykogen und Fettvakuolen. Fetttröpfchen sind in einer gesunden Leber selten, liegen aber bei pathologischen Vorgängen und Veränderungen vermehrt im Zytoplasma vor (Junquera LC 1996).

1.6.3.2 V.-Kupfferzellen

Die *v.-Kupfferzellen* stammen von Monozyten ab und gelangen über den Blutstrom in die Leber. Sie sind Bestandteil des retikuloendothelialen Systems. In der Leber differenzieren sie sich zu ortsständigen Makrophagen (Naito, Hasegawa et al. 2004). Sie bilden einen Teil der endothelialen Wandauskleidung der Sinusoide und sind häufig an strategischen Punkten zu finden. Mit ihren Zytoplasmafortsätzen haften sie reversibel am Kapillarendothel der gleichen aber auch der gegenüberliegenden Seite an, durchdringen die Kapillarwand und ragen in den *Disse'schen Raum*.

Eine Hauptaufgabe der *v.-Kupfferzellen* liegt in der Phagozytose von Zellfragmenten, geschädigten Blutzellen und Mikroorganismen, die mit dem Blut in die Leber gelangen.

Die *v.-Kupfferzellen* machen etwa 30% der Sinusoidwandzellen aus. Sie haben einen großen, ovalen und relativ chromatinreichen Kern. Sie sind reich an Zellorganellen, besonders Peroxisomen und zeichnen sich durch eine hohe Peroxidaseaktivität aus (Naito, Hasegawa et al. 2004).

1.6.3.3 Ito-Zellen

Die *Ito-Zelle*, auch Lipozyt oder hepatische Sternzelle genannt, befindet sich subendothelial im *Disse'schen Raum*. In ihren charakteristischen Fetttropfchen speichert die *Ito-Zelle* einen Großteil des im Körper vorhandenen Vitamin-A und ist somit zuständig für die Vitamin-A-Homöostase im Körper (Senoo 2004).

Ito-Zellen können zwei Funktionszustände einnehmen. Neben der physiologischen Vitamin-A-Speicherfunktion im Ruhezustand können sie z.B. bei einem Leberschaden induziert durch Botenstoffe wie TNF- α , IL-1 und TGF- β in ihren aktiven Zustand überführt werden. Aktiviert können sich *Ito-Zellen* in myofibroblastenähnliche Zellen umwandeln (Hautekeete and Geerts 1997), die dann extrazelluläre Matrix (Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine), also Bindegewebe produzieren (Senoo 2004). Es konnte somit festgestellt werden, dass *Ito-Zellen* eine aktive Rolle bei der Entstehung von Leberfibrose und -zirrhose spielen (Hautekeete and Geerts 1997).

Ferner besitzen *Ito-Zellen* Zytoplasmafortsätze, welche kontraktile Elemente haben. Diese Fortsätze umschlingen Endothelzellen und führen bei Kontraktion zur Einengung des Lumens von Sinusoiden. Auf diese Weise nehmen Ito-Zellen Einfluss auf die Mikrozirkulation der Leber (Flisiak 1997).

1.6.3.4 Pit-Zellen

Pit-Zellen sind spezialisierte Lymphozyten, die man im Lumen der Sinusoide an Endothelzellen und *v.-Kupfferzellen* haftend findet. Sie gehören zu den nicht-parenchymatösen Zellen des Lebergewebes.

Ihre Gestalt ist lokalisationsabhängig. Das Zytoplasma ist arm an Organellen und enthält kaum Glykogen. Der Kern von *Pit-Zellen* entspricht in seinen Merkmalen einem Lymphozytenkern (Nakatani, Kaneda et al. 2004).

Pit-Zellen sind leberspezifische Natürliche Killerzellen (NK-Zellen)(Kaneda, Kurioka et al. 1984, Nakatani, Kaneda et al. 2004). Sie zeigen viele morphologische Eigenschaften wie NK-Zellen. NK-Zellen erkennen ihre Zielzellen mit ihren Oberflächenrezeptoren. Sie besitzen, unter anderem, antitumoröse Eigenschaften indem sie, durch das Freisetzen von Perforinen und Enzymen, in den Zielzellen Apoptose auslösen (Nakatani, Kaneda et al. 2004). Außerdem produzieren sie viele verschiedene Zytokine (z.B. IFN- γ), welche die Aktivität anderer immunkompetenter Zellen steigern (Nakatani, Kaneda et al. 2004).

1.6.4 Technik der orthotopen Rattenlebertransplantation

S. Lee gilt als Pionier in der Entwicklung der Rattenlebertransplantation. Er stellte 1973 das erste Modell der orthotopen Rattenlebertransplantation (oRLTx) vor (Lee, Charters et al. 1973).

Analog zur Humanlebertransplantation verwendete er einen extrakorporalen porto-jugulären Bypass, um das Splanchnikus-Gebiet während der anhepatischen Phase zu entlasten, in dem in diesem Zeitraum erhöhte Druckverhältnisse herrschen.

Lee führte die Anastomosen der *suprahepatischen* und *infrahepatischen Vena cava* sowie der *Vena portae* in mikrochirurgischer Nahttechnik durch. Die arterielle Versorgung des Transplantats erfolgte mit Hilfe eines langen Aortensegments, das er an der Spenderleber stehen ließ und mit der Aorta des Empfängers End-zu-Seit anastomosierte. Den Gallengang des Spenders implantierte er in das Duodenum des Empfängers. Auf diese Weise führte er die ersten 67 erfolgreichen Lebertransplantationen an der Ratte durch und erzielte eine Überlebensrate von 74% (Lee, Charters et al. 1973). Die Technik war jedoch sehr komplex und anspruchsvoll, so dass zunächst keine andere Forschergruppe in der Lage war, diese Methode zu reproduzieren (R. 1985).

Zwei Jahre Später veröffentlichte Lee eine vereinfachte und daher leichter zu reproduzierende Technik der oRLTx. Er veränderte sein bisheriges Modell an zwei wesentlichen Stellen. Einerseits verzichtete er auf die Arterialisierung der Spenderleber mit der Begründung, dass die transplantierte Rattenleber auch ohne arteriellen Zufluss die Transplantation gut toleriere und sogar für eine lange Zeit im Empfänger normal ihre Aufgaben übernehme. Dies vereinfachte die Prozedur und

eliminierte das Risiko von Blutungen aus der Anastomose, welche eine häufige Komplikation darstellten. Andererseits veränderte er die Reihenfolge der Anastomosen und den Zeitpunkt der Reperfusion. In der anhepatischen Phase führte er die Anastomosen der *suprahepatischen Vena cava inferior* und der *Vena portae* durch. Danach gab er den Blutfluss durch die Leber frei und erreichte so eine Verkürzung der anhepatischen Phase von 35-40 Minuten auf 25 Minuten. Nach der Reperfusion anastomosierte er die *Vena cava infrahepatica*. Durch diese Verkürzung der anhepatischen Phase konnte nun auf den extrakorporalen Shunt verzichtet werden, wodurch wiederum einige Komplikationen bei der Transplantation vermieden wurden (Lee S 1975).

N. Kamada und *R.Y. Calne* revolutionierten im Jahre 1979 die Technik der Rattenlebertransplantation. Sie verzichteten wie S. Lee auf eine Arterialisierung und den extrakorporalen Shunt. Sie verwendeten allerdings für die Anastomose der *Vena portae* und der *infrahepatischen Vena cava inferior* Polyäthylen-Cuffs, was die Anastomosierung deutlich vereinfachte und dadurch die anhepatische Phase wiederum verkürzte, auf nur noch 15-17 Minuten (Kamada and Calne 1979, Kamada and Calne 1983, Settaf, Gugenheim et al. 1986, Kamada 1987). Da die Implantation des Gallengangs in das Dudodenum, wie von S. Lee beschrieben, häufig zu ascendierender Cholangitis, Gallengangsnekrosen und zu lokalen Nekrosen des Duodenums führte, modifizierten *N. Kamada* und *R.Y. Calne* auch die Rekonstruktion des Gallengangs. Sie verwendeten zwei Kunststoff-Splints, die nach Platzierung in den Gallengängen von Spender- und Empfängerleber teleskopartig ineinander geschoben und fixiert wurden. Durch die bei dieser Methode gewonnene Verkürzung der Pfortaderabklemmzeit erreichten *N. Kamada* und *R.Y. Calne* eine Überlebensrate (länger als eine Woche) der Tiere von ca. 83% (Kamada and Calne 1979, Kamada 1987). Bald wurde dieses Modell zur Erforschung von Konservierungsfragen und immunologischen Aspekten der Lebertransplantationen zahlreich verwendet (Kamada and Calne 1983, Tamaki, Kamada et al. 1986, Tamaki, Kamada et al. 1987).

Noch im selben Jahr (1979) veröffentlichte *F.A. Zimmerman* eine weitere Vereinfachung der oRLTx. Er rekonstruierte den Gallengang lediglich mit einem Teflon-Splint, auf den er sowohl den Gallengang der Spenderleber als auch den der

Empfängerleber aufzog und anschließend fixierte (Zimmermann, Butcher et al. 1979). *M. Miyata* verwendete dann 1980 die Cuff-Technik auch für die Anastomose der *suprahepatischen Vena cava inferior* und erreichte damit eine weitere Verkürzung der anhepatischen Phase auf 13-14 Minuten. Die Überlebensrate nach einer Woche stieg auf 85%, nach zwei Monaten lebten noch 55% der Tiere (Miyata, Fischer et al. 1980).

Auch *A. Settaf* stellte 1986 eine Technik der oRLTx vor, bei der die *suprahepatische Vena cava* Anastomose mit einem Cuff wiederhergestellt wurde. Er erreichte sogar eine Verkürzung der anhepatischen Phase auf 11 Minuten. Mit dieser Technik betrug die zwei-Monats-Überlebensrate schon 70% (Settaf, Gugenheim et al. 1986). 1988 beschrieb *S. Tsuchimoto* eine ähnliche Methode, mit der er eine 100-Tage-Überlebensrate von 71,4% erreichte (Tsuchimoto, Kusumoto et al. 1988).

R. Engemann publizierte wiederum 1985 eine oRLTx-Technik mit Rearterialisierung. Wie *S. Lee* führte er die Anastomose mit einem Spender-Aortensegment durch, das er End-zu-Seit mit der Empfänger-Aorta anastomosierte. Er verzichtete auf Kunststoff-Cuffs und führte alle Gefäßanastomosen in mikrochirurgischer Nahttechnik durch. Zur Rekonstruktion des Gallengangs verwendete er wie *F.A. Zimmermann* einen Teflon-Splint (Kamada and Calne 1979, Zimmermann, Butcher et al. 1979, R. 1985).

Einige Studien haben erfolgreiche Rattenlebertransplantationen ohne Arterialisierung der Empfängerleber gezeigt (Lee S 1975, Kamada and Calne 1979). Allerdings weiß man heute, dass sich eine Rearterialisierung nach orthotoper Rattenlebertransplantation positiv auf das Transplantat auswirkt (Fan, Praet et al. 2000).

Y. Hasuike, *R. Steffen* und *W. Gao* entwickelten verschiedene Rearterialisierungstechniken:

- 1988 anastomosierte *Y. Hasuike* die rechte *Arteria renalis* des Empfängers mit einem Spender-Aortensegment mit Hilfe der Cuff-Technik (Hasuike, Monden et al. 1988).

- 1989 stellte *R. Steffen* ein Modell vor, bei dem der *Truncus coeliacus* des Spenders mit der *Arteria hepatica communis* des Empfängers unter Verwendung eines Cuffs anastomosiert wurde (Steffen, Ferguson et al. 1989).
- 1993 war *W. Gao* der erste, der einen Kunststoffsplint für die Anastomose der Leberarterie nutzte (Gao, Lemasters et al. 1993).

1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die orthotope Lebertransplantation stellt dank der Optimierung chirurgischer Technik und dem Einsatz neuer Immunsuppressiva ein Verfahren mit akzeptablen Langzeitergebnissen dar. Trotz der fortschreitenden Entwicklung kommt es bei einigen lebertransplantierten Patienten zu einer oder mehreren Abstoßungsreaktionen, die zu einer drastischen Erhöhung der immunsuppressiven Therapie führen, um den drohenden Transplantatverlust zu verhindern. Akute Abstoßungsreaktionen bestimmen also noch immer maßgeblich die Morbidität und Mortalität des Organempfängers.

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde der Einfluss der prolongierten Ischämie auf die akute Abstoßungsreaktion nach orthotoper Lebertransplantation untersucht. Hierfür wurde der Ischämie-/Reperfusionsschaden mittels konventioneller Histologie und Laboranalytik evaluiert und die nach Reperfusion erfolgte Immunmodulation mittels Immunhistochemie quantifiziert. Es wurde postuliert, dass der intensivere Ischämie-/Reperfusionsschaden aufgrund prolongierter Ischämie zu einer beschleunigten und verstärkten akuten Abstoßungsreaktion führt.

2 Material und Methode

2.1 Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche, die in dieser Studie durchgeführt wurden, waren zuvor gemäß dem Tierschutzgesetz von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern,

München, BRD) unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.3-18-05 genehmigt worden.

2.2 Versuchstiere

Zur Durchführung der Experimente wurden männliche weiße Lewis-Ratten und männliche graue DA- (Dark Again) Ratten (Charles-River Wiga GmbH, Sulzfeld, BRD) mit einem Gewicht von ca. 220-250g verwendet. Hierbei wurde das Gewicht des Empfängers ca. 10-20g höher als das des Spenders gewählt, um die Lebertransplantation technisch zu erleichtern und das Transplantationsergebnis zu optimieren.

Die Tiere wurden in Macrolonkäfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, BRD) auf Einstreu, bei einer Raumtemperatur von 19-24°C sowie einem Beleuchtungsintervall von 06:00 bis 18:00 Uhr im Tierstall des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) der TU München, Klinikum Rechts der Isar, gehalten. Sie erhielten Wasser und eine Haltungsdiät (Pressfutter, Altromin 1324 Standarddiät, Lage, BRD) jeweils *ad libitum*.

2.3 Versuchsgruppen

Es erfolgte eine Einteilung in drei Gruppen mit zweistündiger, sechsständiger und achtständiger Ischämiedauer. Jede Gruppe umfasste 4 Tiere (n=4) bei denen die Ltx erfolgreich durchgeführt wurde. Auf ein postoperatives Überleben und Beobachten wurde aufgrund der Fragestellung verzichtet, so dass die Tiere nach erfolgreicher Transplantation *lege artis* euthanasiert wurden.

2.4 Chirurgisches Vorgehen

2.4.1 Vorbereitung und Anästhesie:

Präoperativ mussten die Tiere eine 8-stündige Nahrungskarenz einhalten.

Zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose wurde *Isofluran* (1-Chlor-2,2,2-trifluoräthyl-difluormethyläther) -*Forene*® (Abbot GmbH, Wiesbaden, BRD) mit einem entsprechenden Verdampfer (Fa. Völker, BRD) verwendet. Diese Narkoseform

zeichnet sich durch eine gute Steuerbarkeit und gute Dosierungsmöglichkeit, sowie eine geringe Metabolisierungsrate (0,17%) des Isoflurans aus, wodurch es zu einer nur geringen Belastung für Leber und Nieren kommt und so eine Organschädigung unwahrscheinlich macht (Imai, Kon et al. 1996). Außerdem ist diese Narkose gerade in der anhepatischen Phase sehr gut zu steuern.

Die therapeutische Konzentration des Isoflurans liegt bei 1,0-2,0 Vol%, die anhand des schon genannten Verdampfers (Fa. Völker, BRD) geregelt wird. Als Träger des Narkosegases wurde 100%iger Sauerstoff verwendet.

Eine Prämedikation ist bei der Isofluran-Narkose einer Ratte nicht notwendig. Zur Narkoseeinleitung wurde die Ratte in eine Ganzkörperkammer aus Plexiglas mit einer Länge von ca. 30cm und einem Durchmesser von ca. 10cm gesetzt. An beiden Deckflächen der Kammer ist ein Anschluss für den Narkosegas zu- und Narkosegas abführenden Schlauch des Narkosegeräts befestigt. Nach Einsetzen der Ratte in die Ganzkörperkammer wurde eine Isoflurankonzentration von 5 Vol% in dieser erzeugt, was nach ca. einer Minute zu einer vollständigen Anästhesie des Tieres führte.

Die Narkosetiefe lässt sich durch Beobachtung der Atmung und des Muskeltonus bestimmen. Bei ausreichender Narkosetiefe ist die Atmung ruhig, der Muskeltonus aufgehoben und die Muskelreflexe erloschen. Nach Erlöschen der Stellreflexe wurde die Ratte aus der Kammer entnommen und auf dem OP-Tisch platziert (Abb. 13).

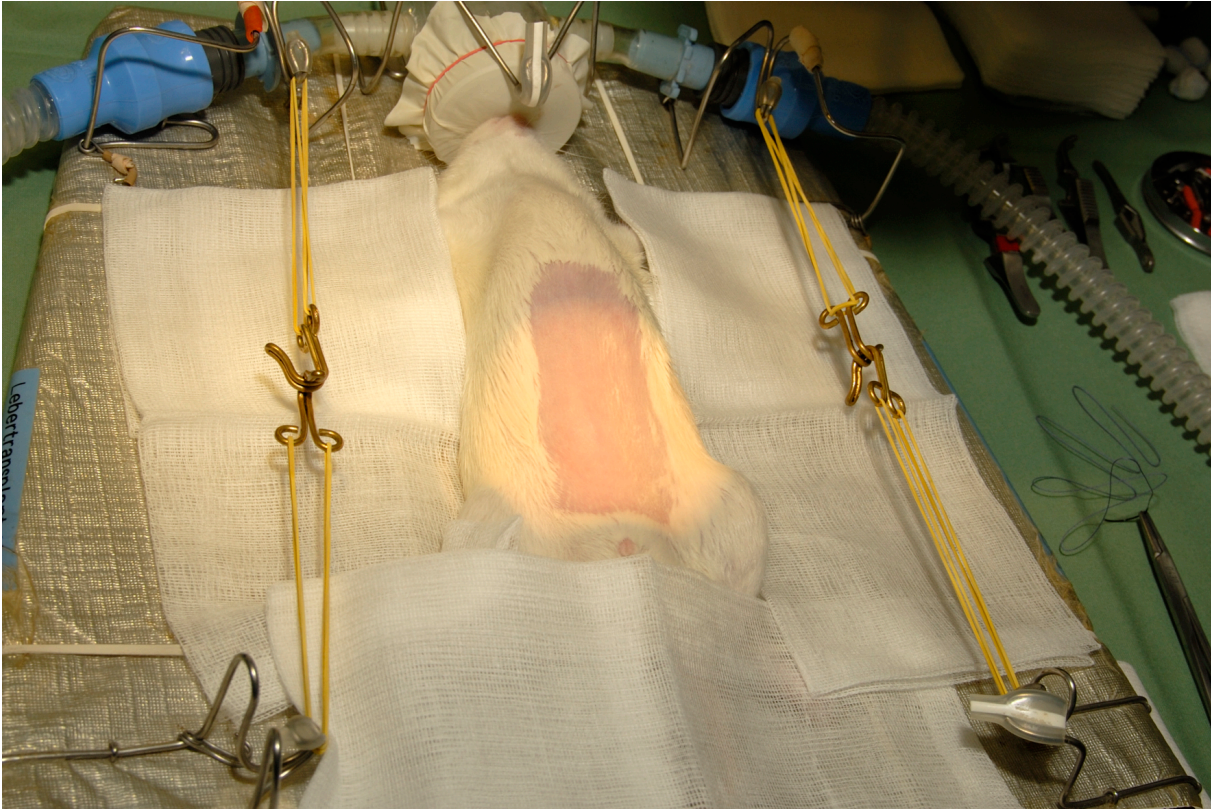


Abb. 13: Lagerung der Ratte auf dem OP-Tisch

Die Nasenspitze der Ratte wurde in einer Narkosekammer, die auf dem OP-Tisch angebracht war, fixiert. Dabei handelte es sich um einen Kunststoffzylinder mit einer Länge von ca. 6cm und von ca. 4cm Durchmesser, an dessen Seitenflächen zwei Schläuche mit Verbindung zum Narkosegerät angebracht waren, so dass in ihr eine Isofluran-Konzentration von 1,5-2,5 Vol% aufrechterhalten werden konnte.

Auf diese Weise war eine konstante Narkotisierung gewährleistet. Als Kontrolle der Narkosetiefe wurde die Atemfrequenz der Tiere herangezogen, da eine zu tiefe Narkose eine Atemdepression oder gar einen Atemstillstand hervorrufen kann. Wiederum führt eine zu oberflächliche Narkose aufgrund des erhalten gebliebenen Schmerzempfindens zu einer Erhöhung der Atemfrequenz als Folge der Stressreaktion.

Nachteile der Isofluran-Narkose sind die Abnahme des Blutdrucks und eine Erhöhung der Herzfrequenz (Eger 1981), jedoch überwiegen die Vorteile der einfachen Handhabung, der guten Steuerbarkeit und der Abnahme des portalen Gefäßwiderstands (Cray, Crawford et al. 2001, Schmidt, Hoetzel et al. 2004).

Um ein Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurde der OP-Tisch durch eine Wärmematte (Fa. Horn GmbH, Gottmadingen, BRD) auf 37°C erwärmt.

2.4.2 Spenderoperation

Zu Beginn der Operation wurde die Bauchhaut rasiert und desinfiziert. Nach medianer Laparotomie von der Symphyse bis zum *Xiphoid* wurde der Situs mit Hilfe von vier Gummizügen aufgespannt und in dieser Lage fixiert (Abb. 14).

