

Die Rolle des Stickoxids (NO) in der akuten Abstoßung nach orthotoper Lebertransplantation

Eine experimentelle Studie im Rattenmodell

Eduard Matevosjan

Chirurgische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert)

Die Rolle des Stickoxids (NO) in der akuten Abstoßung nach orthotoper Lebertransplantation

Eine experimentelle Studie im Rattenmodell

Eduard Matevosjan

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. C.-D. Heidecke,
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald (schriftliche Beurteilung)
1. Privatdozent Dr. R. B. Brauer (mündliche Prüfung)
2. Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert

Die Dissertation wurde am 25.04. 2001 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 14. 11. 2001
angenommen.

Meinen Eltern

Sofia und Alexander Matevosjan

in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einführung	1
1.2 Immunologie der Abstoßungsreaktionen	4
1.2.1 Antigenpräsentation.....	4
1.2.2 T-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptor (TCR).....	5
1.2.3 Mechanismen der zellulären und humoralen Abstoßung <i>in vivo</i>	6
1.2.4 Klassifikation der Abstoßungsreaktionen.....	6
1.2.4.1 <i>Hyperakute Abstoßung</i>	7
1.2.4.2 <i>Akute Abstoßung</i>	8
1.2.4.3 <i>Chronische Abstoßung</i>	10
1.2.5 Wirkung immunsuppressiver Substanzen bei der akuten Abstoßung.....	12
1.2.6 Der immunsuppressive Wirkungsmechanismus von Cyclosporin A and FK 506.....	13
1.3 Stickoxid (NO)	16
1.3.1 Historischer Rückblick.....	16
1.3.2 Chemie und Biochemie des Stickoxids.....	17
1.3.3 Synthese und Wirkung von NO im Blutgefäßsystem.....	18
1.3.4 Nomenklatur der NOS-Formen.....	19
1.3.5 Hämostasiologische Funktionen.....	21
1.3.6 Rolle bei immunologischen Reaktionen.....	22
1.3.7 Stimulation und Inhibierung der NO-Synthasen.....	24
1.3.8 Einfluß der NO-Biosynthese auf die Biologie und Pathologie der Leber.....	26
1.4 Cytochrome P450 (CYP) und Isoenzyme	26
1.4.1 Die Cytochrom-P450-Superfamilie.....	26
1.4.2 Biochemie der Cytochrome P450 (CYP).....	28

1.5 Technik der orthotopen Rattenlebertransplantation.....	28
1.6 Morphologie der Rattenleber.....	30
1.6.1 Makroskopische Anatomie.....	30
1.6.2 Mikroskopische Anatomie.....	33
<u>2. Material und Methode</u>	
2.1 Versuchstiere.....	37
2.2 Genehmigung der Tierversuche.....	37
2.3 Versuchsgruppen.....	37
2.4 Chirurgisches Vorgehen.....	39
2.4.1 Operationsvorbereitung und Anästhesie.....	39
2.4.2 Operationstechnik.....	40
2.4.2.1 Präparationsphase der Spenderoperation.....	41
2.4.2.2 Perfusionsphase und Organkonservierung.....	42
2.4.2.3 Präparationsphase ex situ.....	43
2.4.2.4 Präparationsphase der Empfängeroperation.....	45
2.4.2.5 Explantaion der Eigenleber.....	45
2.4.2.6 Anastomosierung der suprahepatischen V. cava.....	46
2.4.2.7 Anastomosierung der V. portae und der infrahepatischen V. cava.....	46
2.4.2.8 Arterialisierung der Leber.....	46
2.4.2.9 Rekonstruktion des Gallenganges.....	47
2.5 Postoperative Nachsorge.....	48
2.6 Sektion.....	48
2.7. Untersuchungsmethoden.....	48
2.7.1 Intraoperatives Monitoring.....	48

2.7.2 Lebergewicht.....	49
2.7.3 Leberfunktionsparameter.....	49
2.7.3.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Cytochrom P450-Isoenzyme.....	49
2.7.4 NO-Messung.....	50
2.7.4.1 Direkte Methoden (HPLC-Methode)	50
2.7.4.2 Indirekte Methoden.....	51
2.7.5 Lichtmikroskopie.....	51
2.7.5.1 Der Gefrierschnitt.....	52
2.7.5.2 Der Paraffinschnitt.....	52
2.7.5.3 Konventionelle Histologie (HE-Färbung).....	52
2.7.5.4 Die immunhistochemische Färbung.....	53
2.7.6 Klassifikation der akuten Abstoßung nach Lebertransplantation.....	54
2.8 Statistische Auswertung.....	55
2.8.1 Deskriptive Statistik.....	55
2.8.2 Varianzanalyse.....	55

3. Ergebnisse

3.1 In vivo.....	56
3.1.1 Transplantatüberleben in den Kontrollgruppen (Gr. I und II).....	56
3.1.2 Transplantatüberleben unter Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).....	57
3.1.2.1 Effektivität der iNOS-Hemmung.....	57
3.1.2.2 Transplantatüberleben unter Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).....	58
3.1.3 Transplantatüberleben unter Immunsuppression mit FK506.....	59
3.1.4 Transplantatüberleben unter kombinierter Therapie.....	60
3.1.5 Zusammenfassung der <i>in vivo</i> Ergebnisse.....	61
3.1.6 Zusammenfassung der Transplantat-Überlebenskinetik.....	62
3.2 Enzymaktivität im Serum.....	63
3.3 NO²⁻/NO³⁻-Konzentrationen im Serum.....	67

3.4 Serumaktivität von CYP-Isoenzymen (1A1, 1A2, 2E1, 3A4).....	68
3.5. Histologie.....	71
<u>4. Diskussion.....</u>	73
<u>5. Zusammenfassung.....</u>	80
<u>7. Literaturverzeichnis.....</u>	82
<u>6. Danksagung.....</u>	99

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einführung

Seit der ersten Verpflanzung einer menschlichen Leber im Jahre 1963 hat sich die Lebertransplantation zu einem Standardverfahren entwickelt (183, 185). Die erste klinische Lebertransplantation wurde am 1. März 1963 in Denver von *Thomas E. Starzl* durchgeführt (184). Sowohl dieser wie zahlreiche weitere Versuche blieben zunächst erfolglos, bis *Starzl* 1967 die erste erfolgreiche Lebertransplantation vornahm. 1968 und 1969 berichteten *Sir Roy Calne* in Cambridge und *A. Gütgemann* in Bonn über gelungene Lebertransplantationen. Nach zunehmender Erfahrung in der klinischen Nierentransplantation und in der experimentellen Lebertransplantation nahm *R. Pichlmayr* 1972 die erste humane Lebertransplantation in Hannover vor (17, 18, 158, 167).

Für viele Lebererkrankungen im Endstadium stellt die Lebertransplantation heutzutage die Therapie der Wahl mit guten Erfolgsaussichten dar; Einjahresüberlebensraten von 80% bis 90% werden hierbei inzwischen erreicht und auch die Langzeitergebnisse haben sich deutlich verbessert (17, 46, 62, 143-145, 173). Diese rasante Aufwärtsentwicklung ist durch viele Faktoren ermöglicht worden:

- Die Etablierung einer sicheren Operationstechnik durch Verwendung eines extrakorporalen Bypass-Systems in Form einer Biopumpe in der anhepatischen Phase sowie die Verbesserung der Gefäß und Gallenganganastomosierung senkten das operative Risiko
- Die Einführung von Cyclosporin A (CsA) im Jahre 1978 durch *Calne* war ein bedeutungsvoller Meilenstein. Monoklonale Antikörper gegen Antigene der humanen T-Lymphozyten (ATG, OKT3) und FK506 (Tacrolimus, Prograf[®]) erwiesen sich ebenfalls als hochwirksame Immunsuppressiva (37, 48, 132)
- Die Fortschritte der Intensivmedizin bei der Volumensubstitution, Beatmung und Infektionsprophylaxe haben dazu beigetragen, die nicht immer abzuwendenden Komplikationen zu beherrschen (143-145)
- Die Möglichkeit zur simultanen Mehrorganentnahme vergrößerte die Anzahl transplantierbarer Organe
- Die Erweiterung von Operationsindikationen und Vorverlegung des Operationszeitpunktes verbesserten weitgehend die postoperative Prognose.

Der Eingriff kann jedoch nach wie vor zu einer Reihe von Problemen führen. Je nach transplantiertem Organ machen 30-70% der Patienten postoperativ eine oder mehrere Abstoßungsreaktionen durch, die mit entsprechend hoher Dosierung von immunsuppressiv wirksamen Medikamenten bekämpft werden müssen.

Abgesehen von Komplikationen im frühen postoperativen Verlauf wie primäre Nichtfunktion (PNF) gibt es auch langfristige Probleme wie Rezidiv der Grunderkrankung sowie Nebenwirkungen der Immunsuppression (13, 27, 102, 126, 127, 150, 156, 173). *Howard* beschrieb zuerst, daß auch schwere Konservierungsschäden mit Abstoßungsreaktionen assoziiert sind (89).

Transplantatabstoßungsreaktionen können aber meist durch Kortisonstöße oder OKT3-Antikörper (monoklonale Antikörper gegen T-Lymphozyten) erfolgreich behandelt werden (37). Es gibt perakute Reaktionen, die durch präformierte zytotoxische Antikörper herfergerufen werden, akute (innerhalb von 8 Wochen) und chronische (nach 8 Wochen) Reaktionen, die T-Zell-vermittelt auftreten (78, 105, 155, 174, 177).