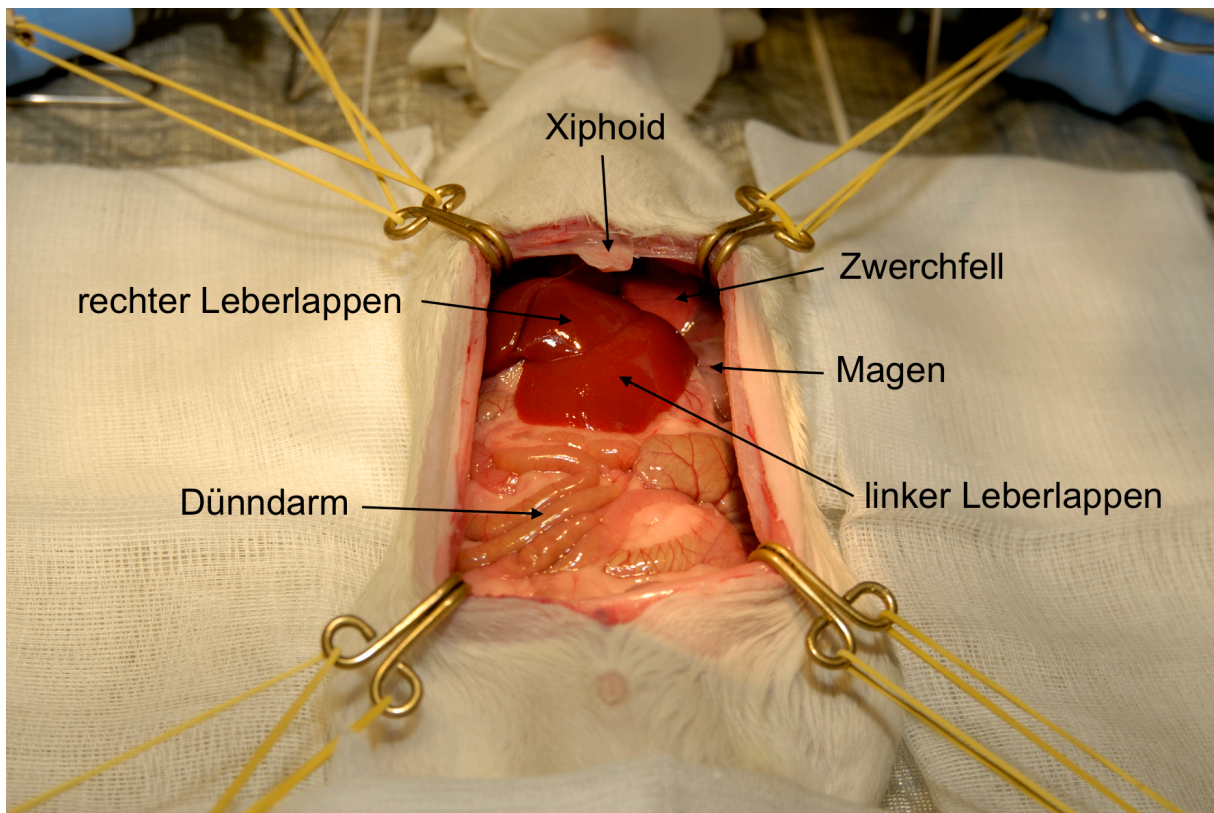


Abb. 14: OP-Situs

Das *Xiphoid* wurde mittels Naht (Vicryl 3.0) nach kranial gezogen und fixiert.

Nach dem Ligieren der linken *V. phrenica* wurden das *Lig. falciforme*, die hepatogastrischen und hepatophrenischen Bänder durchtrennt. Das Gefäßkonvolut zwischen Leber und unterem Ösophagus wurde koaguliert und abgesetzt.

Zur Präparation des *Lig. hepatoduodenale* musste der *Lobus medianus* nach kranial geklappt werden (Abb. 15).

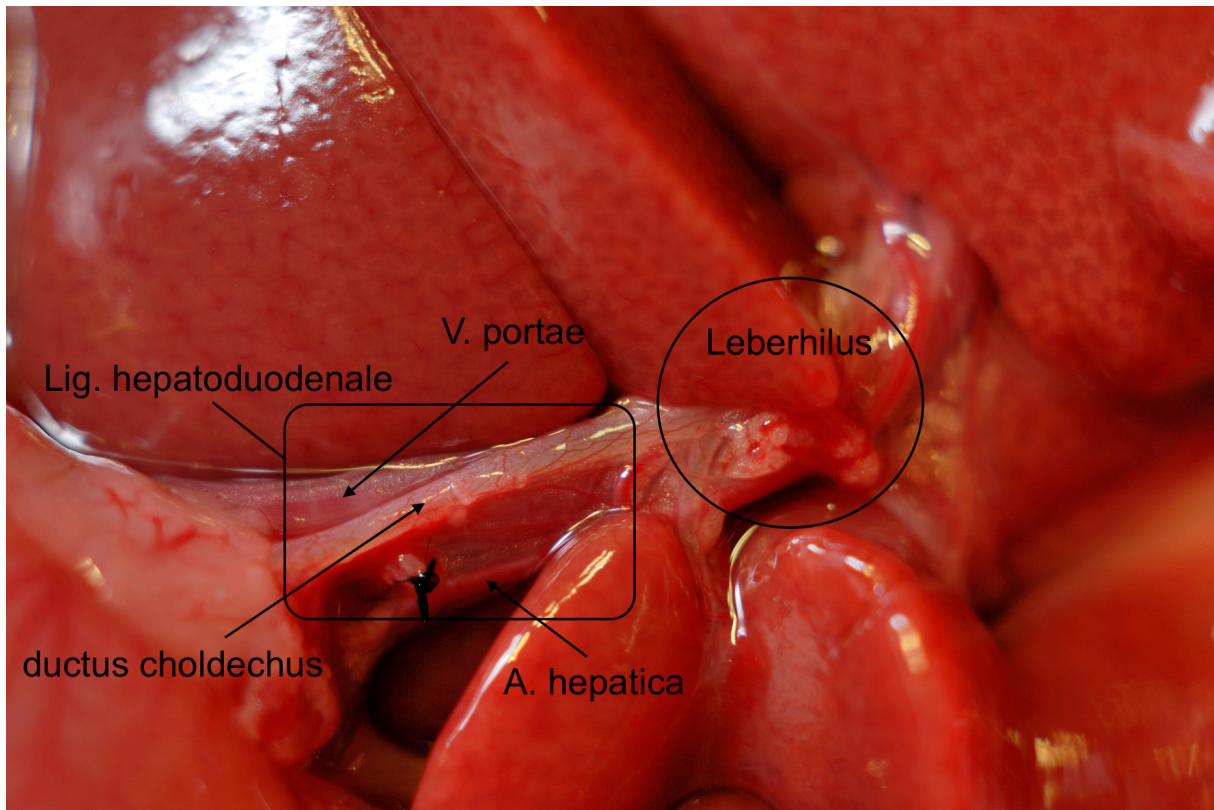


Abb. 15: Lig. hepatoduodenale und Leberhilus

Anschließend wurde das Darmkonvolut in eine feuchte Mullkompressе eingeschlagen und nach links gelagert. Zunächst wurde dann der *Ductus choledochus* freipräpariert, leberfern ligiert und durchtrennt. Da es für unsere Fragestellung (finaler Versuch) nicht relevant war, wurde der Gallengang im Empfängertier nicht anastomosiert.

Nun folgte die doppelte Ligatur und Durchtrennung der *V. gastroduodenalis* sowie das Freipräparieren der *V. portae* von der Einmündung der *V. lienalis* bis zur Leberpforte.

Nach Verlagerung des Darmkonvoluts nach rechts wurde die *A. gastroduodenalis* doppelt ligiert und abgesetzt, sowie der Verlauf der *A. hepatica propria* und *A. hepatica communis* bis zum *Truncus coeliacus* freipräpariert.

Nach Rückverlagerung des Darmkonvoluts nach links wurden die Abgänge der *A. gastrica sinistra* und der *A. lienalis* aufgesucht, die Arterien freipräpariert, doppelt ligiert und abgesetzt. Um den *Truncus coeliacus* vollständig einsehen zu können, wurde die *A. splenica* doppelt ligiert und durchtrennt. Nun konnte der *Truncus coeliacus* bis zur Aorta freipräpariert werden, so dass die arterielle Versorgung der Leber isoliert und von der Aorta bis zum Leberhilus mobilisiert war (Abb. 16).

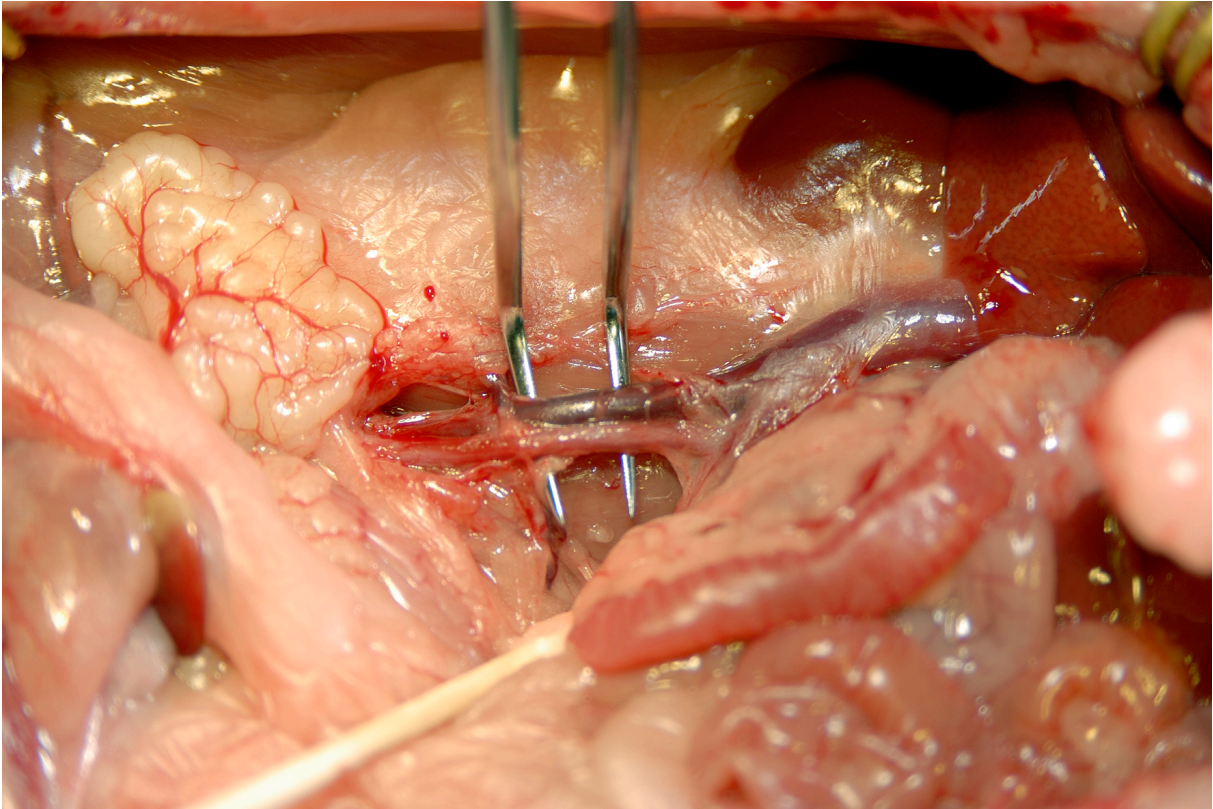


Abb. 16: frei präparierte Aorta abdominalis

Hierbei ist zu beachten, dass sich zwischen *Truncus coeliacus* und *A. mesenterica superior* eine derbe Bindegewebsplatte befindet, die durchtrennt werden muss.

Der infrahepatische Verlauf der *V. cava inferior* wurde nun oberhalb der Einmündung der linken *V. renalis* freigelegt und die rechte *V. suprarenalis* gemeinsam mit der benachbarten Lumbalvene cavanah koaguliert und abgesetzt.

Anschließend folgte die Ligatur der rechten *V. renalis*. Durch kurzzeitiges linksseitiges Verlagern der Leber konnten Leber und suprahepatische *V. cava inferior* von dorsal eingesehen und von Retroperitoneum und Diaphragma abgelöst werden.

Nach stumpfem Präparieren des Retroperitonealraumes folgte die Freilegung des Aortensegments vom Zwerchfelldurchtritt bis zur Bifurkation. Nun wurde die Aortenbifurkation mittels eines Mikrogefäßclips (Mehdorn-Bierner-Gefäßclip, Aesculap AG&Co KG, Tuttlingen, BRD) abgeklemmt.

2.4.3 Perfusion

Mit dem Abklemmen der infrahepatischen *V. cava* zwischen der Einmündung der rechten und linken *V. renalis* mittels Mikrogefäßclip begann die Perfusionsphase.

Im Anschluss wurde die Aorta oberhalb des *Truncus coeliacus* mit einem weiteren Microgefäßclip abgeklemmt.

Mit einer bifurkationsnahen Punktion der *Aorta abdominalis* und dem Einführen eines Perfusionskatheters (14-G, Venflon®2, ABOC Health Care Company, Helsingborg, Schweden) (Abb. 17) begann die Auswaschperfusion mit der auf 4°C gekühlten Perfusionslösung.

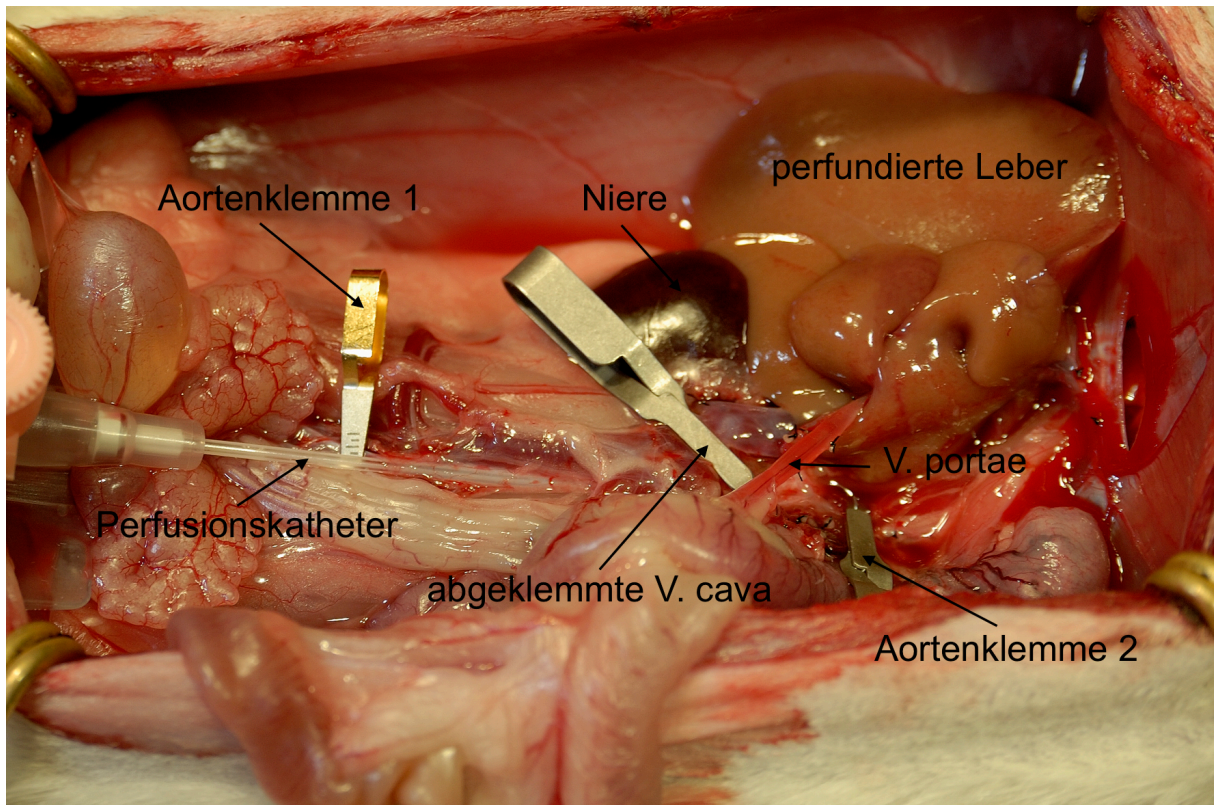


Abb. 17: Perfusion

Der Perfusionsdruck lag bei 100mmHg, entsprechend dem physiologischen Aortendruck der Ratte. Es wurden 50ml *Custodiol* verwendet, was dem zur Äquilibration erforderlichen 6-fachen des Organgewichts einer Ratte entspricht (Holscher and Groenewoud 1991).

Unmittelbar nach Beginn der Perfusion wurde über eine Zwerchfellinzision die suprahepatische *V. cava* durchtrennt, um einen durch die Perfusion bedingten Überdruck zu vermeiden und den Abfluss von Blut und Perfusat zu ermöglichen (Frenzel, Kremer et al. 1976).

Während der Perfusion wurde die suprahepatische *V. cava* direkt am Gefäß-Zwerchfell-Übergang zirkulär exzidiert und die zuvor ligierte linke *V. phrenica*

abgesetzt. Nach Durchtrennung der infrahepatischen *V. cava* nahe der Einmündung der rechten *V. renalis* folgte das Absetzen der rechten *V. suprarenalis*. Durch Inzision der proximalen Pfortader wurde die simultane portale Perfusion beendet und die Pfortader an der Inzisionsstelle vollständig abgesetzt. Die Aorta wurde direkt oberhalb des *Truncus coeliacus* unterbunden und proximal dieser Ligatur ebenfalls abgesetzt. Nach Durchtrennung des hepatooesophagealen Bandes wurde die Leber an dem infrahepatischen *V. cava*-Gefäßclip entnommen und in einem auf 4°C gekühlten Konservierungsbad (*Custodiol*) für die vorgesehene Ischämiezeit gelagert (Tamaki, Kamada et al. 1986, Tamaki, Kamada et al. 1987).

2.4.4 Empfängeroperation

Nach Rasieren und Desinfizieren der Bauchhaut erfolgte die Eröffnung des Abdomens durch eine mediane Laparotomie von der Symphyse bis zum *Xiphoid*. Wie bei der Spenderoperation wurde die Bauchhöhle mit Hilfe von vier Bauchdeckenclips aufgespannt und das *Xiphoid* nach kranial fixiert.

Die Hepatektomie erfolgte weitgehend analog zu den Schritten beim Spendertier, sodass hier nur die Abweichungen beschrieben werden: Die linke *V. phrenica* und die rechte *V. suprarenalis* wurden leberfern ligiert. Die Pfortader wurde von der Einmündung der *V. lienalis* bis zur Aufzweigung in die beiden portalen Hauptstämme isoliert. Die *A. hepatica propria* wurde ligiert und durchtrennt. Der Hauptgallengang wurde lebernah ligiert und von der Leber abgesetzt. Dann wurde zunächst die infrahepatische *V. cava* an der Einmündung der rechten *V. renalis*, anschließend die Pfortader an der Einmündung der *V. lienalis* mit Hilfe von Mikrogefäßclips abgeklemmt und die zwerchfellnah an der suprahepatischen *V. cava* angebrachte Gefäßklemme (Satinsky-Klemme) geschlossen.

Mit dem Verschluss der *V. portae* mittels Mikrogefäßclip begann die kritische anhepatische Phase des Empfängertiers.

Nach Durchtrennung der linken *V. phrenica* distal der Ligatur wurde die suprahepatische *V. cava* am Leber-Gefäß-Übergang abgesetzt. Danach wurden die Pfortader und die infrahepatische *V. cava* lebernah abgesetzt. Nach Koagulation der *V. suprarenalis* konnte die Leber entnommen werden.

2.4.5 Transplantation

Vor Einbringen des Transplantats wurde eine feuchte, gekühlte Mullkompressen in das Leberbett gelegt. Anschließend wurde die zu transplantierende Leber aus dem Konservierungsbad entnommen und orthotop im Empfängersitus platziert.

Es folgten die Anastomosen in mikrochirurgischer Technik.

2.4.5.1 Anastomose der suprahepatischen V. cava inferior

Zunächst wurden zwischen der zu anastomosierenden V. cava der Spender- und Empfängertiere zwei Eckfäden (9/0 Prolene, Fa. Ethicon, Norderstedt, BRD) angelegt und verknotet, so dass ein Kreisbogen vor der Hinterwand entstand.

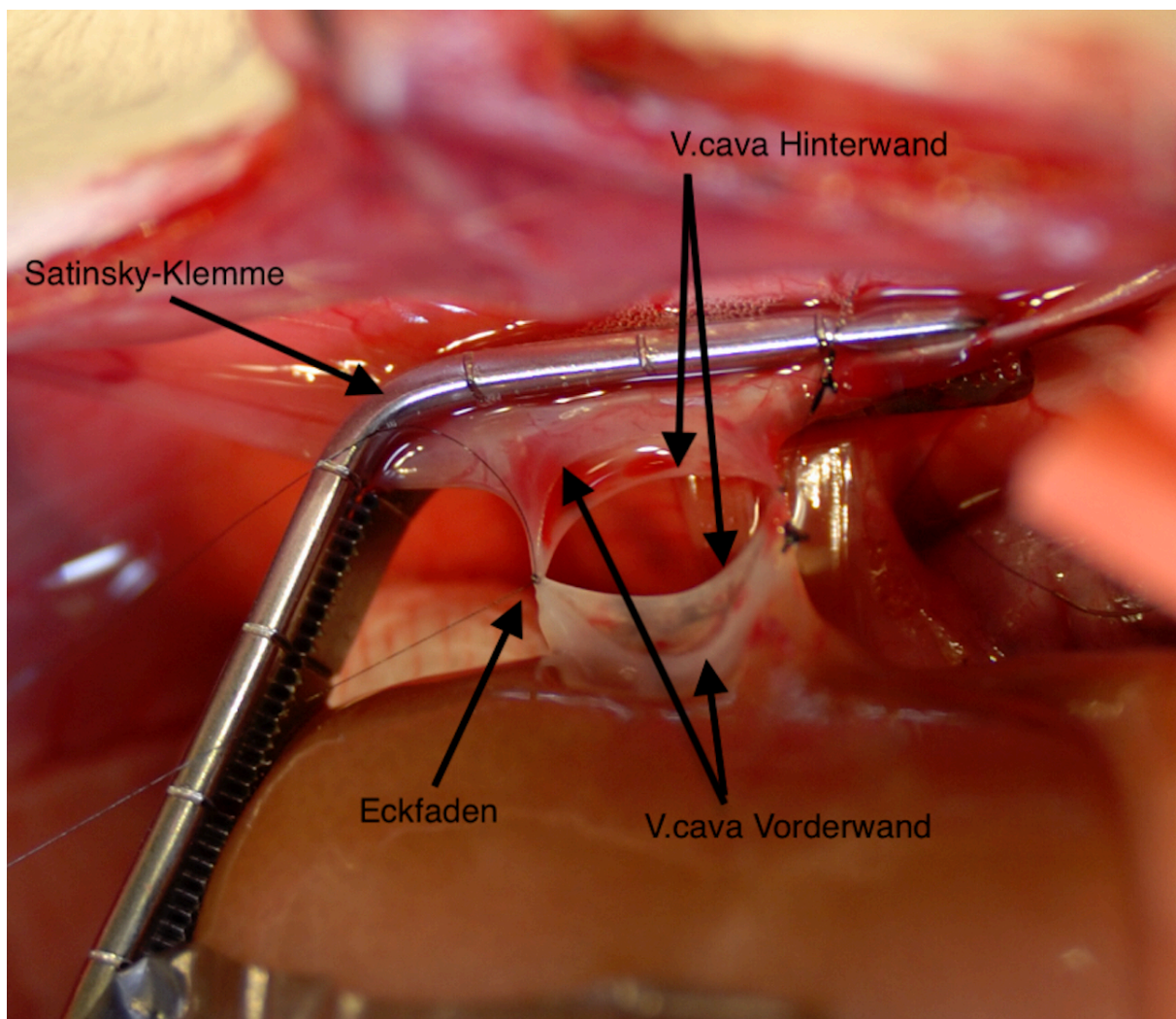


Abb. 18: Vorbereitung zur fortlaufenden Naht

Die Hinterwand wurde daraufhin von innen fortlaufend genäht (Abb. 18). Bei Erreichen der gegenüberliegenden Ecknaht wurde dieser Faden nun am zwerchfellseitigen Stumpf nach außen durchgestochen, mit dem zweiten Eckfaden verknüpft und anschließend für die Naht der Vorderwand verwendet. Vor Vervollständigen der Anastomose wurde, um Luftbläschen zu eliminieren und dadurch eine Luftembolie zu vermeiden, das Gefäßlumen mit isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) gespült.