Auch die Nebenwirkungen der Immunsuppressiva, deren therapeutische Breite gering ist, führen häufig zu Komplikationen. Cyclosporin A wirkt nephro,- neuro,- und hepatotoxisch. Der Cyclosporin-Spiegel im Serum muß deshalb engmaschig kontrolliert werden. Azathioprin zeichnet sich durch Hepatotoxizität und Knochenmarksdepression aus, weshalb es bei niedrigen Thrombozyten- und/oder Leukozytenzahlen nicht eingesetzt werden kann (13). Desweiteren konnte in den tierexperimentellen Studien gezeigt werden, daß unter einer chronischen Anwendung von FK506 (Tacrolimus) Zeichen einer dosisabhängigen nephrotoxischen Nebenwirkung infolge der Reduktion der glomerulären Filtrationsrate sowie die Entwicklung einer metabolischen Azidose beobachtet werden (150).

Die akute Abstoßung nach der Lebertransplantation stellt mit Inzidenz von 30-70% trotz der adäquaten Immunsuppression immer noch ein ernsthaftes klinisches Problem dar (142). Bei weniger stark ausgeprägten Fällen könnte der temporäre Organersatz Bedeutung erlangen, um diese Phase der eingeschränkten Funktion zu überbrücken. Für die Leber steht zur Zeit jedoch kein Verfahren mit entsprechender klinischer Erfolgsaussicht zur Verfügung (4, 38, 61, 88, 127, 146, 149, 173). Der Einsatz von extrakorporalen Hepatozytensystemen in Form neuerer „Bio-Reaktoren“ erscheint zwar vielversprechend, ob damit in Zukunft ein „bridging,“ wie z.B. beim Kunstherz, realisiert werden kann, muß jedoch in weiteren Untersuchungen geprüft

werden (61, 146). Daher ist das Vermeiden der akuten Abstoßungsreaktion nach Lebertransplantation von großer klinischer Bedeutung.

In den letzten Jahren wurde die Rolle des Stickoxids (NO) während der akuten Abstoßung von alloantigenen Geweben kontrovers diskutiert (205-207). In zahlreichen experimentellen und klinischen Studien konnten bei der Abstoßung von Lebertransplantaten erhöhte Mengen von stabilen Endprodukten des Stickoxid-Metabolismus ($\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$) im Plasma sowie in der Leber gebundenes NO nachgewiesen werden (49). Es ist allerdings noch nicht geklärt, welche Funktion dem NO während der akuten Abstoßung letztlich zukommt.

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde die Rolle von Stickoxid (NO) nach orthotoper Lebertransplantation im Rattenmodell (oRLTx) untersucht.

Neben der Rolle als endothelabhängiger Vasodilatator und inhibierender Neurotransmitter nimmt NO eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Steuerung der Entzündungsreaktion und Immunantwort ein (23). Die bis jetzt durchgeführten experimentellen Arbeiten haben unter anderem gezeigt, daß NO während der akuten Abstoßung von alloantigenen Geweben eine immunmodulatorische Rolle spielt (110, 205-207). Aminoguanidinhydrochlorid (AGH) ist als potenter Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) bekannt (28, 29, 71, 95, 113, 134, 151, 207). Die Rolle dieses selektiven iNOS-Inhibitors als immunsuppressives Agens wird derzeit kontrovers diskutiert (204).

Das Ziel dieser tierexperimentellen Studie war es daher, die Rolle von AGH und damit verbundene Hemmung der iNOS während der akuten Abstoßung nach orthotoper Lebertransplantation im Rattenmodell zu evaluieren.

1.2 Immunologie der Abstoßungsreaktionen

1.2.1 Antigenpräsentation

Der Hauptangriffspunkt beim immunologischen Transplantatverlust ist der „*major histocompatibility complex*“ (MHC), der durch Transplantatantigene gebildet wird und aus einer Vielzahl von Genen besteht (36, 85, 86, 187). Der MHC nimmt eine Schlüsselfunktion für fast alle Aspekte einer Immunantwort ein, inklusive und insbesondere für die Transplantatabstoßung. Beim Menschen wird der MHC-Komplex als HLA (*human leukocyte antigen*) bezeichnet (34). HLA-Antigene werden in 2 Gruppen aufgeteilt, nämlich Klasse I (HLA-A, -B, -C) und Klasse II (HLA-D/DR) (35, 85-87, 132, 187). HLA Klasse I Antigene werden auf fast allen kernhaltigen Zellen und Geweben im Körper als polymorphe Membranglykoproteine exprimiert (2). Klasse II Moleküle werden im Gegensatz hierzu nur auf einer kleinen Zahl von Zelltypen konstitutiv exprimiert, nämlich B-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen (2, 34, 35, 54, 75). Zusätzlich ist die Expression von Klasse I und Klasse II Moleküle einer starken Regulation von Zytokinen, wie z.B. IFN- γ unterworfen. Eine Hochregulierung kann zwar zu einer verstärkten Transplantatimmunogenität beitragen, gilt aber für sich noch nicht als klarer Hinweis auf Transplantatabstoßung, da eine solche gesteigerte Expression auch in toleranten Tieren zu beobachten ist (5, 6, 54, 133, 159).

HLA-Antigene der Klasse I sind der Angriffspunkt von Alloantikörpern und zytotoxischen T-Zellen (mit CD8⁺ Korezeptor) im Verlauf einer Abstoßungsreaktion. Sie präsentieren vor allem zytosolische Antigene wie virale oder allogene Peptide (2, 40).

HLA-Antigene der Klasse II sind dagegen der Angriffspunkt von T-Helferzellen (T_{hI} bzw. T_{hII} mit CD4⁺ Korezeptor) im Verlauf einer Abstoßungsreaktion. Sie präsentieren exogene Peptide, also solche, die zunächst von der Zelle phagozytiert werden und nach Prozession auf der Zelloberfläche gezeigt werden (209).

Sowohl HLA-Antigene der Klasse I, wie HLA der Klasse II besitzen, ähnlich wie Antikörper, konstante und polymorphe Regionen. Diese sind dreidimensional so angeordnet, daß die konstanten Regionen in der äußeren, extrazellulären Domäne eine Grube bilden, in deren Vertiefung die variablen Aminosäuresubstitutionen liegen. In dieser Grube werden Peptidfragmente gebunden, die von in der Zelle abgebauten Proteinen stammen. Diese Peptidfragmente, die bei Klasse I Molekülen zwischen 8 und 10 Aminosäuren, bei Klasse II

mindestens 13 Aminosäuren lang sind, werden, je nach Klasse (Klasse I: CD8+; Klasse II: CD4+), den entsprechenden Subpopulationen von T-Lymphozyten präsentiert (11, 12, 19, 94).

1.2.2 T-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptor (TCR)

T-Lymphozyten und B-Lymphozyten sind 2 separate, antigenspezifische Zelllinien, die beide für adaptive Immunreaktion von wesentlicher Bedeutung sind. Man spricht von der Dichotomie der Lymphozyten. In den 60-er Jahren wurde erstmals gezeigt, daß ohne intakten Thymus eine effektive zellvermittelte Immunantwort nicht möglich ist. T-Lymphozyten stammen ursprünglich von derselben pluripotenten Stammzelle ab wie alle anderen Blutzellen. Diese Stammzelle entwickelt sich im Knochenmark und kann sich dort in alle hämatopoetischen Linien differenzieren mit der Ausnahme von T-Lymphozyten. Für die T-Zell-Lymphopoese muß die Stammzelle/Lymphoprogenitorzelle das Knochenmark verlassen und auf dem Blutweg in den Thymus gelangen. Dies ist notwendig, da der heranwachsende T-Lymphozyt nur im Thymus die positive (Erziehung zur MHC-Restriktion) und die negative (Verhinderung der Autoreaktivität) Selektion erfährt. Nach Reifung verläßt der „erwachsene“ naive T-Lymphozyt den Thymus und zirkuliert solange durch Blut und Gewebe, bis er durch Präsentation seines spezifischen Antigens aktiviert wird (21, 40, 109, 200).

Es existieren 2 Phänotypen von reifen T-Lymphozyten: CD4+ T-Lymphozyten (früher als „Helferzellen“ bezeichnet), von deren Differenzierung wiederum abhängt, ob eine zellvermittelte (T_{H1}) oder humorale (T_{H2}) Immunreaktion ausgelöst wird, und CD8+ T-Lymphozyten (früher als „Killerzellen“ bezeichnet), die nach Aktivierung effektiv Zellen angreifen können, die das spezifische Antigen auf MHC I Komplexen präsentieren (125, 157).

Um aktiviert werden zu können, müssen T-Lymphozyten das (Allo) Antigen über den TCR/CD3-Komplex erkennen. Dieser spielt somit die zentrale Rolle in der Initiierung der Aktivierung. Bei dem TCR handelt es sich um ein Heterodimer, das aus einer α - und einer β -Kette besteht (132). Der TCR ist assoziiert an den CD3-Komplex, über den die Signaltransduktion in die Zelle abläuft (33, 164). Die Interaktion von Antigen (plus MHC) mit den variablen Regionen des TCR wird verstärkt durch zusätzliche Paare von akzessorischen Molekülen. Diese antigenunabhängigen Rezeptor/Liganden-Paare sind in verschiedener Weise involviert in die Zelladhäsion, Aktivierung (inkl. Signaltransduktion)

und spezifischen Effektorfunktionen. Zu diesen Strukturen gehören CD4+ und CD8+, die MHC Klasse II (CD4+), bzw. Klasse I (CD8+) der antigenpräsentierenden Zellen binden, hierüber die Bindung des Peptid/MHC-Komplexes mit dem T-Zell-Rezeptor-Komplex erhöhen und zudem an der Signaltransduktion beteiligt sind (157, 159).

1.2.3 Mechanismen der zellulären und humoralen Transplantatabstoßung *in vivo*

Als Mediatoren der Transplantatabstoßung *in vivo* kommen prinzipiell zelluläre und humorale Immunmechanismen in Frage:

- zellvermittelte Immunreaktion durch T-Zell-vermittelte Prozesse mit einem hohen Grad an Spezifität, sowie weniger spezifische Antworten durch natürliche Killerzellen (NK), lymphokinaktivierte Killerzellen (LAK) und Makrophagen
- humoralvermittelte Immunreaktion durch weniger spezifische, natürliche Antikörper (meist vom IgM-Typ) oder hochspezifische Antikörper von verschiedenen Isotypen (meist IgG), die unterschiedliche Funktionen wie Opsonisierung, Komplementaktivierung sowie die Aktivierung von Granulozyten ausüben können.