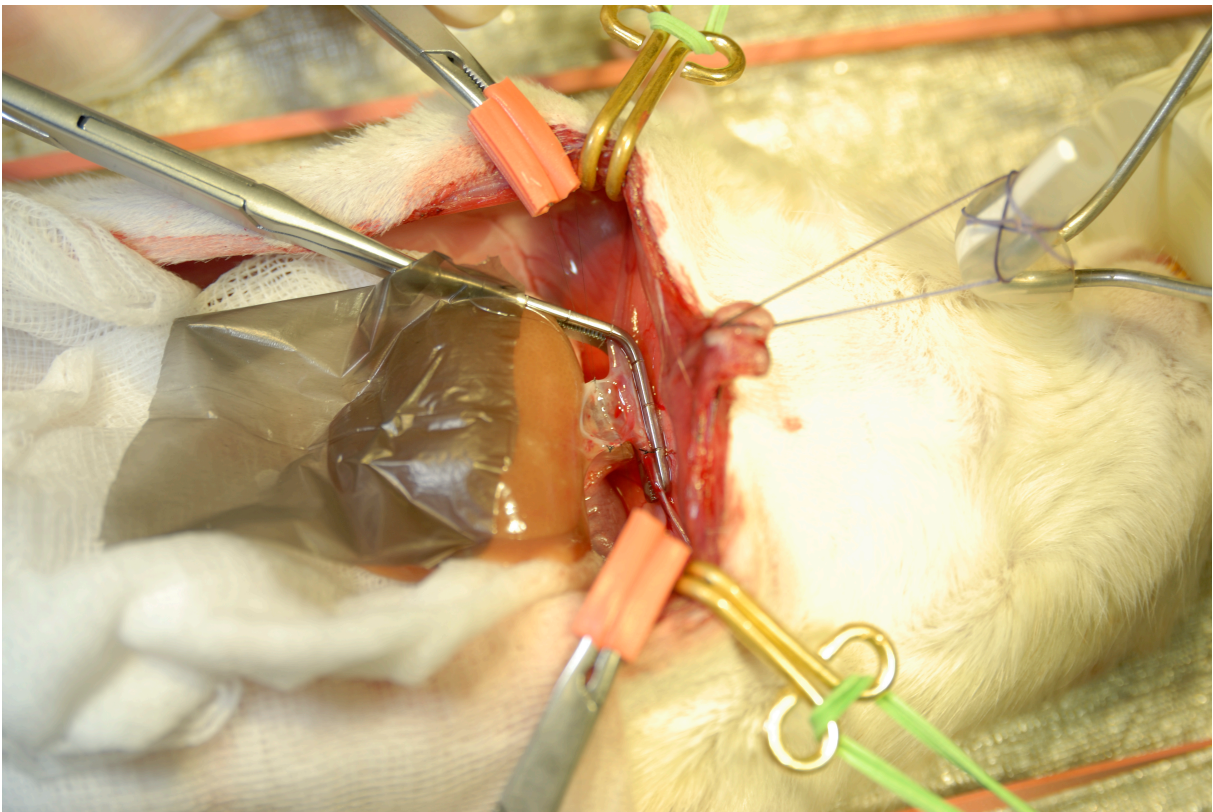


Abb. 19: vollständige Anastomose

2.4.5.2 Anastomose der V. portae und infrahepatischen V. cava inferior

Nach Entfernung der Mullkomresse und Hochlagern des *Lobus medianus* und des *Lobus lateralis sinister* ließ sich die Leberpforte darstellen.

Pfortader und V. cava inferior wurden fortlaufend analog zur suprahepatischen V. cava mit einem 9/0 Ethilon Faden anastomosiert.

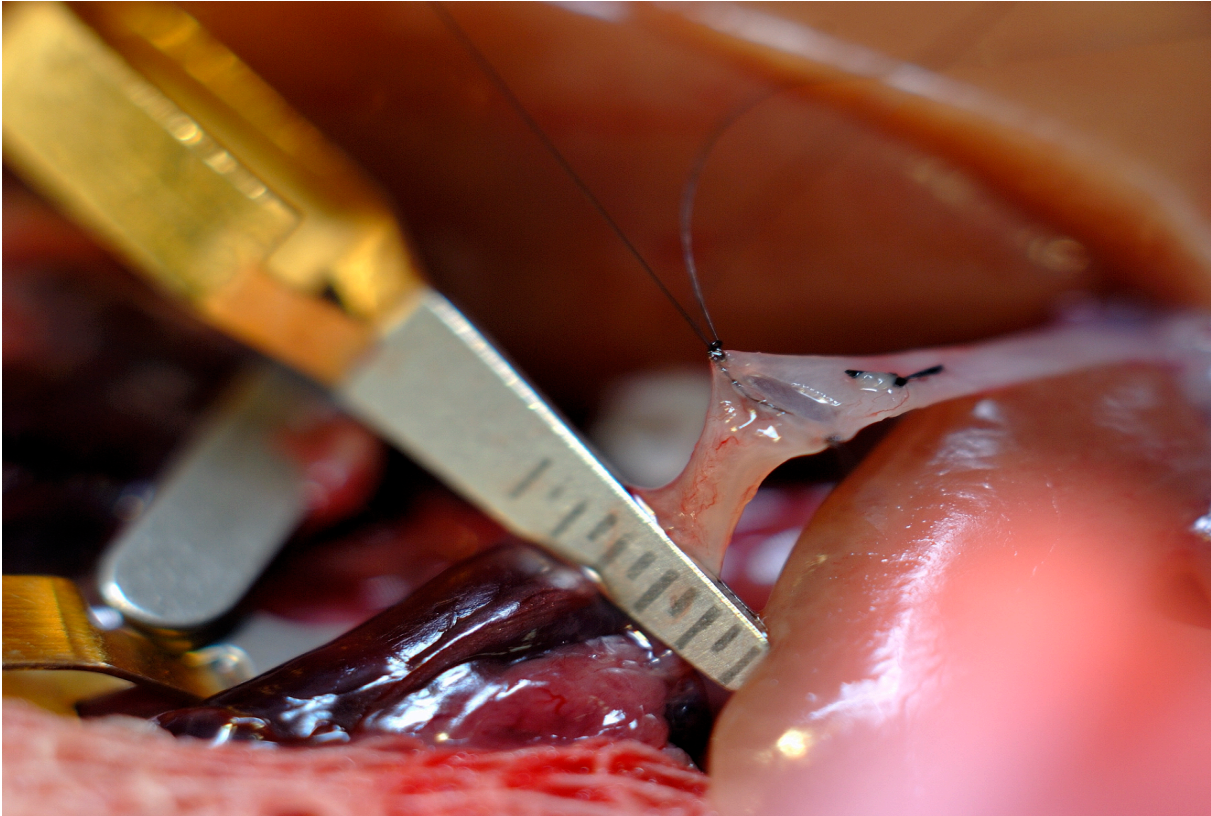


Abb. 20: Pfortaderanastomose

Sofort nach Fertigstellung der Pfortaderanastomose (Abb. 20) wurde der Gefäßmikroclip an der Pfortader und die Satinsky-Klemme an der suprahepatischen *V. cava* entfernt, die Reperfusion des Organs erfolgte, und die Blutstauung in den unpaaren Bauchorganen wurde aufgehoben.

2.4.5.3 Anastomosierung der arteriellen Versorgung

Zur Rearterialisierung des Transplantats wurde das Aorten-patch der Spenderleber fortlaufend an die *A. hepatica communis* des Empfängertiers anastomosiert.

2.4.5.4 Rekonstruktion des Gallengangs

Die Rekonstruktion des Gallengangs war für unsere Fragestellung, auf Grund des Finalversuchs, nicht relevant und wurde daher nicht durchgeführt.

2.5 Untersuchungsmethoden

Zunächst erfolgte ca. 20 Minuten postoperativ die Blutabnahme. Da es sich um einen finalen Versuch handelte, wurden die Tiere im Anschluss *lege artis* euthanasiert und das Transplantat entnommen.

Die Blutproben wurden 5 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (EBA 12, Fa. Hettich, Tuttlingen, BRD) und es erfolgte die Auswertung des Plasmas mittels VetTest® (Firma IDEXX, Ludwigsburg, BRD).

Getestet wurden folgende Laborparameter: γ -GT, ALT, AST, Urea, Glucose und LDH.

2.5.1 Laborparameter

Zur Evaluierung des Leberschadens wurden oben genannte Laborparameter im Serum mittels VetTest® (Firma IDEXX, Ludwigsburg, BRD) bestimmt.

Transaminasen

Die Hauptaufgabe der Transaminasen **AST (GOT)** und **ALT (GPT)** ist die Desaminierung von Aminosäuren und dadurch deren Abbau. Sie kommen in vielen Geweben vor, jedoch in unterschiedlich hohen Konzentrationen, wodurch sich eine gewisse Organspezifität ergibt.

Die **ALT** hat in der Leber die höchste Konzentration und ist hier vor allem im Zytoplasma der Hepatozyten zu finden.

Die **AST** kommt ebenfalls überwiegend in der Leber vor, danach folgen Herz und Skelettmuskulatur. Sie ist im Zytoplasma und in den Mitochondrien lokalisiert (Dörner 2003).

Aus diesem Grund ist es möglich, über die Serumparameter einen ersten Rückschluss auf die Schädigung zu ziehen. Ein erhöhter **AST**-Wert weist auf eine stärkere Schädigung hin, da auch die Mitochondrien betroffen sind.

Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ -GT)

Auch die **γ -GT** kommt in mehreren Organen vor und ist am Transport von Aminosäuren in die Zelle beteiligt. Sie ist an den Strukturen der Zellmembran angelagert und kann von dort relativ leicht entfernt werden - zum Beispiel unter

vermehrter Einwirkung von Gallensäuren bei Cholestase - und dann ins Serum gelangen. Sie ist daher ein Marker für die Gallensäuren-Produktion bzw. einer Abflussstörung in der Leber (Dörner 2003).

Lactatdehydrogenase (LDH)

Die **LDH** ist ein Teil des Prozesses der Milchsäuregärung, kommt daher praktisch in allen Zellen vor und ist bei einer Reihe von Erkrankungen erhöht.

Wichtig bei der Analytik ist, dass das verwendete Serum absolut frei von Blutbestandteilen ist, da bereits eine geringe Hämolyse das Messergebnis verfälscht. Im Grunde ist sie nur als Marker von Zelluntergang geeignet, eine Lokalisationsbestimmung ist anhand der **LDH** nur sehr bedingt möglich (Dörner 2003).

2.5.2 Konventionelle Histologie

Nach Explantation der Leber wurden Biopsien zur histologischen Aufarbeitung entnommen und in 3,7%iger, gepufferter Formalinlösung (Merck, Darmstadt, BRD) konserviert.

Die Entnahme erfolgte nach folgendem, für die Pathologie verblindetem Schema:

- 1 = Lobus hepatis dexter
- 2 = Lobus hepatis sinister
- 3 = Lobus caudatus
- 4 = sonstiges Lebergewebe

Die Gewebeproben wurden zunächst mithilfe eines Paraffin-Einbettsystems (Firma MEDITE, Burgdorf, BRD) in Wachsblöcke gegossen. Anschließend wurde nach Aushärten jeder Paraffinblock mit einem Mikrotom in 5 µm dünne Membranen geschnitten und der Schnitt auf einem Objektträger aufgebracht. Für jedes Versuchstier wurden so vier Präparate in Hämatoxilin-Eosin-Färbung (Merck, Darmstadt, BRD) angefertigt.

2.5.3 Immunhistochemie

Ein anderer Teil der entnommenen Transplantate wurde zur Anfertigung der Immunhistochemie mit Einbettmedium (Tissue freezing medium®, Leica instruments GmbH, Nussloch, BRD) übergossen. Anschließend wurden sie für ca. 10 Sekunden

in, mit flüssigem Stickstoff gekühltem Isomethylbutan (2-Methylbutan, Sigma Aldrich, Steinheim, BRD) getaucht. Die so gewonnenen Gefrierblöcke wurden dann bei einer Kammertemperatur von -23°C im Kryostat (Leitz KG, München, BRD) auf dem Schneidetisch fixiert und Schnitte mit einer Dicke von ca. $5-7\ \mu\text{m}$ angefertigt. Diese Schnitte konnten auf Objektträger aufgebracht werden und mussten dann mit Aceton fixiert und bis zur Färbung bei -20°C gelagert werden.

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden monoklonale Antikörper (mAb) verwendet, die nach Bindung an ihr jeweiliges Epitop und nach den erforderlichen Auswasch- und Reinigungsschritten mit der Peroxidase/Antiperoxidase-Methode gefärbt wurden. Folgende Strukturen wurden so gefärbt:

- Makrophagen (ED2*, Firma Serotec, UK)
- T-Lymphozyten (CD8*, Firma Serotec, UK)
- IL-2 Rezeptor der T-Lymphozyten (CD25*, Firma Pharmingen, USA)

* Maus-anti-Ratte monoklonale Antikörper (mAb, IgG)

Gegengefärbt wurde mit Peroxidase konjugiertem F(ab)-Fragment von Ratte-anti-Maus IgG (Firma Pharmingen, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Auswertung der Laborparameter

3.1.1 Transaminasen

Der Referenzbereich für ALT im Serum befindet sich bei $20-61\ \text{U/L}$ und ist in Abbildung 21 innerhalb des gestrichelten Bereichs unten dargestellt.

Zu allen drei Ischämiezeitpunkten wurden erhöhte Serumkonzentrationen der ALT gemessen. Nach zweistündiger Ischämie ergab sich ein Mittelwert von $234,0 \pm 45,9\ \text{U/L}$. Nach sechs Stunden Ischämie konnte ein Mittelwert von $448,7 \pm 273,7\ \text{U/L}$ und

nach acht Stunden Ischämie ein Mittelwert von $177,7 \pm 61,2$ U/L ermittelt werden. Es wird ersichtlich, dass der größte Anstieg nach sechsständiger Ischämiezeit zu beobachten ist, während nach acht Stunden im Vergleich zu beiden vorangegangenen Gruppen ein Rückgang zu verzeichnen ist. Dies ist in Abbildung 21 dargestellt.

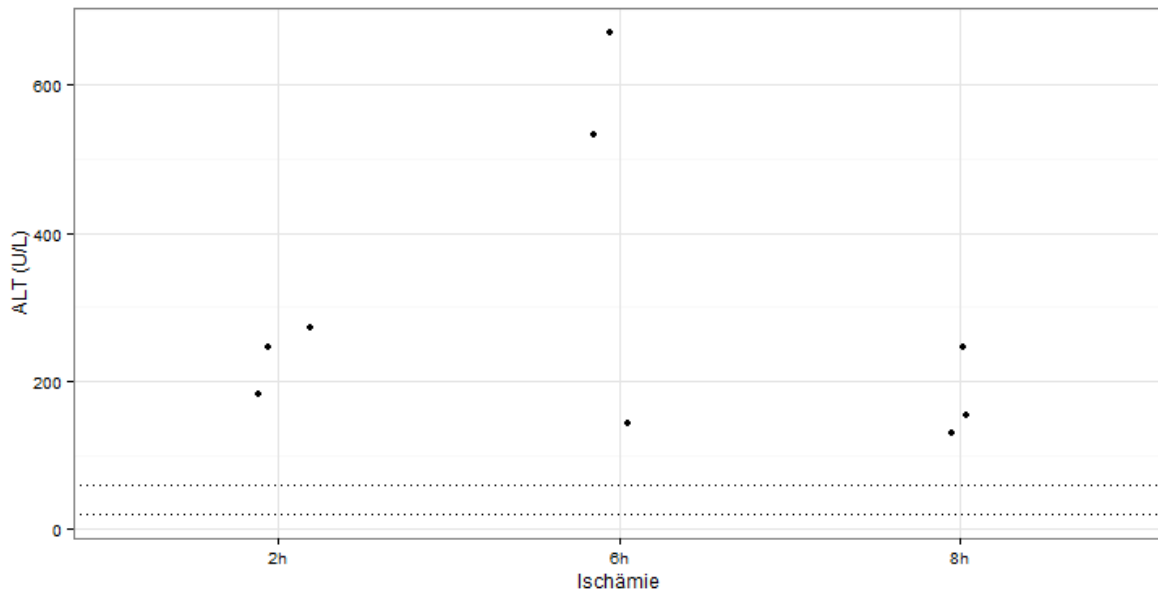


Abb. 21: Punktdiagramm ALT(U/L) je Ischämiezeitpunkt

Die Unterschiede zwischen den Ischämiezeiten waren nicht signifikant ($p = 0,184$).

Die gemessenen Werte der AST-Serumkonzentration zum jeweiligen Ischämiezeitpunkt sind in Abbildung 22 dargestellt:

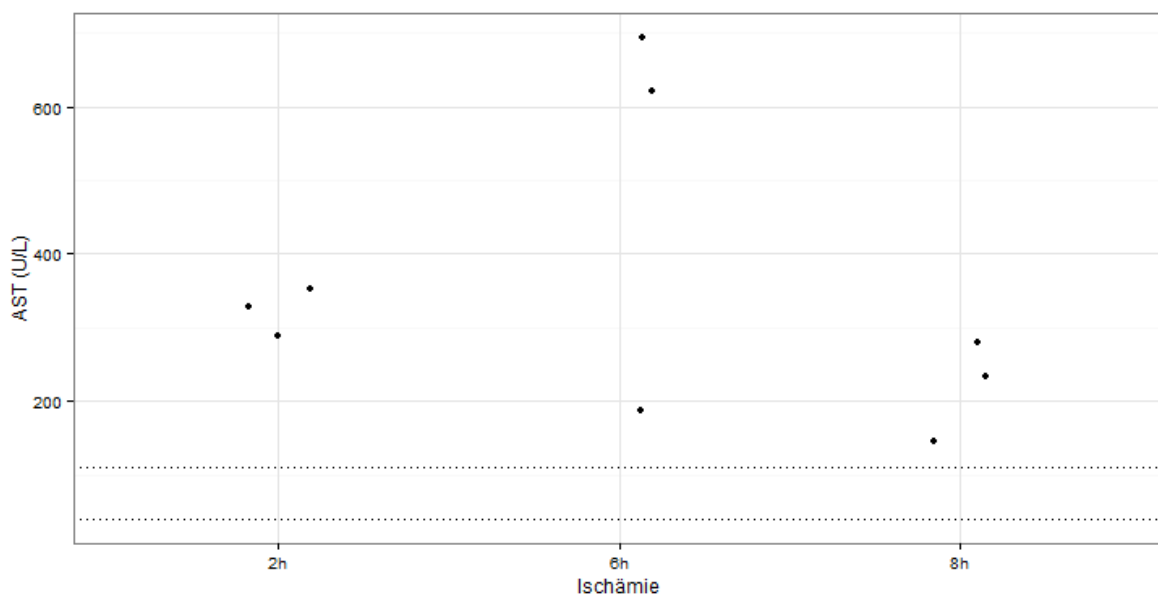


Abb. 22: Punktdiagramm AST(U/L) je Ischämiezeitpunkt

Nach zwei Stunden Ischämie wurde ein Mittelwert von $323,0 \pm 32,8$ U/L ermittelt. Nach sechs Stunden wurde auch hier die größte Zunahme der Serumkonzentration mit einem Mittelwert von $501,3 \pm 273,9$ U/L beobachtet. Der Mittelwert nach achtschändiger Ischämie betrug $219,7 \pm 67,6$ U/L und liegt damit sogar unter dem Mittelwert nach zwei Stunden Ischämie. Die Unterschiede zwischen den Ischämiezeiten waren nicht signifikant ($p = 0,185$)

3.1.2 Gamma-Glutamyltranspeptidase (γ -GT)

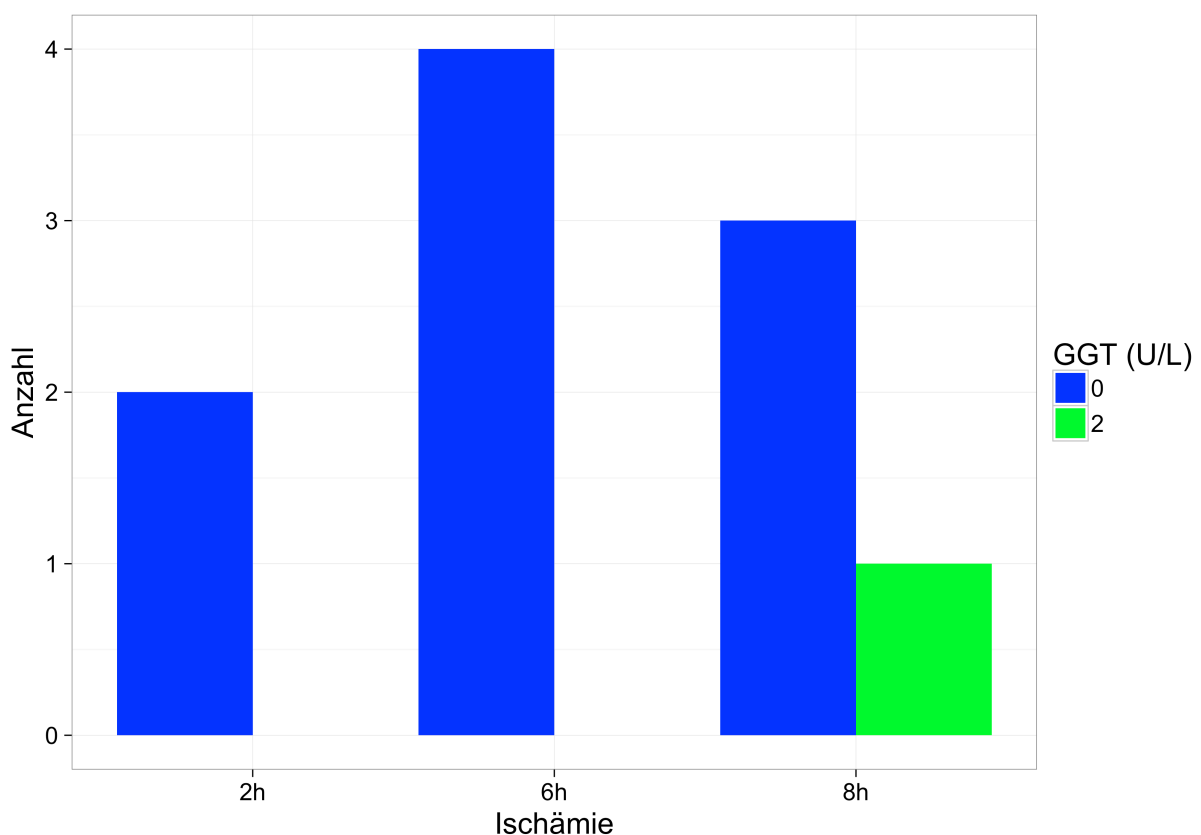


Abb 23: Serumkonzentration GGT je Ischämiezeitpunkt

Der γ -GT-Referenzwert liegt laut VetTest® bei 1–6 U/L. Bei den postoperativen Messungen im Rahmen dieser Arbeit gab es nur eine einzelne Messung nach einer Ischämiezeit von sechs Stunden bei der ein Wert von 2 (U/L) festgestellt werden konnte. Die restlichen Messungen ergaben den Wert 0 (U/L) oder wurden von dem Gerät für ungültig erklärt.