All diese Mechanismen werden bislang als potentielle Effektoren der Transplantatabstoßung mit unterschiedlicher Bedeutung betrachtet (8, 198).

1.2.4 Klassifikation der Abstoßungsreaktionen

Es ist immer noch ungeklärt, warum manche Transplantate im Empfänger überleben und jahrzehntelang eine gute Organfunktion aufweisen, während andere durch akute oder chronische Abstoßung verloren gehen. Um akute und chronische Abstoßungen zu vermeiden und die Funktion der Transplantate möglichst lange aufrechtzuerhalten, ist es notwendig, mehr über die immunologischen Mechanismen beider Prozesse zu wissen. Dadurch sollten wir in der Lage sein, das Ergebnis einer Transplantation vorauszusagen und die Behandlung

entsprechend dem individuellen Verhältnis zwischen dem Transplantat und seinem Empfänger zu modifizieren.

Die traditionelle Klassifikation von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen blieb bis heute im wesentlichen unverändert (80, 161, 174, 177, 203). Sie basierte auf dem zeitlichen Verlauf ihres Auftretens und weniger auf immunologischen oder pathologischen Mechanismen. Nach dieser Klassifikation werden Abstoßungen vereinfacht als *hyperakut*, *akut* und *chronisch* eingeteilt. Diese Einteilung ist immer noch klinisch hilfreich, obwohl präzisere Definitionen, die bestimmte morphologische Facetten und angenommene immunologische Veränderungen in Betracht ziehen, einen größeren Wert hinsichtlich ihrer diagnostischen und prognostischen Aussage hätten.

Ein besonders hohes Risiko für Abstoßungsreaktionen besteht in der frühen postoperativen Phase. Durch die frühestmögliche Diagnose und die wirksame Behandlung von Abstoßungsereignissen lassen sich die Morbidität und Mortalität transplantierten Patienten deutlich senken. Dies ist nicht nur zum Vorteil des betroffenen Patienten selbst, sondern senkt zudem auch den Bedarf an knappen Spenderorganen und entlastet die Einrichtungen zur intensiven Behandlung der Patienten. Sowohl Häufigkeit als auch Schwere akuter Abstoßungsreaktionen haben einen deutlichen Einfluß auf die Regeneration der Patienten während der Rekonvaleszenzzeit und stellen einen möglichen Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Abstoßungsreaktion dar (78).

1.2.4.1 Hyperakute Abstoßung

Bei dieser Form der Abstoßung handelt es sich um eine gegen das Gefäßsystem des Transplantats gerichtete humorale Reaktion. Dabei führt die initiale Antikörperbildung am Gefäßendothel zu einer Aktivierung der Komplement- und Gerinnungskaskade. In der Folge kommt es zu einem Influx von Granulozyten und zu einer intravasalen Gerinnung, welche wiederum Stauung, Ödem und interstitielle Blutung nach sich ziehen. Letztendlich enden diese Prozesse im Zelltod und Transplantatverlust schon nach Minuten bis Stunden (73).

Die hyperakute Abstoßung ist für die Nieren-, Herz- und Lebertransplantate gut dokumentiert. Sie kann jedoch durch Blutgruppen-matching und adäquate Durchführung von Kreuzproben zwischen Spenderlymphozyten und Empfängerserum fast immer vermieden werden (105, 156). Für Lebertransplantate galt die hyperakute Abstoßung lange Zeit als nicht existent. Sie konnte jedoch erstmals tierexperimentell in bestimmten Stammkombinationen in der Ratte

induziert werden und wird heute, wenn auch sehr selten, bei frühen Transplantatverlusten nach initialer Funktionsaufnahme als Ursache angesehen (203).

1.2.4.2 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung stellt in der Klinik die Hauptursache des frühen Transplantatverlustes dar (142). Sie tritt ab dem dritten Tag, in der Regel aber eine Woche nach der Transplantation auf und ist histologisch und immunologisch sehr heterogen. In dieser Phase laufen verschiedene immunologische Reaktionen ab, nämlich spezifische zelluläre und humorale Antworten sowie unspezifische Entzündungsreaktionen. Immunsuppressive Substanzen greifen an verschiedenen Stellen in diesen gesamten Prozeß ein.

Das Transplantat besteht aus Parenchym, das *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I-Antigene exprimiert, und Blutgefäßen, die MHC Klasse I und II-Antigene sowie Adhäsionsmoleküle exprimieren (85-87, 187). Zusätzlich wandern in das Gewebe aus dem Knochenmark stammende Antigen-präsentierende Zellen (APC) ein. Diese Leukozyten haben einen sehr starken Einfluß bei der Aktivierung der Immunantwort (Abb. 1).