Die Unterschiede zwischen den Ischämiezeiten waren mit einem p-Wert von 0,472 nicht signifikant.

3.1.3 Lactatdehydrogenase (LDH)

Der Referenzbereich der Lactatdehydrogenase liegt bei 167-1428 U/L. Hier zeigte das Gerät bei allen Messungen zu sämtlichen Ischämiezeiten immer Werte von > 2800 U/L an. Genauere Angaben konnten von dem Gerät nicht gemacht werden, so dass hier keine Unterschiede zwischen den Ischämiezeiten gemessen werden konnten. Es wurde lediglich eine deutliche Zunahme der Serumkonzentration der LDH zu jedem Ischämiezeitpunkt, also unabhängig von der Ischämiedauer, festgestellt.

3.2 Auswertung der konventionellen Histologie

Die histologische Auswertung ermöglicht eine objektive Untersuchung des Ausmaßes der hepatozellulären Nekrotisierung. Anhand der untersuchten Merkmale wurden folgende drei Schweregrade eingeteilt:

Grad 1	Grad 2	Grad 3
beginnende hypoxische Vakuolisierung	Hypoxische Vakuolisierung, zusätzlich Cholestase	Stark ausgeprägte hypoxische Vakuolisierung mit Cholestase
Sinusoidale Dilatation und Hyperämie	Sinusoidale Dilatation und Hyperämie	Sinusoidale Dilatation und Hyperämie
Disseminierte Einzelzellnekrosen (max. 3 pro Gesichtsfeld)	Disseminierte Einzelzellnekrosen (max. 3 pro Gesichtsfeld)	Einzelzellnekrosen (>3 pro Gesichtsfeld)
Vermeehrt granuliertes Zytoplasma	Zusätzlich kleinere Gruppennekrosen (<10 Hepatozyten)	Gruppennekrosen (>10 Hepatozyten)
Zellödem	Karyorhexis	Nekrosen v.a. läppchenzentral mit ausgeprägter zellulärer Reaktion

Die Auswertung der histologischen Proben erfolgte nach folgendem, unter 2.4 schon genanntem Schema:

n.1 = rechter Leberlappen

n.2 = linker Leberlappen

n.3 = Lobus caudatus

Nach den jeweiligen Ischämiezeiten wurden unterschiedliche Schweregrade festgestellt. Auch innerhalb der Gruppen mit derselben Ischämiedauer traten Unterschiede in den Schweregraden auf. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht:

			Dauer			Signifikanz
			2h	6h	8h	
Grad	1	Anzahl	1	1	2	0,566
	2	Anzahl	3	2	2	
	3	Anzahl	0	1	0	

Tabelle 3: Übersicht Nekrosegrade je Ischämiedauer

Die Unterschiede zwischen den Schweregraden waren nicht signifikant ($p = 0,566$). Abbildung 24 zeigt die Verteilung der Nekrosegrade in Abhängigkeit von der Ischämiedauer:

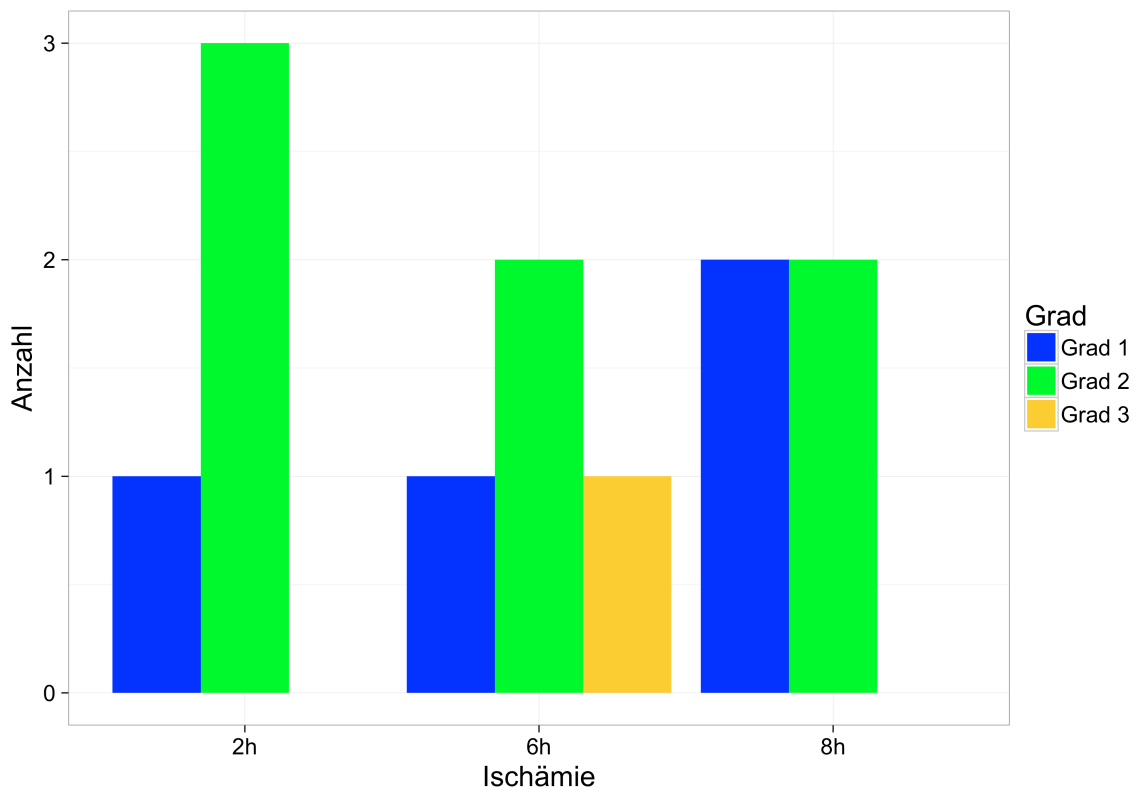


Abb. 24: Nekrosegrade in Abhängigkeit von der Ischämiedauer

Es zeigt sich kein linearer Anstieg, sondern eine unregelmäßige Verteilung der Schweregrade. Nach zweistündiger Ischämiedauer überwiegt Nekrosegrad 2 gegenüber Grad 1, während Grad 3 gar nicht nachweisbar ist. Nach sechs Stunden Ischämie kamen alle 3 Schweregrade vor, allerdings überwiegt Grad 2 gegenüber Grad 1 und Grad 2, die gleich häufig vorkamen. Nach achtstündiger Ischämiedauer kamen Grad 1 und Grad 2 gleich häufig vor. Grad 3 trat nicht auf.

3.3 Immunhistochemische Auswertung

Der Antikörper ED2 färbt spezifisch residente Makrophagen der Ratte (Abb. 25), während Monozyten, Dendritische Zellen, sowie Granulozyten (peritoneal) negativ bleiben. Ferner ist der Antikörper geeignet, corticale (ED2+) von medullären (ED2-) Makrophagen zu unterscheiden (Dijkstra, Dopp et al. 1985).

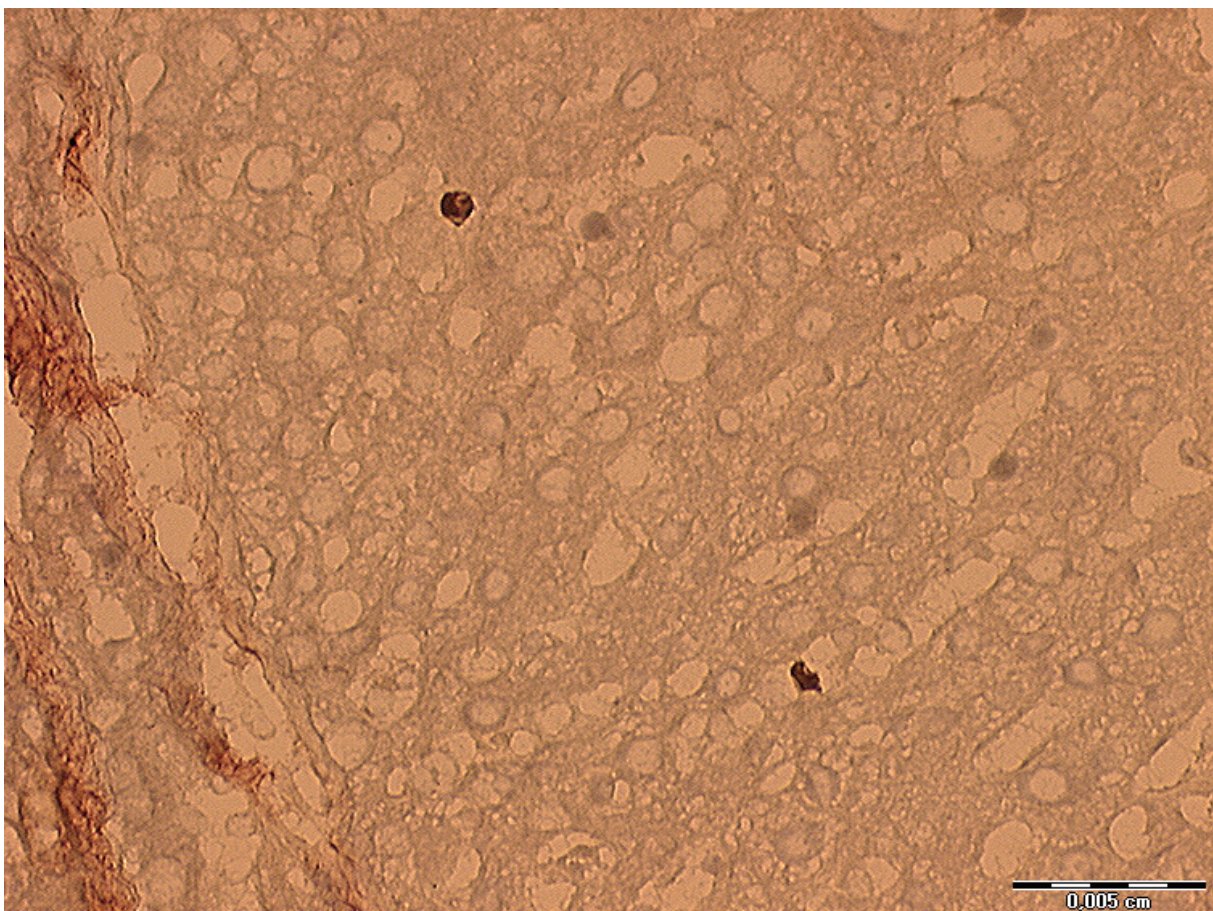


Abb. 25: Immunhistochemische Färbung ED2-AK (Makrophagen)

Mit dem Antikörper CD8 wurden T-Lymphozyten im Allgemeinen nachgewiesen (Abb. 26a), während der Antikörper CD25 mit dem Interleukin-2 Rezeptor auf aktivierten T-Lymphozyten reagiert (Abb. 26b)(quartett 2015).

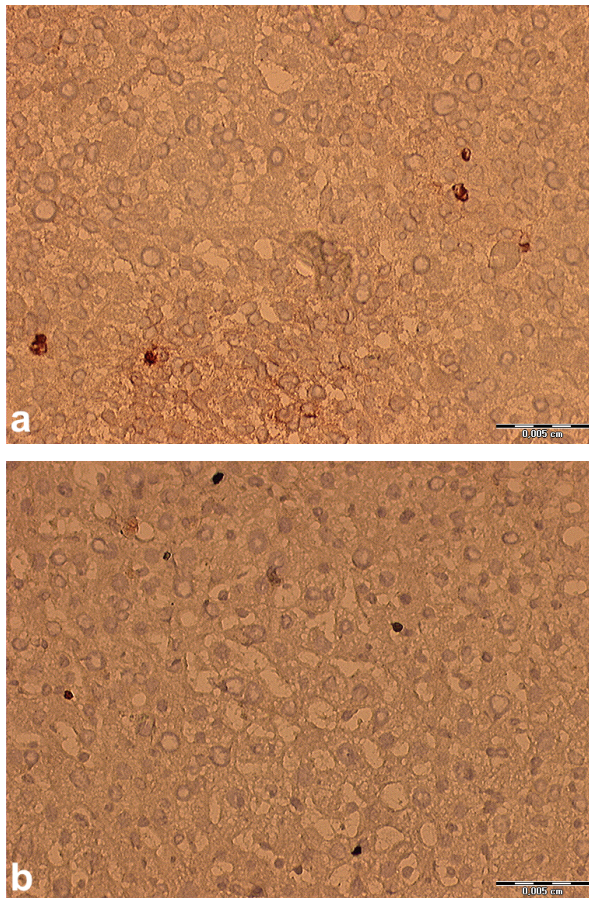


Abb. 26: Immunhistochemische Färbungen, CD8-T-Zellen (a) und CD25-aktivierte T-Zellen (b)

Untersucht wurden die Zellzahlen (Score) nach 2 Stunden und nach 8 Stunden Ischämie. Es konnten alle drei Zellreihen sowohl nach zwei Stunden Ischämie als auch nach acht Stunden Ischämie nachgewiesen werden, wie in folgender Übersicht dargestellt wird:

	Zeitpunkt	Score (Zellzahl)				
		Mittelwert	Minimum	Perzentil 25	Perzentil 75	Maximum
CD25	2h	0,8	0	0	1	2
	8h	4,4	2	3	5	7
CD8	2h	1,2	0	0	2	4
	8h	9,3	0	0	25	29
ED2AK	2h	1,3	0	0	3	3
	8h	5,6	0	0,5	7,5	19

Tabelle 4: Zellzahlen nach 2h und 8h Ischämie

Wie in Abbildung 27 ersichtlich ist, konnte eine Zunahme aller drei Zellreihen nach achtstündiger Ischämie nachgewiesen werden im Vergleich zu einer Ischämiezeit von lediglich 2 Stunden.

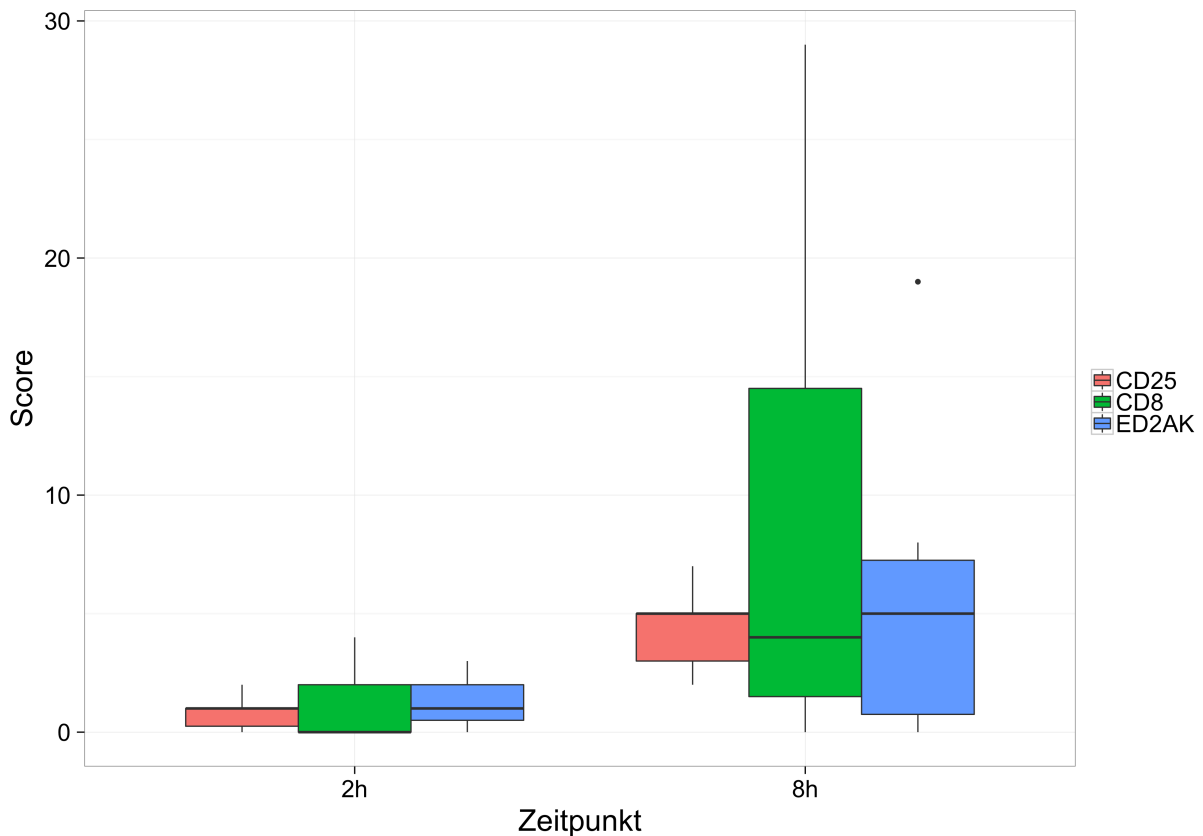


Abb. 27: Zellzahlen der drei Zellreihen nach 2h Ischämie und nach 8h Ischämie

Der p-Wert nach 2h Ischämie beträgt 0,849, der nach 8h Ischämie 0,986.

Innerhalb der Zellreihen unterscheidet sich der Score damit in keinem der Zeitpunkte signifikant über die CD25, CD8 und ED2AK. Zur Berechnung wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

Die einzelnen Zellreihen in Bezug auf die Ischämiezeit sind in Abbildung 28 dargestellt:

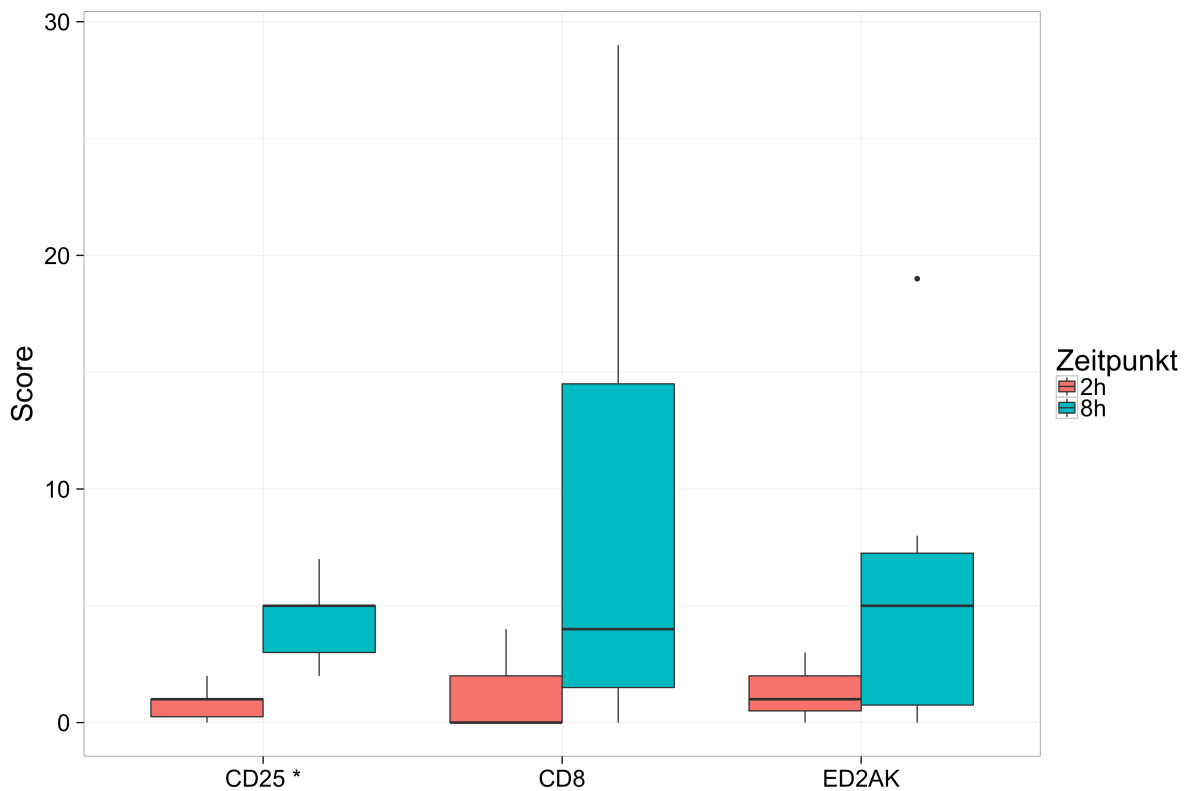


Abb. 28: Die einzelnen Immunzellreihen nach 2h Ischämie und nach 8h Ischämie

Alle drei Zellreihen unterscheiden sich deutlich je nach Ischämiezeit. Bei den mit CD25 gefärbten aktivierten T-Lymphozyten ist der Unterschied signifikant ($p = 0,004$). Zur Berechnung wurde hier der Mann-Withney-U-Test verwendet.