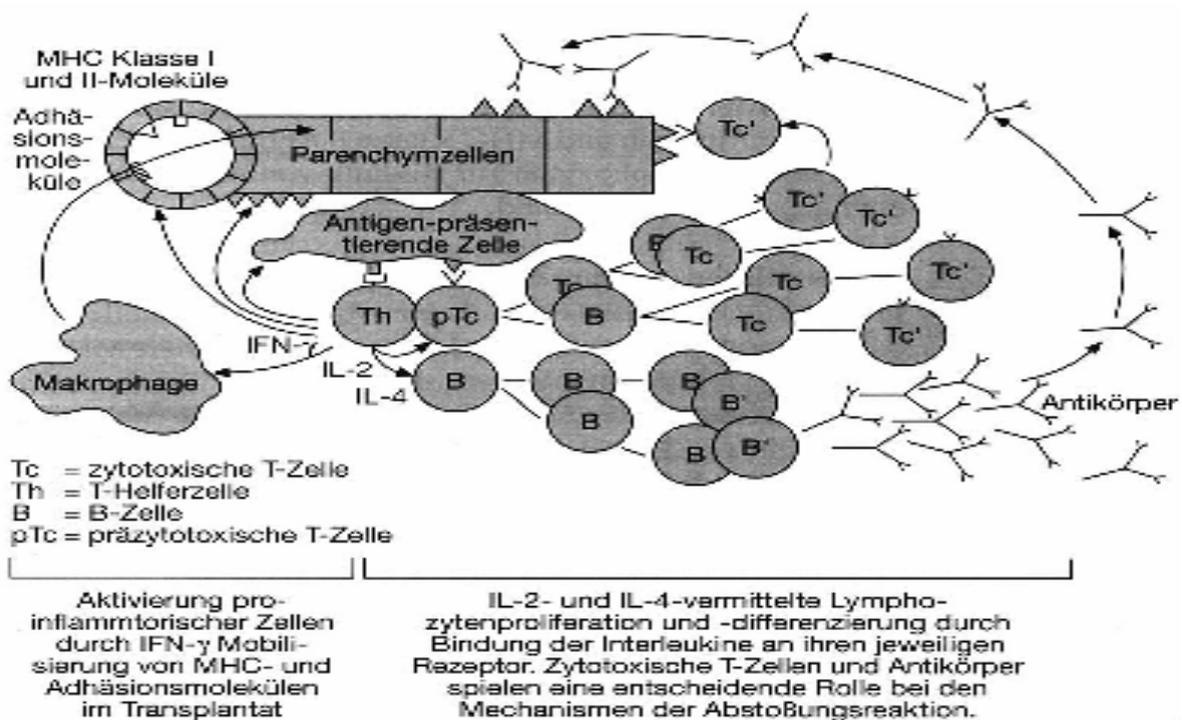


Abb. 1. Die Abstoßungsreaktion.

Die Zellen des Empfängers, die für die gegen das Transplantat gerichtete Immunantwort verantwortlich sind, sind CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen, ebenso wie B-Lymphozyten und inflammatorische Zellen einschließlich Makrophagen. Wenn das Spendergewebe und das Immunsystem des Empfängers zusammentreffen, kommt es zu einer explosionsartigen Zellaktivierung und Proliferation. Die T-Helferzellen erkennen fremde MHC Klasse II-Antigene des Spenders und bilden Zytokine, wie Interferon-gamma (IFN- γ), das an den inflammatorischen Prozessen beteiligt ist, sowie die Interleukine (IL) IL-2 und IL-4, die wiederum die Aktivierung spezifischer T- und B-Zell-Antworten vermitteln. Daher sind sowohl die spezifischen als auch die unspezifischen Aspekte des Abstoßungsprozesses zu berücksichtigen (198, 203).

Spezifische immunologische Reaktionen werden durch IL-2, IL-4 und andere, von T-Helferzellen gebildete Zytokine vermittelt. IL-2 ist notwendig für die Teilung und Differenzierung der zytotoxischen T-Zellen, die nach ihrer Aktivierung das Transplantat infiltrieren und MHC Klasse I-Antigene erkennen. IL-4 vermittelt die Aktivierung von B-Lymphozyten zur Bildung von Anti-Spender-Antikörpern, die am Abstoßungsprozess beteiligt sind.

Unspezifische inflammatorische Reaktionen verursachen ebenfalls Schädigungen am Transplantat. IFN- γ spielt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von unspezifischen Entzündungsreaktionen: IFN- γ aktiviert Makrophagen sowie reguliert am Endothel die Expression von Adhäsionsmolekülen und ermöglicht damit die zelluläre Infiltration des Transplantats. An den Parenchymzellen stimuliert IFN- γ die Expression von Spender-MHC-Antigenen. Bei Antigen-präsentierenden Zellen steigert das Zytokin die Effektivität der Antigen-Präsentation.