4 Diskussion

4.1 Die Laborratte als Versuchstier

Diverse Faktoren beeinflussen das Outcome einer Lebertransplantation. Das Alter von Spender und Empfänger, die Lebensführung des Spenders, die Zeit, die er auf der Intensivstation verbracht hat und die Medikation, mit der er dort behandelt wurde, haben wesentlichen Einfluss auf die Qualität und Funktionalität seiner Organe. Bei der klinischen Lebertransplantation sind diese Faktoren nur schwer beeinflussbar. Im Gegensatz dazu bietet das Tiermodell den Vorteil den Ablauf zu standardisieren und alle Faktoren mit Einfluss auf die Organqualität konstant zu halten, so dass man sich

auf bestimmte Parameter, in dieser Arbeit der Ischämie-/Reperfusionsschaden und die Abstoßungsreaktion, konzentrieren kann.

Die Ratte als Versuchstier bietet den Vorteil der ständigen Verfügbarkeit von Tieren mit demselben Alter und Gewicht. Sie ist deutlich preisgünstiger als andere Versuchstiere wie Schweine oder Hunde und ihre Unterbringung und Pflege ist unkompliziert. Obwohl die Größe der Ratten das Können einer schwierigen mikrochirurgischen Operationstechnik erfordert und es viel Zeit und Übung bedarf, diese zu erlernen und standardisiert durchzuführen, eignen sich Ratten auch für aufwendige Operationen.

Leider sind die Ergebnisse nicht direkt auf den Menschen extrapolierbar. Um konkrete Aussagen über Lebertransplantationen beim Menschen machen zu können sind daher zusätzliche Studien bei klinischen Lebertransplantationen nötig.

Grundsätzlich hat man bei Tierexperimenten die Möglichkeit einer syngenesischen Untersuchung an genetisch identischen Tieren. In der Schwesterstudie wurden die Transplantationen an syngenesischen Ratten durchgeführt, um eine Abstoßungsreaktion auszuschließen und isoliert den Ischämie-/Reperfusionsschaden zu untersuchen (Haiges 2015), während in dieser Studie allogene Ratten verwendet wurden, um zusätzlich die Phänomene einer Abstoßungsreaktion zu demonstrieren, wie sie im klinischen Alltag vorkommt.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Viele Faktoren bestimmen das Outcome nach Lebertransplantation. Trotz der Fortschritte in der Transplantationsmedizin ist es heute noch immer nicht möglich, sämtliche Komplikationen wie die *Initial Poor Function* (IPF) oder *Primary Non Function* (PNF), chirurgische Komplikationen oder Abstoßungsreaktionen vollkommen zu beherrschen. Um die Langzeitergebnisse nach Lebertransplantationen weiter zu verbessern, muss der Zusammenhang zwischen Organqualität und Outcome noch besser verstanden werden.

Die Organqualität ist von vielen Faktoren abhängig. In den letzten Jahren wurde auf dem Gebiet der verwendeten Perfusionslösungen viel erforscht und verbessert. Auch

die angewandten Operationstechniken konnten optimiert werden, um das Transplantationsergebnis zu verbessern. Die von uns durchgeführte Studie konnte zeigen, dass die prolongierte Ischämie einen erheblichen Einfluss auf das Ausmaß der Abstoßungsreaktion und unter anderem dadurch auf die Organqualität hat. In dieser Arbeit wurde anhand einer tierexperimentellen Studie versucht, diesen Umstand zu erklären und mögliche Lösungsansätze zu finden, um das Outcome nach Lebertransplantation zu verbessern.

Die prolongierte Ischämie führte zu einer strukturellen Leberschädigung durch Nekrose der transplantierten Lebern, sowie zu einer Dissemination der Transplantate mit Immunzellen, was als verstärkte akute Abstoßungsreaktion zu interpretieren ist.

Bei der Laboranalytik war ein höherer Anstieg der Leberwerte nach prolongierter Ischämie im Vergleich zur kurzen kalten Ischämiezeit von 2 Stunden zu erwarten. Die Leberenzyme *ALT* und *AST*, die für den Aminosäurestoffwechsel in der Leber verantwortlich sind, zeigten zu allen drei Ischämiezeitpunkten eine Erhöhung ihrer Serumkonzentrationen. Das Enzym *AST* befindet sich vorwiegend in den Mitochondrien der Hepatozyten. Eine Erhöhung dieses Enzyms spiegelt einen größeren Schaden in diesem Bereich wider, da diese Zellorganellen mitbetroffen sind. Außerdem fehlt durch die Zerstörung der Mitochondrien, der Kraftwerke der Zellen, die Energie für eine mögliche Regeneration nach Transplantation. Dies bietet einen möglichen Erklärungsansatz für den nachfolgenden Abfall der *ALT* und *AST* bei achtstündiger Ischämie. Den durch Ischämie in Mitleidenschaft gezogenen Hepatozyten fehlt die Energie zur Herstellung ihrer überlebenswichtigen Transaminasen, so dass die Serumkonzentration, trotz progredienter Zellschädigung nicht zunimmt und sogar absinkt.

Eine weitere mögliche Erklärung für den deutlichen Anstieg nach sechsstündiger Ischämiedauer ist, dass es bei zwei der Transplantationen zu Komplikationen kam. Bei einem Empfängertier setzte nach Clipping der suprahepatischen V. cava inferior die Atmung aus. Das Tier musste zunächst reanimiert werden, der Clip wurde wieder geöffnet und der Blutfluss wiederhergestellt. Nach einiger Zeit setzte die Atmung wieder ein und der Clip konnte erneut, diesmal ohne Apnoephase, gesetzt werden. Bei dem anderen Empfängertier zeigte sich die Pfortaderanastomose zunächst

insuffizient und musste umstochen werden. Dies führte zu einer verlängerten Transplantationsdauer und somit zu einer längeren Warmischämiezeit. Durch die möglicherweise verursachte stärkere Schädigung der Hepatozyten, kann es durchaus zu der deutlich erhöhten Serumkonzentration der Transaminasen kommen.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die deutlichere Erhöhung nach sechs Stunden Ischämie als nach acht Stunden ist, dass die Messung mit dem VetTest® (Fa. IDEXX, Ludwigsburg, BRD) durchgeführt wurden und nicht von einem zertifizierten Labor gemessen wurde. Das VetTest®-Analysegerät wird hauptsächlich von Veterinärmedizinern zur zeitnahen Diagnostik vor Einleitung einer Therapie verwendet. Trotz regelmäßiger Kalibrierungen und Qualitätskontrollen ist es durchaus möglich, dass die Messungen nicht mit der Genauigkeit einer Messung von geschultem und erfahrenem Laborpersonal dienen können. Hierfür spricht auch die große Streuung in der Messung nach sechs Stunden Ischämie, zu sehen an dem einmaligen Ausreißer (sowohl bei *AST* und *ALT*), die beide am gleichen Tag gemessen wurden. Dagegen spricht allerdings die relativ konstante Erhöhung nach 2 und nach 8 Stunden Ischämie, bei denen keine Ausreißer zu verzeichnen sind.

Auch die Serumkonzentration der Lactatdehydrogenase (*LDH*) zeigt zu allen drei Ischämiezeitpunkten eine deutliche Erhöhung. Leider werden auch hier die Grenzen des VetTest®-Analysegeräts deutlich. Es konnte lediglich die deutliche Erhöhung auf Werte über 2800 U/L angezeigt werden, genauere Angaben waren leider nicht möglich. Diese deutliche Erhöhung zeigt zwar einen drastischen Zelluntergang, es sind aber keine Unterschiede nach den unterschiedlich langen Ischämiedauern ersichtlich. Auch bei den Messungen der γ -GT ergaben sich mit dem VetTest®-Analysegerät Probleme. Die meisten Messungen ergaben den Wert 0 U/L oder wurden für ungültig erklärt. Nur bei einzelnen Messungen nach sechsständiger Ischämiezeit konnte ein Serumwert von 2 U/L festgestellt werden, der wiederum innerhalb des Referenzwerts von 1-6 U/L liegt. Bei prolongierter Ischämie wäre eigentlich eine Erhöhung der γ -GT zu erwarten gewesen, da diese den Status der Gallenepithelzellen sowie die sekretorische Leistung der Leber anzeigt, die durch Ischämie in Mitleidenschaft gezogen werden. Bei prolongierter Ischämie kommt es häufiger zu Gallekomplikationen, die jedoch anhand unserer Laborergebnisse nicht aufgezeigt werden konnten.

Ein weiterer, sich auf die Messungen auswirkender Punkt ist die geringe Stichprobenanzahl mit der gearbeitet wurde. In den einzelnen Gruppen wurde mit n=4 Tieren zu den definierten Zeitpunkten eine Lebertransplantation durchgeführt. Eine Erhöhung der Anzahl der Versuchstiere und damit eine größere Wiederholungsrate könnte die festgestellte Tendenz bestätigen und zu deutlicheren Ergebnissen führen. Dabei sollte allerdings auch der ethische Aspekt erwogen werden. Ein unnötig hoher Einsatz von Tieren für die Versuche ist vom ethischen Standpunkt nicht vertretbar.

Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung zeigen eine unregelmäßige Verteilung der Schweregrade über die Ischämiezeiten. Nach zweistündiger Ischämie zeigten sich bereits mehrere kleinere Gruppenzellnekrosen, entsprechend Nekrosegrad 2. Grad 2 kam hier häufiger vor, als Grad 1 mit nur beginnender Vakuolisierung und Einzelzellnekrosen. Dies spricht dafür, dass der Leberzellschaden bereits nach zweistündiger Ischämiedauer relevant ist. Die histologische Auswertung nach sechsständiger Ischämie war in dieser Studie die einzige, in der eine drittgradige Nekrose nachweisbar war. Hier zeigte sich eine stark ausgeprägte hypoxische Vakuolisierung mit deutlicher Cholestase und viele Gruppenzellnekrosen, v.a. läppchenzentral. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es bei zwei der Transplantationen nach sechsständiger Ischämiezeit zu den bereits genannten Komplikationen mit Apnoe/Reanimation und zunächst insuffizienter Pfortaderanastomose, die umstochen werden musste, kam. Eine verlängerte Transplantationsdauer sowie eine längere Warmischämiezeit waren die Folge. Außerdem ist zu beiden Tieren noch anzumerken, dass es zu Schwierigkeiten bei der Narkoseeinleitung mit Tachykardie und Tachypnoe kam. Es besteht durchaus die Möglichkeit, dass die dargestellten Komplikationen durch den damit verbundenen erhöhten oxidativen Stress mit dem erhöhten Nekrosegrad in Verbindung stehen. Nach 8 Stunden Ischämie kamen Grad 1 und Grad 2 gleich häufig vor, Grad 3 trat nicht auf. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine zweistündige Ischämie ähnlich starke Auswirkungen auf die Leberzellfunktion hat, wie eine achtstündige Ischämiedauer. Allerdings ist dies weder zu erwarten noch wahrscheinlich, da in mehreren klinischen wie experimentellen Studien im Tiermodell und auch bei humanen Lebertransplantationen gezeigt werden konnte, dass eine prolongierte

Ischämie zu einer verminderten Leberzellfunktion führt und vermehrt Komplikationen mit sich bringt (Furukawa, Todo et al. 1991, Ploeg, D'Alessandro et al. 1993).

Heutzutage ist die histologische Auswertung zur Beurteilung der Leberzellfunktion noch immer der Goldstandard. Es stellt sich die Frage, ob es nicht Untersuchungsmethoden gibt, die eine genauere Evaluation der Leberzellfunktion zulässt. In der Schwesterstudie zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass der ATP-Abfall in den Mitochondrien der Hepatozyten im Laufe der Ischämie eine sensitivere Methode zur Evaluation der Transplantatfunktion und -regeneration nach Lebertransplantation bietet (Haiges 2015). Hier handelt es sich allerdings um den ersten Versuch der Darstellung einer solchen Methodik, es müssen zur Bewertung noch weitere Studien folgen.

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurden spezifische Immunzellen, die bei einer akuten Abstoßungsreaktion eine Rolle spielen, gefärbt und so nachgewiesen. Abbildung 27 zeigt eine Zunahme aller drei Zellreihen (CD8, CD25 und der Makrophagen) nach acht Stunden Ischämie im Vergleich zur zweistündigen Ischämiezeit. Am deutlichsten war die Zunahme in der Reihe der CD25-aktivierten T-Zellen. Hier war der Unterschied zwischen den Ischämiezeiten statistisch signifikant. Die genannten Immunzellen kommen auch unter physiologischen Bedingungen in der Leber vor. Die vermehrte Infiltration des Transplantats nach prolongierter Ischämie legt die Vermutung nahe, dass sich hier bereits eine akute Abstoßungsreaktion ereignete. Dies würde bedeuten, dass die akute Abstoßung bei prolongierter Ischämie deutlich früher auftritt als bei kurzen Ischämiezeiten. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die akute Abstoßungsreaktion nicht vor dem fünften Tag nach Transplantation sichtbar ist (Wiesner, Demetris et al. 1998, Matevossian, Huser et al. 2008, Matevossian, Novotny et al. 2008, Matevossian, Doll et al. 2009, Weng, Xu et al. 2011, Wang, Wu et al. 2014), während in unseren Untersuchungen immunhistochemische Veränderungen im Sinne einer akuten Abstoßungsreaktion nun schon direkt nach Reperfusion nachgewiesen wurden.

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die prolongierte Ischämie einen stärkeren Ischämie-/Reperfusionsschaden zur Folge hat. Das Ziel dieser Studie war es zu zeigen, dass die prolongierte Ischämie zu einer verstärkten

Abstoßungsreaktion führt und die Rolle des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei der Ausbildung der akuten Abstoßung zu charakterisieren. Wir konnten nachweisen, dass nach acht Stunden Ischämie eine stärkere Infiltration des Transplantats mit Immunzellen stattgefunden hatte als nach einer kurzen Ischämiedauer von zwei Stunden. Dies spricht für eine Verstärkung der Abstoßungsreaktion durch prolongierte Ischämie.

Die akute Abstoßungsreaktion ist ein komplexer Vorgang mit zellulären und humoralen Komponenten. Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss die Organischämie auf diese Vorgänge nimmt.

Ein möglicher Grund für die rasante und verstärkte Abstoßungsreaktion ist eine erhöhte Immunogenität des vorgeschädigten Transplantats, die wiederum zur einer beschleunigten Alloreaktivität führt. Diese erhöhte Immunogenität wird durch die Aktivierung von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und als Folge durch die Infiltration von T-Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen hervorgerufen (Kotsch 2008).

Eine wichtige Rolle bei der Abstoßungsreaktion spielt die Antigenpräsentation. Hier werden Peptide an MHC-Klasse-II Proteine präsentiert, die zuvor aufgenommen und prozessiert wurden. Hierdurch werden CD4+-T-Zellen aktiviert, die dann wiederum die humorale Immunantwort auslösen können. Käme es nun zu einer verstärkten Expression dieser MHC-II-Klasse Proteine, hätte dies eine verstärkte Aktivierung von CD4+-T-Zellen zur Folge, welche dann zu einer Verstärkung der humoralen Immunantwort führen würde. Eine frühe, massive Lymphozyten-Infiltration des Transplantats und die Aktivierung von Makrophagen wäre die Folge, wie sie sich in unseren immunhistochemischen Ergebnissen zeigt.

In experimentellen Studien mit Nierentransplantationen im Rattenmodell konnte eine derartige MHC-Klasse-II „Hyperexpression“ festgestellt werden. Hier kam es durch die Ischämie zu einer Zunahme von MHC-Klasse-II Proteinen an Endothelzellen und Tubuluszellen des Transplantats. Dies provozierte eine erhöhte immunologische Reaktivität des Empfängers und daher einen signifikant früheren Beginn der Zellinfiltration und der Tubulitis im Vergleich mit allogenen Transplantaten ohne Ischämie (Kouwenhoven, de Bruin et al. 2001). Ferner haben *Serrick et al (1997)* bei Untersuchungen im Rahmen von experimentellen Lungentransplantationen an

Hunden festgestellt, dass die prolongierte Ischämie auch hier eine verstärkte MHC-Klasse-II-Protein Expression induzierte und so zu einer verstärkten Abstoßungsreaktion führte (Serrick, Giaid et al. 1997). Auch in klinischen Studien zur humanen Herztransplantation wurde diese MHC-Klasse-II-Hyperexpression gefunden und mit akuter Abstoßung in Verbindung gebracht (Carlquist, Hammond et al. 1990).

Bei der Lebertransplantation spielt das HLA-Matching keine vergleichbar bedeutende Rolle wie bei der Nieren- oder Lungentransplantation. Ob also hier die MHC-Hyperexpression zur Verstärkung der akuten Abstoßung führt, muss noch untersucht werden. Es ist aber durchaus denkbar, dass im Regelfall das HLA-Matching vernachlässigbar ist, es aber im speziellen Fall der prolongierten Ischämie zur MHC-Hyperexpression kommt und dies zur erhöhten Immunogenität führt.

In der immunhistochemischen Untersuchung im Rahme unserer Studie wurde schon direkt nach Reperfusion eine massenhafte Leukozyten-Infiltration des Transplantats festgestellt. Da der Blutfluss nur eine kurze Zeit wiederhergestellt war, muss aufgrund der sehr kurzen Zeitspanne, in der die Leukozytenmigration in das Transplantat möglich war, ein starkes Signal vorhanden gewesen sein, um derart viele Leukozyten anzulocken. Leukozyten benötigen zur Aktivierung und Migration bestimmte Botenstoffe, die Zytokine und Chemokine. Manche Zellen des Körpers sind zur Zytokin- oder Chemokinproduktion fähig, dazu gehören unter anderem die *v.-Kupfferzellen*, die ortsständigen Makrophagen in der Leber. Es besteht die Möglichkeit, dass die *v.-Kupfferzellen* bei prolongierter Ischämie aktiviert werden, Zytokine bzw. Chemokine produzieren und so für die massenhafte Leukozyten-Infiltration nach Reperfusion verantwortlich sind. *Jassem et al.* (1998) haben bei molekularen Studien über den Ischämie-/Reperfusionsschaden eine solche *v.-Kupfferzellen*-Aktivierung festgestellt (Jassem 1998). Es ist also durchaus denkbar, dass diese Aktivierung der *v.-Kupfferzellen* während der prolongierten Ischämie durch die konsekutive Zytokinproduktion die Immunogenität des Transplantats verstärkt und zu einer Entzündungsreaktion im Sinne einer akuten Abstoßung beiträgt.

Ferner wurde festgestellt, dass es nach Kaltischämie und Reperfusion zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies kommt (Jassem 1998). Diese freien Radikale können mit dem Endothel interagieren und dieses zur vermehrten Bildung von Adhäsionsmolekülen anregen. Adhäsionsmoleküle wie *P-Selektin*, *E-Selektin* und *ICAM-1* spielen eine Rolle bei der Leukozytenmigration aus den Blutgefäßen in das Gewebe (Jassem 1998). Hier bleiben im Blutstrom zirkulierende Leukozyten über Adhäsionsmoleküle am Endothel haften, es kommt über Integrine zur Adhäsion und konsekutiv zur Diapedese. Es ist denkbar, dass es bei prolongierter Ischämie zu vermehrten Bildung von freien Radikalen kommt, die wiederum das Endothel stärker aktivieren und zur vermehrten Bildung von Adhäsionsmolekülen anregen. Es käme zur gesteigerten Leukozytenmigration und zur verstärkten Entzündungsreaktion.

Abbildung 29 bietet einen Überblick über die Auswirkungen des Ischämie-/Reperfusionsschadens:

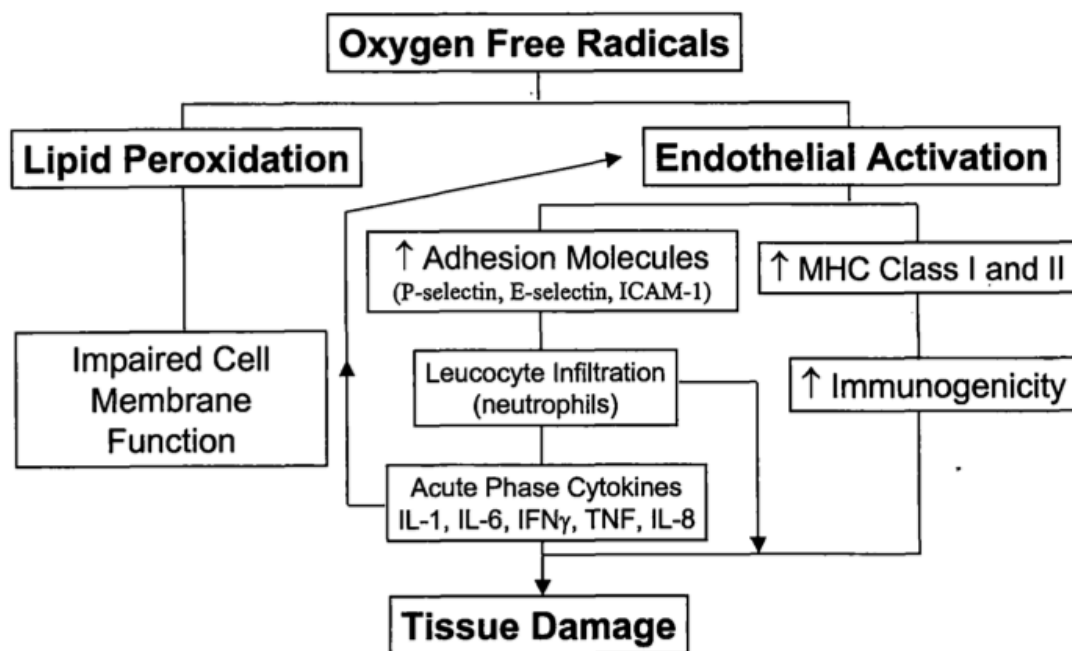


Abb 29: Ischämie-/Reperfusionsschaden und Auswirkungen, Quelle:(Koo 2000)

In Experimenten mit Nierentransplantationen wurde eine derartige Endothel-Aktivierung durch freie Radikale mit konsekutiver Hyperexpression von Adhäsionsmolekülen festgestellt (Koo 2000). Bei experimentellen Herztransplantationen im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Endothel-

Aktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies außerdem auch zu einer vermehrten Produktion des Endothels von akute-Phase-Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF α führt (siehe Abbildung 29) (Ishii, Schenk et al. 2010). Vor allem dem TNF- α kommt in Bezug auf die akute Abstoßungsreaktion eine besondere Rolle zu, da es zur Infiltration des Alлотransplantats mit Neutrophilen und zur Neutrophil-abhängigen Infiltration von CD-8+-T-Zellen beiträgt (Ishii, Schenk et al. 2010). Der Vergleich mit anderen Studien lässt also die Interpretation zu, dass die Endothel-Aktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies bei prolongierter Ischämie eine Ursache der verstärkten Abstoßungsreaktion darstellen kann.