Für die Niere wird die akute Abstoßung heute nach dem Ort ihres Auftretens (vaskulär und/oder interstitiell), der Art der entzündlichen Infiltrate (akut oder chronisch) und der postulierten Immunreaktion (humoral und/oder zellulär) gegliedert (78, 168, 177, 196, 203). Die klassische chronisch-interstitielle (zelluläre) Abstoßung ist heute in der Regel gut mit hochdosiertem Cortison therapierbar. Histologisch findet sich während der akuten Abstoßung nach der Lebertransplantation ein interstitielles Ödem, die periportale Infiltration von Lymphozyten, Lymphoblasten und Monozyten/Makrophagen sowie eine Endothelialitis mit Destruktion von Gallengängen (128, 168, 174, 175).

1.2.4.3 Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung unterscheidet sich von der akuten durch die zugrundeliegenden Mechanismen (1, 78). Das die Blutgefäße auskleidende Endothel, aber auch Epithel an anderen Stellen, kann durch eine Reihe von Stimuli aktiviert werden. Diese können immunologisch (durch Antikörper oder eine zelluläre Antwort, die die Freisetzung von Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α in den Geweben auslöst), viral (CMV-Infektion) oder physikalisch (Hypertension) sein (Abb. 2).

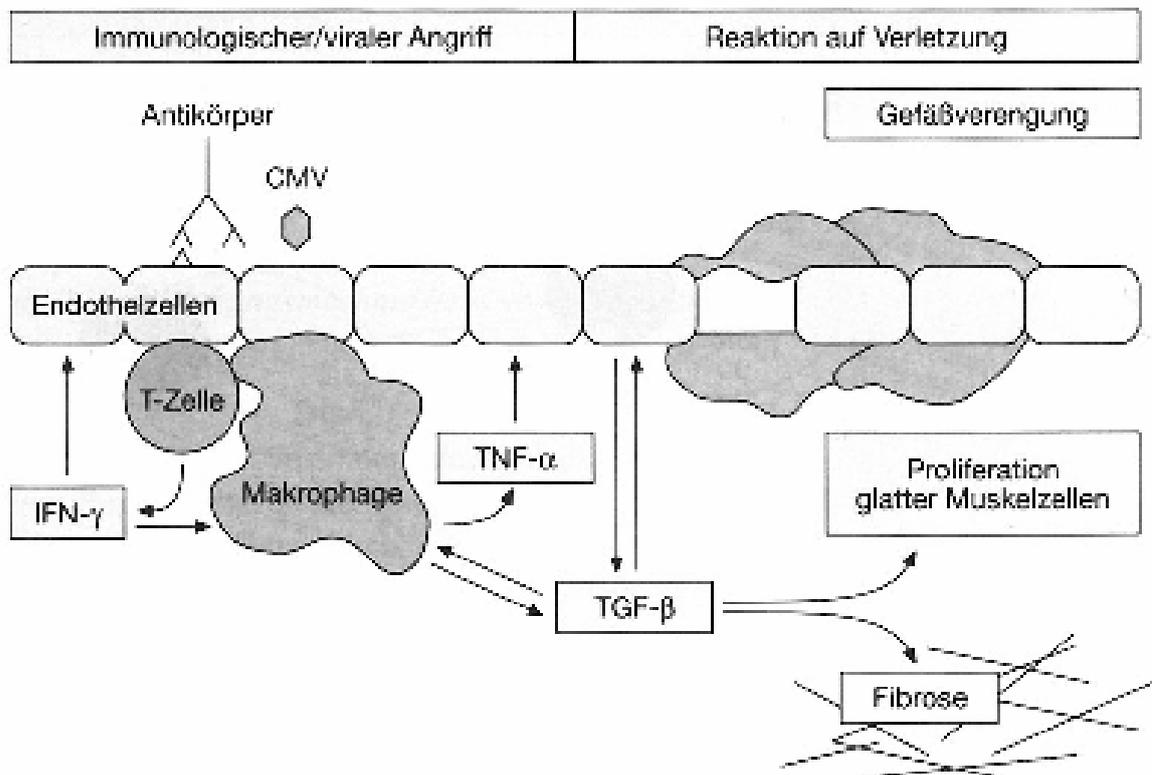


Abb. 2. Immunologische Mechanismen der chronischen Transplantatabstoßung.

Die chronische Abstoßung ist klinisch definiert als progressive Transplantatdysfunktion in Abwesenheit anderer Erkrankungen. Sie ist multifaktoriellen Ursprungs, wobei die einzelnen auslösenden Faktoren noch nicht genau bekannt sind. Die chronische Abstoßung tritt frühestens nach etwa 6-12 Wochen auf und zeigt sich bei der Lebertransplantierten zunächst in einem Anstieg des Serumbilirubins. Bei der Entstehung scheint die frühe Transplantatschädigung einerseits durch immunologische Reaktionen (akute Abstoßung) und andererseits durch antigenabhängige Faktoren (Ischämie, Reperfusion, Hirntod) eine wichtige Rolle zu spielen (1, 39, 120, 174, 196, 203).