In der von uns durchgeführten Studie konnte eine statistisch signifikante Zunahme der CD25 aktivierten T-Zellen nach prolongierter Ischämie im Vergleich zur kurzen Ischämiedauer von 2 Stunden gezeigt werden. Dies lässt sich als eine früher auftretende und stärker ausgeprägte Abstoßungsreaktion nach prolongierter Ischämie interpretieren. Bereits 1989 hatten *Perkins et al. (1989)* festgestellt, dass Empfänger von Lebertransplantaten, die Episoden akuter Abstoßungen erlitten, erhöhte Serum-Level des löslichen Interleukin-2-Rezeptors (=CD25) aufwiesen, gegenüber Empfänger ohne Abstoßungsreaktionen (Perkins, Nelson et al. 1989).

Lun et al. (2002) stellten sich in ihrer Studie der Frage nach dem Einfluss des Immunstatus der Empfänger vor der Lebertransplantation auf das Auftreten von akuten Abstoßungsreaktionen. Hierzu wurde unter anderem die Expression von CD25 vor der Ltx gemessen. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten, die eine Episode mit akuter Abstoßung entwickelten und Patienten, bei denen dies nicht der Fall war, festgestellt werden (Lun, Cho et al. 2002).

Somit liegt die Vermutung nahe, dass der Ischämie-/Reperfusionsschaden zu einer Zunahme der CD25 aktivierten T-Zellen im Transplantat führt und dadurch eine beschleunigte und verstärkte Abstoßungsreaktion auslöst.

4.3 Klinische Relevanz

Die akute Abstoßung stellt ein zentrales Problem im klinischen Alltag dar. Sie bestimmt maßgeblich die Morbidität und Mortalität des Patienten und beeinflusst

dessen Lebensqualität, unter anderem durch die resultierende Einnahme von Immunsuppressiva (Post, Douglas et al. 2005, Sanchez-Fueyo 2013).

Unter anderem wurde festgestellt, dass Abstoßungsreaktionen zur Transplantatdysfunktion beitragen (Klintmalm, Nery et al. 1989). In einer retrospektiven klinischen Studie, in der Biopsien von 104 Empfängern nach Lebertransplantation untersucht wurden, konnte bestätigt werden, dass 60,6% der Transplantatdysfunktionen auf akute Abstoßungsreaktionen zurückzuführen waren (Klintmalm, Nery et al. 1989).

Eine unzureichende Immunsuppression stellt einen Risikofaktor für das Auftreten der chronischen Abstoßung dar. Werden die zur adäquaten Unterdrückung des Immunsystems benötigten Wirkspiegel nicht erreicht kommt es zu wiederholten Episoden akuter Abstoßungsreaktionen. Diese können das Entstehen der chronischen Abstoßung begünstigen (Almond, Matas et al. 1993, Neuberger and Adams 1998).

Ferner wurde festgestellt, dass auch die Gradeinteilung der akuten Abstoßung mit dem Outcome des Patienten assoziiert ist. Je schwerer die akute Abstoßung auftritt, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Wiederholung und dadurch der Entstehung der chronischen Abstoßung mit konsekutivem Transplantatverlust (Wiesner, Demetris et al. 1998, Charlton 2013). Studien haben gezeigt, dass in manchen Fällen *Mycophenolat-Mofetil* die chronische Abstoßung erfolgreich verhindern konnte, dies gilt jedoch nicht für alle betroffenen Patienten, so dass die Retransplantationsrate bei chronischer Abstoßung noch immer bei ca. 16% liegt (Snover, Freese et al. 1987, Asfar, Metrakos et al. 1996).

Die Langzeitprognose der lebertransplantierten Patienten wird heute im Wesentlichen von den Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie bestimmt. *Cyclosporin A* und *Tacrolimus* sind effektive Medikamente zur Unterdrückung der Abstoßungsreaktion, allerdings können diese auch schwerwiegende Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, Diabetes mellitus oder gastrointestinale Beschwerden hervorrufen. Besonders hervorzuheben ist die Nephrotoxizität, die eine akute, aber auch eine langfristige Komplikation darstellen kann, und für 20% des

Nierenversagens nach Lebertransplantation verantwortlich ist (Post, Douglas et al. 2005, Charlton 2013). Insbesondere bei Patienten mit vorgeschädigten Nieren gilt es das Risiko der akuten Abstoßung gegenüber der Gefahr einer weiteren schwerwiegenden Nierenschädigung abzuwägen und ein individuell angepasstes Immunsuppressionsschema anzuwenden.

Ferner gilt die Überlegung, bei diesen Patienten Transplantationen von Organen mit prolongierter Ischämie, durch die mit einer verstärkten Abstoßungsreaktion zu rechnen ist, zu vermeiden. So könnte verhindert werden, dass diese Patienten einem härteren Schema zugeführt werden müssen.

Vor dem Hintergrund des herrschenden Organmangels muss allerdings immer häufiger auf marginale Organe mit prolongierter Ischämie zurückgegriffen werden. Daher sollten Überlegungen angestellt werden, wie die immunsuppressive Therapie bei Patienten mit bereits eingeschränkter Nierenfunktion angepasst werden könnte.

Wie in der von uns durchgeführten Studie gezeigt, führt die prolongierte Ischämie unter anderem zu einer signifikanten Zunahme von CD25 aktivierten T-Zellen, die eine zentrale Rolle in der Abstoßungsreaktion einnehmen.

Baan et al. (2001) konnten zeigen, dass Anti-CD25 Antikörper wie *Basiliximab* das Auftreten von akuter Abstoßung bei Nieren-Transplantaten reduzieren konnten (Boelaars-van Haperen, Baan et al. 2001).

Basiliximab ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen die alpha-Kette (CD25) des hochaffinen Interleukin-2 Rezeptors richtet. Diese Antikörper blockieren die IL-2-abhängige klonale Expansion von antigen-aktivierten T-Zellen ohne einen Effekt auf ruhende T-Zellen auszuüben (Williams, Thiel et al. 1999).

Bei *Cantarovich et al (2002)* konnte dank dem Einsatz von Anti-CD25 Antikörpern eine akute Abstoßung vermieden werden. Hier musste bei organtransplantierten Patienten, die aufgrund der immunsuppressiven Therapie ein akutes Nierenversagen entwickelten, die Calcineurin-Dosis reduziert werden (Cantarovich, Metrakos et al. 2002).

Es besteht daher die Möglichkeit, dass durch den Einsatz von Anti-CD25 Antikörpern die Dosis von nephrotoxischen Calcineurin-Inhibitoren wie *Cyclosporin A* eingespart

werden könnte. *Gassel et al. (2000)* haben anhand ihrer Studie mit Lebertransplantationen im Rattenmodell gezeigt, dass eine Kombination von monoklonalen Antikörpern gegen CD25 und *ICAM-1* mit einer subtherapeutischen Dosis Cyclosporin A sowohl akute als auch chronische Abstoßungen vermeiden konnte und sogar eine gewisse Toleranz gegenüber dem Transplantat induziert wurde (Hong and Kahan 1999, Gassel, Otto et al. 2000). Als klinische Konsequenz könnte das bedeuten, dass *Cyclosporin A* in einer Kombinations-Therapie mit monoklonalen Anti-CD25 Antikörpern eingespart und dadurch Nierenschädigungen mit konsekutivem Nierenversagen vermieden werden könnten. Auch der Gebrauch von Kortikosteroiden kann reduziert werden, wenn weniger Episoden mit akuten Abstoßungen auftreten.

Kortikosteroide sind heute noch immer in der Therapie der akuten Abstoßung, sowie in der Erhaltungstherapie im Einsatz. Auch sie haben viele Nebenwirkungen wie Hypertension, Hyperglykämie, Osteoporose und das vermehrte Auftreten von Magenulzerationen. Entscheidend für das Outcome des lebertransplantierten Patienten ist allerdings die Tatsache, dass sie nicht selektiv den Abstoßungsvorgang gegen das implantierte Organ unterdrücken, sondern auch die Abwehr gegen allgemeine Krankheitserreger. Dadurch besteht bei den Patienten eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen und Pilzinfektionen, sowie ein erhöhtes Risiko für das Auftreten maligner Erkrankungen (Post, Douglas et al. 2005). Besonders Pilzinfektionen bei immunsupprimierten Patienten sind stark mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (Kirby, McMaster et al. 1987, Asfar, Metrakos et al. 1996).

Bei Patienten, die sich aufgrund einer chronischen Hepatitis-C-Infektion (HCV) einer Lebertransplantation unterzogen haben, gestaltet sich die postoperative Nachsorge bezogen auf die immunsuppressive Therapie besonders kompliziert. Es konnte gezeigt werden, dass HCV-Patienten besonders empfindlich auf akute Abstoßungen reagieren und ihre Mortalität signifikant erhöht war, wenn sie eine Episode der akuten Abstoßungsreaktion entwickelten (Charlton 2013). Dies bedeutet, dass bei diesen Patienten durch angepasste Immunsuppression Abstoßungsreaktionen streng vermieden werden müssen. Andererseits besteht durch das geschwächte Immunsystem die erhöhte Gefahr einer Hepatitis-C-Reinfektion (Post, Douglas et al. 2005). Auch hier ist eine Risikoabwägung und Entwicklung einer stark

individualisierten immunsuppressiven Therapie indiziert. Es wurde zum Beispiel festgestellt, dass *Tacrolimus* bei HCV-Patienten bezüglich des Outcomes von Transplantat und Patient einen Vorteil gegenüber *Cyclosporin A* bietet (Charlton 2013). Durch eine Kombination der Therapie mit Anti-CD25 könnte speziell bei HCV-Patienten die Calcineurin-Dosis eingespart werden und so HCV-Reinfektionen vermieden werden, ohne ein erhöhtes Risiko von vermehrten Abstoßungsreaktionen.

Ein weiterer Lösungsansatz zur Einsparung von Immunsuppressiva wäre zum Beispiel die Herstellung einer speziellen Perfusionslösung. *Steurer et al. (1995)* fanden in ihrer experimentellen Studie anhand von Pankreas-Transplantationen im Mausmodell heraus, dass durch eine einstündliche Vorbehandlung der Transplantate mit CTLA4/Fc eine erhöhte Toleranz des Empfängers induziert werden konnte. CTLA4/Fc ist ein Fusionsprotein, welches die Proliferation von Lymphozyten in Mäusen blockiert. *Steurer et al. (1995)* entdeckten dass, obwohl vollständig auf systemische Immunsuppression verzichtet wurde, eine Toleranzinduktion stattfand, es nicht vermehrt zu Abstoßungsreaktionen kam und sogar die primäre Transplantatfunktion verbessert werden konnte (Steurer, Nickerson et al. 1995). Vielleicht wäre es eine Option, mit einer speziellen Anti-CD25-Perfusionslösung die Lebertransplantate, bei denen mit prolongierter Ischämie zu rechnen ist, vorzubehandeln und so wieder die systemische Immunsuppression zu reduzieren, ohne vermehrt Abstoßungsreaktionen zu provozieren.

Zusammenfassend lässt sich folgendes postulieren: Kommt es nach Transplantation von Organen mit prolongierter Ischämie früher und stärker zur akuten Abstoßung, wie in dieser Studie festgestellt, bedeutet dies für den Patienten die vermehrte Einnahme von Immunsuppressiva mit den aufgeführten Nebenwirkungen und Langzeitrisiken. Ferner bedeutet es die erhöhte Gefahr der chronischen Abstoßung mit konsekutivem Transplantatverlust und der Notwendigkeit der Retransplantation. Insbesondere vor dem Hintergrund des herrschenden Organmangels sollte überdacht werden, für welche Patientengruppen marginale Organe mit prolongierter Ischämie in Betracht gezogen werden können.

4.4 Eigene Anmerkungen zur durchgeführten Studie

In dieser Studie wurde der Einfluss der prolongierten Ischämie auf das Auftreten und das Ausmaß der akuten Abstoßungsreaktion untersucht. Hierzu wurden Lebertransplantationen an gesunden allogenen Lewis- und DA-Ratten durchgeführt.

Dabei wurde nicht berücksichtigt, dass auch weitere Faktoren einen Einfluss auf die akute Abstoßung haben. Zum Beispiel spielt die zugrundeliegende Erkrankung, die zur Indikationsstellung der Transplantation geführt hat, eine große Rolle bezüglich des Risikos, ob eine akute Abstoßung auftritt oder nicht. Patienten, die aufgrund einer Hepatitis B oder einer Autoimmunhepatitis transplantationspflichtig wurden, haben mit 60% ein doppelt so hohes Risiko im Vergleich zu Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung, mindestens eine Episode der akuten Abstoßung zu entwickeln (Wiesner, Demetris et al. 1998).

Ferner wurde festgestellt, dass der Hirntod des Spenders mit dem nachfolgenden Verlust vieler vitaler Funktionen ebenso Auswirkungen auf die Immunantwort hat und zur beschleunigten Abstoßung führt (Koo 2000). Im Vergleich zu Lebendspenden tritt eine Abstoßungsreaktion bei Empfängern von hirntoten Spendern deutlich häufiger auf. Gründe hierfür sind einerseits die Auswirkungen des Hirntods selbst auf immunologische Vorgänge und die im Durchschnitt längeren Ischämiezeiten als bei Lebendspenden andererseits (Jassem, Koo et al. 2003).

Ein weiteres Kriterium mit Einfluss auf akute Abstoßungen ist das Alter sowohl des Spenders als auch des Empfängers. Ein jüngerer Empfänger entwickelt deutlich häufiger Episoden der akuten Abstoßung als ein älterer Patient, da die Reaktivität des Immunsystems im Alter stetig abnimmt. Beim Spender wiederum führt ein fortgeschrittenes Alter zu einem erhöhten Abstoßungsrisiko (Wiesner, Demetris et al. 1998).

Ferner wurde festgestellt, dass gesündere Empfänger eher eine akute Abstoßungsreaktion entwickeln, als Patienten mit Aszites oder eingeschränkter Nierenfunktion (Wiesner, Demetris et al. 1998).

Im Vergleich zu den Spendern in unserer Studie sind die Organspender im klinischen Alltag sehr selten vollständig gesund. Um eine noch genauere klinische Vergleichbarkeit zu erzielen, wäre es sinnvoll zusätzlich die Einflussfaktoren des Spenders zu berücksichtigen. Im Tiermodell wäre es zum Beispiel durchaus möglich, Laborratten mit Fettlebern zu transplantieren und den Einfluss der prolongierten Ischämie bei zusätzlich vorgeschädigten Organen zu evaluieren. Fettlebern bei Ratten können durch eine spezielle Ernährung induziert werden.

In der von uns durchgeführten Studie handelte es sich um Finalversuche. Das bedeutet, dass die Tiere direkt nach Transplantation euthanasiert wurden, um die Transplantate zu entnehmen und zu untersuchen. In darauf aufbauenden Studien bietet es sich an, die Tiere eine gewisse Zeit überleben zu lassen, vielleicht sogar mit dem Ableben der Tiere als Endpunkt, und zu beobachten, wie sich die Transplantatfunktion im Verlauf entwickelt.

Um die Frage nach der klinischen Relevanz der Ergebnisse dieser Studie vollständig zu beantworten, müssen also weitere Studien abgewartet werden. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, dass die prolongierte Ischämie prinzipiell Einfluss auf die akute Abstoßung und damit auf die Transplantatfunktion und das Outcome des Patienten nimmt.

4.5 Anmerkungen zur Transplantationsmedizin

Aufgrund des eklatanten Organmangels werden marginale Organe mit prolongierter Ischämie immer häufiger transplantiert. Es sollten Überlegungen angestellt werden, wie die Organfunktion nach Transplantation verbessert und so die Morbidität des Empfängers reduziert werden kann. Da akute Abstoßungsreaktionen die Transplantatfunktion verschlechtern können und folglich zur Morbidität des Patienten beitragen und seine Lebensqualität beeinflussen, ist es durchaus sinnvoll, Anstrengungen zu unternehmen, diese zu vermeiden.

Es wäre zum Beispiel denkbar, bei der Vergabe von Organen mit prolongierter Ischämie eher ältere Empfänger zu berücksichtigen, die aufgrund des weniger reaktiven Immunsystems einem geringeren Risiko ausgesetzt sind, Abstoßungsreaktionen zu entwickeln. Andererseits stellt sich die Frage, ob es

ethisch vertretbar ist, dass ältere Patienten bevorzugt marginale Organe nur aufgrund ihres Alters erhalten und damit vermehrt dem Risiko der schlechteren Transplantatfunktion ausgesetzt sind.

Alternativ könnte man auch erwägen, Organe mit prolongierter Ischämie je nach Grunderkrankung bzw. anhand des Risikos der Rekurrenz der Grunderkrankung durch verstärkte Immunsuppression zu allokieren. Zum Beispiel besteht bei der alkoholtoxischen Leberzirrhose oder beim Paracetamol-induzierten Leberversagen kein Risiko des Wiederauftretens durch verstärkte Immunsuppression, während das Risiko der Rekurrenz eines hepatozellulären Karzinoms deutlich erhöht ist. Bei der Autoimmunhepatitis hat die Immunsuppression sogar einen protektiven Effekt (Trotter 2013).

Bei der Vergabe marginaler Organe mit prolongierter Ischämie sollte dringend eine der wichtigsten Nebenwirkungen der immunsuppressiven Therapie mit Calcineurin Inhibitoren wie *Cyclosporin A* oder *Tacrolimus* berücksichtigt werden: die Nephrotoxizität. Patienten mit vorgeschädigten Nieren sind bei verstärkter Immunsuppression enorm gefährdet, ein akutes Nierenversagen zu entwickeln. Bisher werden jedoch besonders diese Patienten, aufgrund ihres hohen MELD-Scores, bei der Vergabe von Organen berücksichtigt. Daher ist es gerechtfertigt, die gängige Organallokation zu hinterfragen. Nach Einführung der Allokation anhand des MELD-Scores konnte zwar die Mortalität der Patienten auf der Warteliste von 20 auf 10% gesenkt werden, allerdings ist das 1-Jahres-Überleben nach Transplantation von 90% auf 80% gesunken (Schrem, Till et al. 2008). Aufgrund des Organmangels kann ein Patient erst transplantiert werden, wenn er schon sehr stark durch seine Erkrankung beeinträchtigt ist. Hat der Patient aber einen MELD-Score von größer als 30 erreicht, ist seine Überlebenschance im Vergleich zu einem Patienten mit niedrigerem MELD-Score deutlich reduziert (Weismuller, Fikatas et al. 2011). Erhält nun ein Patient mit hohem MELD-Score ein marginales Spenderorgan, sinken die Chancen auf eine erfolgreiche Transplantation. Um die Ergebnisse der Lebertransplantation zu verbessern, sollte man überlegen, ob der MELD-Score zur Organallokation noch zeitgemäß ist oder ob die Richtlinien, besonders unter Berücksichtigung der immer häufigeren Verwendung marginaler Organe, erweitert werden sollten. *Keller et al.* (2014) stellten hierzu Überlegungen an und kamen zu

dem Schluss, dass ein „survival benefit-based liver allocation“ Modell eine verbesserte Effektivität bei Lebertransplantationen zur Folge hätte (Keller, Kwo et al. 2014).

Langfristig muss es allerdings das Ziel sein, die Spendebereitschaft in der Bevölkerung zu erhöhen, um durch mehr Organspenden dem stetig wachsenden Bedarf an Spenderorganen gerecht zu werden. Zwar zeigt die Reform der Organspenderegelung von einer Zustimmungslösung zur Entscheidungslösung im Jahre 2012, dass die Politik das Problem der ungenügenden Spenderzahlen erkannt hat, dennoch ist dies nur ein kleiner Schritt in die richtige Richtung, für vermehrte und verbesserte Aufklärung in der Bevölkerung zu sorgen. Ideal wäre die Einführung einer Widerspruchslösung, wie sie in Ländern mit starken Spenderzahlen, wie Österreich oder Spanien, praktiziert wird. Diese Regelung macht jeden Bürger automatisch zum Organspender, außer er hat sich zu Lebzeiten aktiv dagegen ausgesprochen. Von Vorteil ist hier besonders, dass im Falle des Falles kein trauernder Angehöriger die schmerzliche Entscheidung über den mutmaßlichen Willen des Verstorbenen treffen muss.

Darüber hinaus ist es wichtig, das Personal in den Kliniken gezielt aufzuklären und so, sowie durch bessere Strukturen und bessere Organisation in den Kliniken, die Organspendezahl zu erhöhen. Schon im Medizinstudium bei der Ausbildung zukünftiger Ärzte sollte das Thema Organspende einen deutlich höheren Stellenwert einnehmen als dies jetzt noch der Fall ist.

5 Zusammenfassung

Die Lebertransplantation stellt heutzutage ein klinisch etabliertes Verfahren zur Therapie von zahlreichen irreversiblen Lebererkrankungen im Endstadium dar.

Trotz der ständigen Weiterentwicklung in der Transplantationsmedizin ist es noch immer ein Verfahren, das nicht frei von Risiken ist. Die akute Abstoßung nach Transplantation ist zum Beispiel trotz adäquater Immunsuppression weiterhin ein relevantes klinisches Problem. Methoden ausfindig zu machen, um

Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, ist somit stets von großer klinischer Bedeutung.

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die prolongierte Ischämie einen stärkeren Ischämie-/Reperfusionsschaden zur Folge hat. Das Ziel dieser experimentellen Studie im allogenen Rattenmodell der orthotopen Lebertransplantation war zum einen zu zeigen, dass die prolongierte Ischämie zu einer beschleunigten und verstärkten Abstoßungsreaktion führt und zum anderen die Rolle des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei der Ausbildung der akuten Abstoßung zu charakterisieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass bei Transplantation von Organen mit prolongierter Ischämie eine massive Infiltration des Transplantats mit Immunzellen bereits direkt nach Reperfusion stattgefunden hat. Untersucht wurden drei Zellreihen: CD8 T-Zellen, CD25 aktivierte T-Zellen und Makrophagen. Diese massive Infiltration zeigt, dass sich hier bereits eine akute Abstoßungsreaktion ereignete. Entgegen der bisherigen Annahme, dass eine akute Abstoßungsreaktion nicht vor dem fünften Tag nach Transplantation sichtbar ist, zeigen diese Ergebnisse, dass die akute Abstoßung bei prolongierter Ischämie deutlich früher auftritt, als bei kurzen Ischämiezeiten.

Ferner wurde gezeigt, dass die Zunahme der beobachteten drei Zellreihen (CD8, CD25 und Makrophagen) nach prolongierter Ischämie (acht Stunden) im Vergleich zur zweistündigen Ischämiedauer deutlicher ausfiel. Dies spricht für eine Verstärkung der Abstoßungsreaktion nach prolongierter Ischämie.

Im Rahmen einer Lebertransplantation kommt es nach Reperfusion zu einem Ischämie-/Reperfusionsschaden. Dieser fällt nach prolongierter Ischämie stärker aus als nach kurzen Ischämiedauern. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die prolongierte Ischämie und damit ein größerer Ischämie-/Reperfusionsschaden zu einer beschleunigten und verstärkten akuten Abstoßungsreaktion führt.

6 Literaturverzeichnis

Uncategorized References

"Eurotransplant: Number of transplants performed from post-mortem donors registered during 2005."

Adams, D. H. and J. M. Neuberger (1990). "Patterns of graft rejection following liver transplantation." J Hepatol **10**(1): 113-119.

Almond, P. S., A. Matas, K. Gillingham, D. L. Dunn, W. D. Payne, P. Gores, R. Gruessner and J. S. Najarian (1993). "Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients." Transplantation **55**(4): 752-756; discussion 756-757.

Anton, L. C., J. W. Yewdell and J. R. Bennink (1997). "MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies." J Immunol **158**(6): 2535-2542.

Asfar, S., P. Metrakos, J. Fryer, D. Verran, C. Ghent, D. Grant, M. Bloch, P. Burns and W. Wall (1996). "An analysis of late deaths after liver transplantation." Transplantation **61**(9): 1377-1381.

Aw, M. M. (2003). "Transplant immunology." J Pediatr Surg **38**(9): 1275-1280.

Belzer, F. O. and J. H. Southard (1988). "Principles of solid-organ preservation by cold storage." Transplantation **45**(4): 673-676.

Benckert, C., S. Jonas, A. Thelen, A. Spinelli, G. Schumacher, M. Heise, J. Langrehr and P. Neuhaus (2005). "Liver transplantation for hepatocellular carcinoma in cirrhosis: prognostic parameters." Transplant Proc **37**(4): 1693-1694.

Bijur, S. (1996). "Current concepts in the immunology of allograft rejection." Indian J Med Sci **50**(1): 13-19.

Boelaars-van Haperen, M. J., C. C. Baan, I. C. van Riemsdijk, I. J. JN and W. Weimar (2001). "Treatment with the chimeric anti-IL-2Ralpha basiliximab affects both the IL-2 and IL-15 signalling pathways after clinical kidney transplantation." Transplant Proc **33**(1-2): 1007-1008.

Briceno, J., T. Marchal, J. Padillo, G. Solorzano and C. Pera (2002). "Influence of marginal donors on liver preservation injury." Transplantation **74**(4): 522-526.

Buer, J., I. Aifantis, J. P. DiSanto, H. J. Fehling and H. von Boehmer (1997). "Role of different T cell receptors in the development of pre-T cells." J Exp Med **185**(9): 1541-1547.

Bzeizi, K. I., R. Dawkes, N. J. Dodd, J. N. Plevris and P. C. Hayes (1997). "Graft dysfunction following liver transplantation: role of free radicals." J Hepatol **26**(1): 69-74.

Calmus, Y. (2008). "[Liver transplantation for cancer]." Rev Prat **58**(16): 1745-1748.

Cantarovich, M., P. Metrakos, N. Giannetti, R. Cecere, J. Barkun and J. Tchervenkov (2002). "Anti-CD25 monoclonal antibody coverage allows for calcineurin inhibitor "holiday" in solid organ transplant patients with acute renal dysfunction." Transplantation **73**(7): 1169-1172.

Carini, R., R. Autelli, G. Bellomo, M. U. Dianzani and E. Albano (1995). "Sodium-mediated cell swelling is associated with irreversible damage in isolated hepatocytes exposed to hypoxia or mitochondrial toxins." Biochem Biophys Res Commun **206**(1): 180-185.

Carlquist, J. F., M. E. Hammond, R. L. Yowell, J. B. O'Connell and J. L. Anderson (1990). "Correlation between class II antigen (DR) expression and interleukin-2-induced lymphocyte proliferation during acute cardiac allograft rejection." Transplantation **50**(4): 582-588.

Charlton, M. R. (2013). "How important is acute cellular rejection?" Liver Transpl **19 Suppl 2**: S9-13.

Cray, S. H., M. W. Crawford, N. Khayyam and F. J. Carmichael (2001). "Effects of hypoxia and isoflurane on liver blood flow: the role of adenosine." Br J Anaesth **86**(3): 425-427.

Czitrom, A. A. (1996). "The immune response: the afferent arm." Clin Orthop Relat Res(326): 11-24.

Daar, A. S., S. V. Fuggle, J. W. Fabre, A. Ting and P. J. Morris (1984). "The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs." Transplantation **38**(3): 287-292.

Daar, A. S., S. V. Fuggle, J. W. Fabre, A. Ting and P. J. Morris (1984). "The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs." Transplantation **38**(3): 293-298.

Dausset, J. (1981). "The major histocompatibility complex in man." Science **213**(4515): 1469-1474.

Degterev, A. and J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 378-390.

Demetriou, A. A., J. Whiting, S. M. Levenson, N. R. Chowdhury, R. Schechner, S. Michalski, D. Feldman and J. R. Chowdhury (1986). "New method of hepatocyte transplantation and extracorporeal liver support." Ann Surg **204**(3): 259-271.

Demetris, A. J., S. Lasky, D. H. Van Thiel, T. E. Starzl and A. Dekker (1985). "Pathology of hepatic transplantation: A review of 62 adult allograft recipients immunosuppressed with a cyclosporine/steroid regimen." Am J Pathol **118**(1): 151-161.

Demetris, A. J., N. Murase, R. G. Lee, P. Randhawa, A. Zeevi, S. Pham, R. Duquesnoy, J. J. Fung and T. E. Starzl (1997). "Chronic rejection. A general overview of histopathology and pathophysiology with emphasis on liver, heart and intestinal allografts." Ann Transplant **2**(2): 27-44.

- Deng, Y., J. W. Yewdell, L. C. Eisenlohr and J. R. Bennink (1997). "MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL." J Immunol **158**(4): 1507-1515.
- Deschenes, M., S. H. Belle, R. A. Krom, R. K. Zetterman and J. R. Lake (1998). "Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database." Transplantation **66**(3): 302-310.
- Dijkstra, C. D., E. A. Dopp, P. Joling and G. Kraal (1985). "The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3." Immunology **54**(3): 589-599.
- Doerr, S., Uehlinger (2000). Pathologie der Leber und Gallenwege, Springer Verlag.
- Dörner, K., Battista, H.-J., Deufel, Th., Dörner, R., Gibitz, H.J., Klingmüller, D., Löffler, H., Sommer, R., Witt, I. (2003). Leberdiagnostik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Eger, E. I., 2nd (1981). "Isoflurane: a review." Anesthesiology **55**(5): 559-576.
- Ellis, R. E., J. Y. Yuan and H. R. Horvitz (1991). "Mechanisms and functions of cell death." Annu Rev Cell Biol **7**: 663-698.
- Engerson, T. D., T. G. McKelvey, D. B. Rhyne, E. B. Boggio, S. J. Snyder and H. P. Jones (1987). "Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat tissues." J Clin Invest **79**(6): 1564-1570.
- Eurotransplant (2020). www.Eurotransplant.org.
- Fan, Y. D., M. Praet, B. Vanzielegem, D. Vanwynsberghe, D. Stoop, G. Leroux-Roels, J. Delanghe and B. de Hemptinne (2000). "Effects of Re-arterialization on early graft function and regeneration in the rat model of heterotopic auxiliary liver transplantation." Eur Surg Res **32**(1): 11-17.
- Fink, S. L. and B. T. Cookson (2005). "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells." Infect Immun **73**(4): 1907-1916.
- Flisiak, R. (1997). "Role of Ito cells in the liver function." Pol J Pathol **48**(3): 139-145.
- Florine-Casteel, K., J. J. Lemasters and B. Herman (1991). "Lipid order in hepatocyte plasma membrane blebs during ATP depletion measured by digitized video fluorescence polarization microscopy." FASEB J **5**(7): 2078-2084.
- Frenzel, H., B. Kremer, I. E. Richter and H. Hucker (1976). "[The fine structure of liver sinusoids after perfusion fixation with various pressures. A transmission and scanning electron microscopic study (author's transl)]." Res Exp Med (Berl) **168**(3): 229-241.

Fuggle, S. V., D. L. McWhinnie, J. R. Chapman, H. M. Taylor and P. J. Morris (1986). "Sequential analysis of HLA-class II antigen expression in human renal allografts. Induction of tubular class II antigens and correlation with clinical parameters." Transplantation **42**(2): 144-150.

Furukawa, H., S. Todo, O. Imventarza, A. Casavilla, Y. M. Wu, C. Scotti-Foglieni, B. Broznick, J. Bryant, R. Day and T. E. Starzl (1991). "Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution." Transplantation **51**(5): 1000-1004.

Galluzzi, L., S. A. Aaronson, J. Abrams, E. S. Alnemri, D. W. Andrews, E. H. Baehrecke, N. G. Bazan, M. V. Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D. E. Bredesen, C. Brenner, M. Castedo, J. A. Cidlowski, A. Ciechanover, G. M. Cohen, V. De Laurenzi, R. De Maria, M. Deshmukh, B. D. Dynlacht, W. S. El-Deiry, R. A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, P. Golstein, M. L. Gougeon, D. R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J. M. Hardwick, M. O. Hengartner, H. Ichijo, M. Jaattela, O. Kepp, A. Kimchi, D. J. Klionsky, R. A. Knight, S. Kornbluth, S. Kumar, B. Levine, S. A. Lipton, E. Lugli, F. Madeo, W. Malomi, J. C. Marine, S. J. Martin, J. P. Medema, P. Mehlen, G. Melino, U. M. Moll, E. Morselli, S. Nagata, D. W. Nicholson, P. Nicotera, G. Nunez, M. Oren, J. Penninger, S. Pervaiz, M. E. Peter, M. Piacentini, J. H. Prehn, H. Puthalakath, G. A. Rabinovich, R. Rizzuto, C. M. Rodrigues, D. C. Rubinsztein, T. Rudel, L. Scorrano, H. U. Simon, H. Steller, J. Tschopp, Y. Tsujimoto, P. Vandenabeele, I. Vitale, K. H. Vousden, R. J. Youle, J. Yuan, B. Zhivotovsky and G. Kroemer (2009). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes." Cell Death Differ **16**(8): 1093-1107.

Gao, W., J. J. Lemasters and R. G. Thurman (1993). "Development of a new method for hepatic rearterialization in rat orthotopic liver transplantation. Reduction of liver injury and improvement of surgical outcome by arterialization." Transplantation **56**(1): 19-24.

Gasbarrini, A., A. B. Borle, H. Farghali, C. Bender, A. Francavilla and D. Van Thiel (1992). "Effect of anoxia on intracellular ATP, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, and cytotoxicity in rat hepatocytes." J Biol Chem **267**(10): 6654-6663.

Gassel, H. J., C. Otto, A. M. Gassel, D. Meyer, U. Steger, W. Timmermann, K. Ulrichs and A. Thiede (2000). "Tolerance of rat liver allografts induced by short-term selective immunosuppression combining monoclonal antibodies directed against CD25 and CD54 with subtherapeutic cyclosporine." Transplantation **69**(6): 1058-1067.

Grisham, M. B., L. A. Hernandez and D. N. Granger (1986). "Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia." Am J Physiol **251**(4 Pt 1): G567-574.

Gubernatis, G., J. Kemnitz, A. Bornscheuer, E. R. Kuse and R. Pichlmayr (1989). "Potential various appearances of hyperacute rejection in human liver transplantation." Langenbecks Arch Chir **374**(4): 240-244.

H.B., W. (1980). Experimental and surgical technique in the rat.

Haiges, D. (2015). Quantifizierung des Reperfusionsschadens anhand der mitochondrialen Permeabilität zur Prädiktion der Transplantabilität von marginalen Organen im Rattenmodell der orthotopen Lebertransplantation.

Hashimoto, T., Y. Sugawara, Y. Kishi, N. Akamatsu, S. Tamura, K. Hasegawa, H. Imamura, N. Kokudo and M. Makuuchi (2005). "Long-term survival and causes of late graft loss after adult-to-adult living donor liver transplantation." Transplant Proc **37**(10): 4383-4385.

Hasuike, Y., M. Monden, L. A. Valdivia, N. Kubota, M. Gotoh, Y. Nakano, J. Okamura and T. Mori (1988). "A simple method for orthotopic liver transplantation with arterial reconstruction in rats." Transplantation **45**(4): 830-832.

Hautekeete, M. L. and A. Geerts (1997). "The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease." Virchows Arch **430**(3): 195-207.

He, X. S., Y. Ma, L. W. Wu, W. Q. Ju, G. H. Chen, R. D. Hu and J. F. Huang (2003). "Influence of warm ischemia injury on hepatic functional status and survival of liver graft in rats." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **2**(4): 504-508.

Hengartner, M. O. (2000). "The biochemistry of apoptosis." Nature **407**(6805): 770-776.

Heublein, B., A. Haverich and H. G. Borst (1990). "Long-term follow-up after orthotopic heart transplantation." Thorac Cardiovasc Surg **38**(5): 285-290.

Hitomi, J., D. E. Christofferson, A. Ng, J. Yao, A. Degterev, R. J. Xavier and J. Yuan (2008). "Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway." Cell **135**(7): 1311-1323.

Holscher, M. and A. F. Groenewoud (1991). "Current status of the HTK solution of Bretschneider in organ preservation." Transplant Proc **23**(5): 2334-2337.

Hong, J. C. and B. D. Kahan (1999). "Use of anti-CD25 monoclonal antibody in combination with rapamycin to eliminate cyclosporine treatment during the induction phase of immunosuppression." Transplantation **68**(5): 701-704.

Hood, L., M. Steinmetz and R. Goodenow (1982). "Genes of the major histocompatibility complex." Cell **28**(4): 685-687.

Hood, L., M. Steinmetz, R. Goodenow, K. Eakle, D. Fisher, J. Kober, B. Malissen, M. Malissen, M. McMillan, J. McNicholas, A. Orn, M. Pecht, B. T. Sher, L. Smith, I. Stroynowski, H. Sun, A. Winoto and M. Zuniga (1983). "Genes of the major histocompatibility complex." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **47 Pt 2**: 1051-1065.

Hood, L., M. Steinmetz and B. Malissen (1983). "Genes of the major histocompatibility complex of the mouse." Annu Rev Immunol **1**: 529-568.

Horowitz, M. C., G. E. Friedlaender and H. Y. Qian (1996). "The immune response: the efferent arm." Clin Orthop Relat Res(326): 25-34.

Howard, T. K., G. B. Klintmalm, J. B. Cofer, B. S. Husberg, R. M. Goldstein and T. A. Gonwa (1990). "The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient." Transplantation **49**(1): 103-107.

Imai, M., S. Kon and H. Inaba (1996). "Effects of halothane, isoflurane and sevoflurane on ischemia-reperfusion injury in the perfused liver of fasted rats." Acta Anaesthesiol Scand **40**(10): 1242-1248.

Ishii, D., A. D. Schenk, S. Baba and R. L. Fairchild (2010). "Role of TNFalpha in early chemokine production and leukocyte infiltration into heart allografts." Am J Transplant **10**(1): 59-68.

Jaeschke, H. and A. Farhood (1991). "Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver." Am J Physiol **260**(3 Pt 1): G355-362.

Jassem, W. (1998). "The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation." Transplantation Reviews **12**(1 (January)): 14-33.

Jassem, W., D. D. Koo, L. Cerundolo, M. Rela, N. D. Heaton and S. V. Fuggle (2003). "Cadaveric versus living-donor livers: differences in inflammatory markers after transplantation." Transplantation **76**(11): 1599-1603.

Junquera LC, C. J., Schiebler TH (1996). Histologie, Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.

Kamada, N. (1987). Technique in the rat. Orlando, Grune&Stratton.

Kamada, N. and R. Y. Calne (1979). "Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage." Transplantation **28**(1): 47-50.

Kamada, N. and R. Y. Calne (1983). "A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat." Surgery **93**(1 Pt 1): 64-69.

Kamiike, W., M. Burdelski, G. Steinhoff, B. Ringe, W. Lauchart and R. Pichlmayr (1988). "Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation." Transplantation **45**(1): 138-143.

Kane, L. P., J. Lin and A. Weiss (2000). "Signal transduction by the TCR for antigen." Curr Opin Immunol **12**(3): 242-249.

Kaneda, K., N. Kurioka, S. Seki, K. Wake and S. Yamamoto (1984). "Pit cell-hepatocyte contact in autoimmune hepatitis." Hepatology **4**(5): 955-958.

Karwinski, W., A. M. Husoy, M. Farstad and O. Soreide (1989). "Sixty minutes of normothermic ischemia in the rat liver: correlation between adenine nucleotides and bile excretion." J Surg Res **46**(2): 99-103.

Kataoka, M., H. Shimizu, N. Mitsuhashi, M. Ohtsuka, Y. Wakabayashi, H. Ito, F. Kimura, K. Nakagawa, H. Yoshidome, Y. Shimizu and M. Miyazaki (2002). "Effect of cold-ischemia time on C-X-C chemokine expression and neutrophil accumulation in

the graft liver after orthotopic liver transplantation in rats." Transplantation **73**(11): 1730-1735.

Keller, E. J., P. Y. Kwo and P. R. Helft (2014). "Ethical considerations surrounding survival benefit-based liver allocation." Liver Transpl **20**(2): 140-146.

Kern, H., C. Bald, T. Brill, F. Fend, C. H. von Weiher, M. Kriner, N. Huser, S. Thorban, M. Stangl and E. Matevossian (2008). "The influence of retrograde reperfusion on the ischaemia-/reperfusion injury after liver transplantation in the rat." Int J Exp Pathol **89**(6): 433-437.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Kirby, R. M., P. McMaster, D. Clements, S. G. Hubscher, L. Angrisani, M. Sealey, B. K. Gunson, P. J. Salt, J. A. Buckels, D. H. Adams and et al. (1987). "Orthotopic liver transplantation: postoperative complications and their management." Br J Surg **74**(1): 3-11.

Kissmeyer-Nielsen, F., S. Olsen, V. P. Petersen and O. Fjeldborg (1966). "Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells." Lancet **2**(7465): 662-665.

Klintmalm, G. B., J. R. Nery, B. S. Husberg, T. A. Gonwa and G. W. Tillery (1989). "Rejection in liver transplantation." Hepatology **10**(6): 978-985.

Knox, C. D., J. M. Pierce, I. B. Nicoud, A. E. Belous, C. M. Jones, C. D. Anderson and R. S. Chari (2006). "Inhibition of phospholipase C attenuates liver mitochondrial calcium overload following cold ischemia." Transplantation **81**(4): 567-572.

Koo, D. D. (2000). "Impact of Ischemia/Reperfusion Injury and Early Inflammatory Responses in Kidney Transplantation." Transplantation Reviews **14**(4(October)): 210-224.

Kotsch, K. (2008). Diagnostik und Therapie der Transplantatqualität
Habilitationsschrift, Charite-Berlin.

Kouwenhoven, E. A., R. W. de Bruin, I. M. Bajema, R. L. Marquet and I. J. JN (2001). "Prolonged ischemia enhances acute rejection in rat kidney grafts." Transplant Proc **33**(1-2): 361-362.

Kruisbeek, A. M. (1993). "Development of alpha beta T cells." Curr Opin Immunol **5**(2): 227-234.

Kurokawa, T., T. Nonami, A. Harada, A. Nakao and H. Takagi (1996). "Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury of the liver." Semin Surg Oncol **12**(3): 179-182.

Kuznetsov, A. V., S. Schneeberger, R. Seiler, G. Brandacher, W. Mark, W. Steurer, V. Saks, Y. Usson, R. Margreiter and E. Gnaiger (2004). "Mitochondrial defects and heterogeneous cytochrome c release after cardiac cold ischemia and reperfusion." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(5): H1633-1641.

- Lee S, C. A., Orloff MJ (1975). "Simplified Technique for orthotopic liver transplantation in the rat." Am J Surg **130**(1): 38-40.
- Lee, S., A. C. Charters, J. G. Chandler and M. J. Orloff (1973). "A technique for orthotopic liver transplantation in the rat." Transplantation **16**(6): 664-669.
- Leonard, W. J., E. W. Shores and P. E. Love (1995). "Role of the common cytokine receptor gamma chain in cytokine signaling and lymphoid development." Immunol Rev **148**: 97-114.
- Lie, T. S., F. Albrecht, S. Lee and M. J. Orloff (1974). "[Rat organ transplantation. Surgical technic]." Chirurg **45**(8): 365-370.
- Lindert, K. A., J. C. Caldwell-Kenkel, S. Nukina, J. J. Lemasters and R. G. Thurman (1992). "Activation of Kupffer cells on reperfusion following hypoxia: particle phagocytosis in a low-flow, reflow model." Am J Physiol **262**(2 Pt 1): G345-350.
- Ludwig, J., R. H. Wiesner, K. P. Batts, J. D. Perkins and R. A. Krom (1987). "The acute vanishing bile duct syndrome (acute irreversible rejection) after orthotopic liver transplantation." Hepatology **7**(3): 476-483.
- Lun, A., M. Y. Cho, C. Muller, G. Staffa, W. O. Bechstein, C. Radke, P. Neuhaus and H. Renz (2002). "Diagnostic value of peripheral blood T-cell activation and soluble IL-2 receptor for acute rejection in liver transplantation." Clin Chim Acta **320**(1-2): 69-78.
- Macatonia, S. E., P. M. Taylor, S. C. Knight and B. A. Askonas (1989). "Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro." J Exp Med **169**(4): 1255-1264.
- Martins, P. N. and P. Neuhaus (2007). "Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat." Liver Int **27**(3): 384-392.
- Matevossian, E. (2001). die Rolle des Stickoxids (NO) in der akuten Abstoßung nach orthotoper Lebertransplantation - eine experimentelle Studie im Rattenmodell, Technische Universität München.
- Matevossian, E., D. Doll, N. Huser, R. Brauer, I. Sinicina, J. Nahrig, H. Friess, M. Stangl and V. Assfalg (2009). "Liver transplantation in the rat: single-center experience with technique, long-term survival, and functional and histologic findings." Transplant Proc **41**(6): 2631-2636.
- Matevossian, E., N. Huser, H. Kern, V. Assfalg, A. Preissel, I. Sinicina, M. Stangl and S. Thorban (2008). "Nitric oxide inhibition and consecutive Aspisol application show a prolonged survival of orthotopic transplanted livers in a rat model." Transplant Proc **40**(4): 971-973.
- Matevossian, E., A. Novotny, C. Knebel, T. Brill, M. Werner, I. Sinicina, M. Kriner, M. Stangl, S. Thorban and N. Huser (2008). "The effect of selective inhibition of inducible nitric oxide synthase on cytochrome P450 after liver transplantation in a rat model." Transplant Proc **40**(4): 983-985.
- Mazzaferro, V., E. Regalia, R. Doci, S. Andreola, A. Pulvirenti, F. Bozzetti, F. Montalto, M. Ammatuna, A. Morabito and L. Gennari (1996). "Liver transplantation for

the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis." N Engl J Med **334**(11): 693-699.

McCord, J. M. (1985). "Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury." N Engl J Med **312**(3): 159-163.

Meuer, S. C., D. A. Cooper, J. C. Hodgdon, R. E. Hussey, K. A. Fitzgerald, S. F. Schlossman and E. L. Reinherz (1983). "Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes." Science **222**(4629): 1239-1242.

Minami, Y., T. Kono, T. Miyazaki and T. Taniguchi (1993). "The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes." Annu Rev Immunol **11**: 245-268.

Miyata, M., J. H. Fischer, M. Fuhs, W. Isselhard and Y. Kasai (1980). "A simple method for orthotopic liver transplantation in the rat. Cuff technique for three vascular anastomoses." Transplantation **30**(5): 335-338.

Mor, E., G. B. Klintmalm, T. A. Gonwa, H. Solomon, M. J. Holman, J. F. Gibbs, I. Watenberg, R. M. Goldstein and B. S. Husberg (1992). "The use of marginal donors for liver transplantation. A retrospective study of 365 liver donors." Transplantation **53**(2): 383-386.

Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells." Adv Immunol **46**: 111-147.

Mueller, A. R., K. P. Platz, M. Haak, H. Undi, C. Muller, E. Kottgen, H. Weidemann and P. Neuhaus (1996). "The release of cytokines, adhesion molecules, and extracellular matrix parameters during and after reperfusion in human liver transplantation." Transplantation **62**(8): 1118-1126.

Nadig, S. N., B. Periyasamy, S. F. Shafizadeh, C. Polito, R. N. Fiorini, D. Rodwell, Z. Evans, G. Cheng, D. Dunkelberger, M. Schmidt, S. E. Self and K. D. Chavin (2004). "Hepatocellular ultrastructure after ischemia/reperfusion injury in human orthotopic liver transplantation." J Gastrointest Surg **8**(6): 695-700.

Naito, M., G. Hasegawa, Y. Ebe and T. Yamamoto (2004). "Differentiation and function of Kupffer cells." Med Electron Microsc **37**(1): 16-28.

Nakatani, K., K. Kaneda, S. Seki and Y. Nakajima (2004). "Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function." Med Electron Microsc **37**(1): 29-36.

Neuberger, J. (1999). "Incidence, timing, and risk factors for acute and chronic rejection." Liver Transpl Surg **5**(4 Suppl 1): S30-36.

Neuberger, J. and D. H. Adams (1998). "What is the significance of acute liver allograft rejection?" J Hepatol **29**(1): 143-150.

Nevens, F. and W. Laleman (2012). "Artificial liver support devices as treatment option for liver failure." Best Pract Res Clin Gastroenterol **26**(1): 17-26.

Nickkholgh, A., J. Weitz, J. Encke, P. Sauer, A. Mehrabi, M. W. Buchler, J. Schmidt and P. Schemmer (2007). "Utilization of extended donor criteria in liver transplantation: a comprehensive review of the literature." Nephrol Dial Transplant **22 Suppl 8**: viii29-viii36.

Nicotera, P. and G. Melino (2004). "Regulation of the apoptosis-necrosis switch." Oncogene **23**(16): 2757-2765.

Nomenclature., W. A. o. V. A. I. C. o. V. A. (2005). Nomina anatomica veterinaria. Knoxville (USA).

Nose, Y. (1989). "Artificial liver for a bridge to liver transplantation." Artif Organs **13**(5): 415-416.

Pardini, R. S. (1995). "Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants." Arch Insect Biochem Physiol **29**(2): 101-118.

Perkins, J. D., D. L. Nelson, J. Rakela, P. M. Grambsch and R. A. Krom (1989). "Soluble interleukin-2 receptor level as an indicator of liver allograft rejection." Transplantation **47**(1): 77-81.

Pfitzmann, R., N. C. Nussler, M. Hippler-Benscheidt, R. Neuhaus and P. Neuhaus (2008). "Long-term results after liver transplantation." Transpl Int **21**(3): 234-246.

Pichler, W. J. (1997). "[Regulation of the immune response: the TH1/TH2 concept]." Schweiz Med Wochenschr **127**(9): 341-348.

Pichlmayr, R. and G. Gubernatis (1987). "Rejection of the liver and review of current immunosuppressive protocols." Transplant Proc **19**(5): 4367-4369.

Ploeg, R. J., A. M. D'Alessandro, S. J. Knechtle, M. D. Stegall, J. D. Pirsch, R. M. Hoffmann, T. Sasaki, H. W. Sollinger, F. O. Belzer and M. Kalayoglu (1993). "Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis." Transplantation **55**(4): 807-813.

Porte, R. J., R. J. Ploeg, B. Hansen, J. H. van Bockel, J. Thorogood, G. G. Persijn, J. Hermans and O. T. Terpstra (1998). "Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. European Multicentre Study Group." Transpl Int **11 Suppl 1**: S164-167.

Portmann, B., G. I. Slapak, E. Gane and R. Williams (1995). "Pathology and biopsy diagnosis of the transplanted liver." Verh Dtsch Ges Pathol **79**: 277-290.

Post, D. J., D. D. Douglas and D. C. Mulligan (2005). "Immunosuppression in liver transplantation." Liver Transpl **11**(11): 1307-1314.

Pratschke, S., F. Loehe, C. Graeb, K. W. Jauch and M. K. Angele (2009). "[Usage of marginal organs for liver transplantation: a way around the critical organ shortage?]." Zentralbl Chir **134**(2): 107-112.

Prof.Dr. Böker, W., Prof. Dr. Denk, H., Prof. Dr. Heitz, P. (2004). Pathologie, Urban & Fischer (München).

- Putz R., P. R. (2007). Sobotta - Anatomie des Menschen, Urban&Fischer.
- quartett, I. u. B. (2015). "CD 25 (Tü69) Interleukin-2 Receptor alpha Monoklonaler Antikörper / Monoclonal Antibody."
- R., E. (1985). Technique for orthotopic rat liver transplantation. Berlin, Springer Verlag.
- Raison, J. K. (1973). "The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems." J Bioenerg **4**(1): 285-309.
- Rang, H. P. (2008). Pharmacology. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Rappaport, A. M., Z. J. Borowy, W. M. Loughheed and W. N. Lotto (1954). "Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology." Anat Rec **119**(1): 11-33.
- Reinherz, E. L., S. Meuer, K. A. Fitzgerald, R. E. Hussey, H. Levine and S. F. Schlossman (1982). "Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex." Cell **30**(3): 735-743.
- S., R. (1958). Leber - und Gallenwege, Springer Verlag (Berlin).
- Saikumar, P., Z. Dong, J. M. Weinberg and M. A. Venkatachalam (1998). "Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury." Oncogene **17**(25): 3341-3349.
- Sanchez-Fueyo, A. (2013). "Tolerance profiles and immunosuppression." Liver Transpl **19 Suppl 2**: S44-48.
- Schemmer, P., A. Nickkholgh, U. Hinz, T. Gerling, A. Mehrabi, P. Sauer, J. Encke, H. Friess, J. Weitz, M. W. Buchler and J. Schmidt (2007). "Extended donor criteria have no negative impact on early outcome after liver transplantation: a single-center multivariate analysis." Transplant Proc **39**(2): 529-534.
- Schmidt, E. and F. W. Schmidt (1987). "[Functional morphology of the liver]." Z Gastroenterol Verh **22**: 16-38.
- Schmidt, R., A. Hoetzel, T. Baechle, T. Loop, M. Humar, M. Bauer, H. L. Pahl, K. K. Geiger and B. H. Pannen (2004). "Isoflurane pretreatment lowers portal venous resistance by increasing hepatic heme oxygenase activity in the rat liver in vivo." J Hepatol **41**(5): 706-713.
- Schon, M. R., C. J. Hunt, D. E. Pegg and D. G. Wight (1993). "The possibility of resuscitating livers after warm ischemic injury." Transplantation **56**(1): 24-31.
- Schrem, H., N. Till, T. Becker, H. Bektas, M. P. Manns, C. P. Strassburg and J. Klempnauer (2008). "[Long-term results after liver transplantation]." Chirurg **79**(2): 121-129.
- Senoo, H. (2004). "Structure and function of hepatic stellate cells." Med Electron Microsc **37**(1): 3-15.

Serrick, C., A. Giaid, A. Reis and H. Shennib (1997). "Prolonged ischemia is associated with more pronounced rejection in the lung allograft." Ann Thorac Surg **63**(1): 202-208.

Settaf, A., J. Gugenheim, D. Houssin and H. Bismuth (1986). "Cuff technique for orthotopic liver transplantation in the rat. A simplified method for the suprahepatic vena cava anastomosis." Transplantation **42**(3): 330-331.

Shibuya, H., N. Ohkohchi, K. Seya and S. Satomi (1997). "Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation." Hepatology **25**(2): 356-360.

Shibuya, H., N. Ohkohchi, S. Tsukamoto and S. Satomi (1997). "Tumor necrosis factor-induced, superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver." Hepatology **26**(1): 113-120.

Shuh, M., H. Bohorquez, G. E. Loss, Jr. and A. J. Cohen (2013). "Tumor Necrosis Factor-alpha: Life and Death of Hepatocytes During Liver Ischemia/Reperfusion Injury." Ochsner J **13**(1): 119-130.

Siegel, J. P., M. Sharon, P. L. Smith and W. J. Leonard (1987). "The IL-2 receptor beta chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities." Science **238**(4823): 75-78.

Siewert, R., Schumpelick, Ed. (2006). Praxis der Viszeralchirurgie.

Silberhumer, G. R., H. Pokorny, H. Hetz, H. Herkner, S. Rasoul-Rockenschaub, T. Soliman, T. Wekerle, G. A. Berlakovich, R. Steininger and F. Muehlbacher (2007). "Combination of extended donor criteria and changes in the Model for End-Stage Liver Disease score predict patient survival and primary dysfunction in liver transplantation: a retrospective analysis." Transplantation **83**(5): 588-592.

Snover, D. C., D. K. Freese, H. L. Sharp, J. R. Bloomer, J. S. Najarian and N. L. Ascher (1987). "Liver allograft rejection. An analysis of the use of biopsy in determining outcome of rejection." Am J Surg Pathol **11**(1): 1-10.

Snover, D. C., R. K. Sibley, D. K. Freese, H. L. Sharp, J. R. Bloomer, J. S. Najarian and N. L. Ascher (1984). "Orthotopic liver transplantation: a pathological study of 63 serial liver biopsies from 17 patients with special reference to the diagnostic features and natural history of rejection." Hepatology **4**(6): 1212-1222.

Solez, K., R. A. Axelsen, H. Benediktsson, J. F. Burdick, A. H. Cohen, R. B. Colvin, B. P. Croker, D. Droz, M. S. Dunnill, P. F. Halloran and et al. (1993). "International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology." Kidney Int **44**(2): 411-422.

Sorrentino, D., K. Van Ness, I. Ribeiro and C. M. Miller (1991). "Functional and morphological features of isolated hepatocytes preserved in University of Wisconsin solution." Hepatology **14**(2): 331-339.

Starzl T. E., D. A., van Thiel D. (1989). "Liver transplantation (First two parts)." N. Engl J. Med **321**: 1014 - 1022.

Starzl, T. E. and A. J. Demetris (1990). "Liver transplantation: a 31-year perspective. Part II." Curr Probl Surg **27**(3): 117-178.

Steffen, R., D. M. Ferguson and R. A. Krom (1989). "A new method for orthotopic rat liver transplantation with arterial cuff anastomosis to the recipient common hepatic artery." Transplantation **48**(1): 166-168.

Steinmetz, M., A. Winoto, K. Minard and L. Hood (1982). "Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens." Cell **28**(3): 489-498.

Steurer, W., P. W. Nickerson, A. W. Steele, J. Steiger, X. X. Zheng and T. B. Strom (1995). "Ex vivo coating of islet cell allografts with murine CTLA4/Fc promotes graft tolerance." J Immunol **155**(3): 1165-1174.

Storch V., W. U. (2002). Kükenthal - Zoologisches Praktikum, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin.

Tamaki, T., N. Kamada and D. E. Pegg (1986). "Hypothermic preservation of the rat liver assessed by orthotopic transplantation. A comparison of flush solutions." Transplantation **41**(3): 396-397.

Tamaki, T., N. Kamada, D. G. Wight and D. E. Pegg (1987). "Hypothermic preservation of the rat liver assessed by orthotopic transplantation. II. Evaluation of citrate solutions." Transplantation **43**(3): 357-361.

Tilney, N. L. and J. W. Kupiec-Weglinski (1991). "The biology of acute transplant rejection." Ann Surg **214**(2): 98-106.

Torres-Quevedo, R., A. Moya-Herraiz, F. San Juan, R. Lopez-Andujar, E. Montalva, E. Pareja, M. De Juan, J. J. Vila, V. Aguilera, R. Pina, M. Berenguer, M. Prieto and J. Mir (2009). "Indications for and results of liver retransplantation." Transplant Proc **41**(3): 1016-1017.

Trotter, J. F. (2013). "Is disease recurrence still relevant to graft survival?" Liver Transpl **19 Suppl 2**: S49-55.

Tsuchimoto, S., K. Kusumoto, Y. Nakajima, A. Kakita, J. Uchino, T. Natori and M. Aizawa (1988). "Orthotopic liver transplantation in the rat. A simplified technique using the cuff method for suprahepatic vena cava anastomosis." Transplantation **45**(6): 1153-1155.

Vaid, A., H. Chweich, E. M. Balk and B. L. Jaber (2012). "Molecular adsorbent recirculating system as artificial support therapy for liver failure: a meta-analysis." ASAIO J **58**(1): 51-59.

van Ewijk, W. (1991). "T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments." Annu Rev Immunol **9**: 591-615.

Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe and G. Kroemer (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(10): 700-714.

Viebahn, R., H. de Groot, W. Lauchart and H. D. Becker (1991). "[Primary hepatocyte cultures as a model of experimental study of liver preservation]." Langenbecks Arch Chir **376**(5): 268-272.

Wang, Y., J. Wu, B. Jiang, J. Wang, C. Liu, C. Peng and B. Tian (2014). "Relationship between ischemia/reperfusion injury and acute rejection of allogeneic liver transplant in rats." Transplant Proc **46**(1): 50-55.

Weismuller, T. J., P. Fikatas, J. Schmidt, A. P. Barreiros, G. Otto, S. Beckebaum, A. Paul, M. N. Scherer, H. H. Schmidt, H. J. Schlitt, P. Neuhaus, J. Klempnauer, J. Pratschke, M. P. Manns and C. P. Strassburg (2011). "Multicentric evaluation of model for end-stage liver disease-based allocation and survival after liver transplantation in Germany--limitations of the 'sickest first'-concept." Transpl Int **24**(1): 91-99.

Weng, M. Z., Y. G. Xu, Y. Zhang, J. Y. Zhang, Z. W. Quan, J. M. Xu and Z. H. Peng (2011). "Indoleamine 2,3-dioxygenase as a predictor of acute rejection after orthotopic liver transplantation in rat model." Transplant Proc **43**(10): 3969-3972.

Wiesner, R. H., K. P. Batts and R. A. Krom (1999). "Evolving concepts in the diagnosis, pathogenesis, and treatment of chronic hepatic allograft rejection." Liver Transpl Surg **5**(5): 388-400.

Wiesner, R. H., A. J. Demetris, S. H. Belle, E. C. Seaberg, J. R. Lake, R. K. Zetterman, J. Everhart and K. M. Detre (1998). "Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome." Hepatology **28**(3): 638-645.

Wiesner, R. H., S. V. McDiarmid, P. S. Kamath, E. B. Edwards, M. Malinchoc, W. K. Kremers, R. A. Krom and W. R. Kim (2001). "MELD and PELD: application of survival models to liver allocation." Liver Transpl **7**(7): 567-580.

Williams, K. A., M. A. Thiel and H. Zola (1999). "The new-generation therapeutic anti-CD25 monoclonal antibodies." Transplantation **68**(9): 1228-1229.

Wolff, H. and G. Otto (1978). "[Liver transplantation in animal experiments]." Z Exp Chir **11**(3): 157-176.

Wu, S. H., Y. X. Xu, T. Yin, X. H. Song, J. J. Wang and R. Li (2005). "Fabrication and data harvesting of casting sample of rat liver blood vessels." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **4**(4): 582-584.

www.onkochirurgie.de. (2015). "Anatomie der Leber."

Yokoyama, Y., J. S. Beckman, T. K. Beckman, J. K. Wheat, T. G. Cash, B. A. Freeman and D. A. Parks (1990). "Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury." Am J Physiol **258**(4 Pt 1): G564-570.

Zhong, G., C. Reis e Sousa and R. N. Germain (1997). "Production, specificity, and functionality of monoclonal antibodies to specific peptide-major histocompatibility complex class II complexes formed by processing of exogenous protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13856-13861.

Zimmermann, F. A., G. W. Butcher, H. S. Davies, G. Brons, N. Kamada and O. Turel (1979). "Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of the immunologic responses to fully allogeneic liver grafts." Transplant Proc **11**(1): 571-577.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Indikationen für eine Lebertransplantation. Quelle:DSO / Eurotransplant.....	8
Abb 2: Vorgänge bei Ischämie und Reperfusion. Quelle: (Kotsch 2008)	17
Abb. 3: Übersichtsschema zur Lymphozytenaktivierung Rang, H.P.; Pharmakology; Page 223 (2008).(Rang 2008)	26
Abb. 4: Immunologische Mechanismen der chronischen Transplantatabstoßung. Quelle: (Matevossian 2001)	28
Abb. 5: Immunsuppression Triple Therapie, Quelle: (Matevossian 2001)	30
Abb 6: Situs Ratte Männlich; Quelle: Kükenthal (2002) (Storch V. 2002).....	31
Abb. 7: Situs Ratte Weiblich; Quelle: Kükenthal (2002) (Storch V. 2002).....	32
Abb. 8: Leberlappen; FÖDRA (1991)	33
Abb. 9: Lebersegmente; Quelle: (www.onkochirurgie.de 2015).....	34
Abb. 10: Lebervenen. Quelle:(Putz R. 2007).....	36
Abb. 11: Gliederung der Leber; LIEBICH (1999).....	38
Abb. 12: klassisches Leberläppchen; KRSTIC 1991	40
Abb. 13: Lagerung der Ratte auf dem OP-Tisch	51
Abb. 14: OP-Situs.....	52
Abb. 15: Lig. hepatoduodenale und Leberhilus	53
Abb. 16: frei präparierte Aorta abdominalis	54
Abb. 17: Perfusion	55
Abb. 18: Vorbereitung zur fortlaufenden Naht.....	57
Abb. 19: vollständige Anastomose.....	58
Abb. 20: Pfortaderanastomose	59
Abb. 21: Punktdiagramm ALT(U/L) je Ischämiezeitpunkt	63
Abb. 22: Punktdiagramm AST(U/L) je Ischämiezeitpunkt.....	63
Abb 23: Serumkonzentration GGT je Ischämiezeitpunkt	64
Abb. 24: Nekrosegrade in Abhängigkeit von der Ischämiedauer.....	66
Abb. 25: Immunhistochemische Färbung ED2-AK (Makrophagen).....	67
Abb. 26: Immunhistochemische Färbungen, CD8-T-Zellen (a) und CD25-aktivierte T- Zellen (b).....	68
Abb. 27: Zellzahlen der drei Zellreihen nach 2h Ischämie und nach 8h Ischämie.....	69
Abb. 28: Die einzelnen Immunzellreihen nach 2h Ischämie und nach 8h Ischämie...	70
Abb 29: Ischämie-/Reperfusionsschaden und Auswirkungen, Quelle:(Koo 2000).....	78

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Indikationen zur Lebertransplantation.....	6
Tabelle 2: Lebertransplantationen je Grunderkrankung. Quelle: Eurotransplant.....	9
Tabelle 3: Übersicht Nekrosegrade je Ischämiedauer	66

9 Abkürzungen

A	Arterie
Aa	Arterien
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen Präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
DSO	Deutsche Stiftung Organstrasplantation
EAD	early allograft dysfunction
ET	Eurotransplant
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GOT	Glutamat-Oxal-Acetat-Dehydrogenase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Dehydrogenase
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HELLP	Haemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelets
HLA	human leucocyte antigen
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
I/R	Ischämie-/Reperfusionsschaden
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
INF	Initial non function
IPF	Initial poor function
LDH	Lactatdehydrogenase
LTx	Lebertransplantation
MELD	Model for endstage liver disease
MHC	major histocompatibility complex
MMF	Mycophenolat Mofetil
NK-Zellen	natürliche Killerzellen

oRLTx	orthotope Rattenlebertransplantation
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBC	primär biliäre Zirrhose
PDF	primary dysfunction
PMNL	polymorph nukleäre Leukozyten
PNF	primary non function
PSC	primär sklerosierende Cholangitis
SSC	sekundär sklerosierende Cholangitis
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transforming growth factor beta
TLR	toll like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
V.	Vene
VP	Vena Portae
Vv.	Venen
γ -GT	Gamma-Glutamyltranspeptidase

10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich vor allem bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. E. Matevossian für die Ermöglichung dieser Arbeit an diesem interessanten Thema bedanken. Ich bin sehr dankbar für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die unermüdliche Unterstützung, sowie die Weitergabe seines Wissens und der chirurgischen Fertigkeiten.

Auch möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. med. G. Babaryka vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München für die Unterstützung bei der Bearbeitung und Auswertung der histologischen Gewebeproben sehr herzlich danken. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. T. Schuster für die statistische Auswertung bedanken.

Herrn Dr. med. C. Bald sei ganz herzlich für die professionellen intraoperativen Fotografien sowie die zahlreichen wertvollen Ratschläge und die Unterstützung während dieser Arbeit gedankt.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Zentrums für Präklinische Forschung der TU München, besonders Frau Härtel und Frau Pohlheimer, möchte ich an dieser Stelle für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche Unterstützung danken.

Einen weiteren besonderen Dank möchte ich Frau Dr. med. D. Haiges für ihre Hilfe und Zusammenarbeit während der experimentellen Phase der Arbeit aussprechen. Vielen Dank für die gemeinsame Zeit im OP!

Ein besonderer Dank richtet sich an Frau Dr. med. vet. Julia Storch für die stilistische Korrektur meiner Arbeit.

In tiefer Dankbarkeit wende ich mich an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin und die Durchführung dieser Promotion ermöglichten. Ebenso herzlich möchte ich meinem Ehemann für seine Geduld und unermüdliche Unterstützung danken.