Histopathologisch kommt es infolge chronisch-entzündlicher Reaktion an den Gefäßen zu deutlicher myointimaler Proliferation der Arterien und Arteriolen mit zunehmender, konzentrischer Lumeneinengung und im Interstitium zur Fibrose. Bei Lebertransplantierten manifestiert sich die chronische Abstoßung häufig als sogenanntes „*vanishing bile duct*“-Syndrom mit charakteristischen Veränderungen wie sie auch bei primär biliärer Zirrhose gesehen werden und zusätzlichen arteriosklerotischen Veränderungen (39, 123, 160, 176). Während sie früher als irreversibel galt, konnte im eigenen Patientenkollektiv mit histologisch gesicherter chronischer Abstoßung durch den Wechsel von Cyclosporin A (CsA) auf FK506 (Tacrolimus, Prograf[®]) deutliche Erfolge erzielt werden.

1.2.5 Die Wirkung immunsuppressiver Substanzen bei der akuten Abstoßung

Derzeit werden akute Abstoßungen durch den Einsatz immunsuppressiver Substanzen beherrscht. Dazu zählen Steroide, Cyclosporin A oder Tacrolimus sowie antiproliferative Wirkstoffe wie Azathioprin oder - in jungster Zeit – Mycophenolat Mofetil (MMF) (Abb. 3). Die antiproliferativen Substanzen hemmen lediglich die massive Zunahme der aktivierten spezifischen Lymphozyten. MMF hemmt die Teilung von B-Zellen und die Antikörperproduktion. Steroide andererseits unterdrücken die entzündliche Reaktion, indem sie im wesentlichen den Vorgängen entgegenwirken, die durch IFN- γ vermittelt werden. Desweiteren unterdrücken Steroide die Aktivierung inflammatorischer Zellen, hemmen die Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel und von MHC-Antigenen im Transplantat und reduzieren die Aktivität Antigen-präsentierender Zellen. In hohen Dosen bewirken Steroide auch Apoptose (programmierter Zelltod) von aktivierten Lymphozyten. Sowohl Cyclosporin A als auch Tacrolimus unterdrücken die Bildung der Zytokine, die bei der Aktivierung spezifischer und unspezifischer Mechanismen der Abstoßung eine zentrale Rolle spielen.

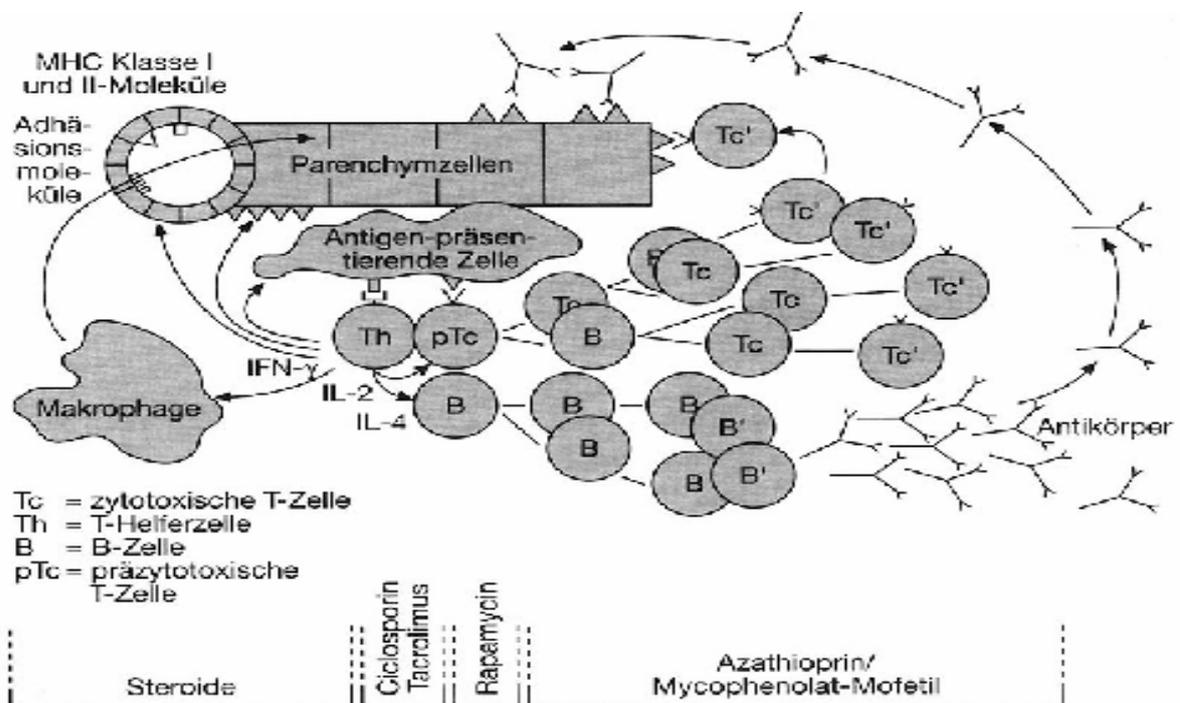


Abb. 3. Die Wirkung derzeit eingesetzter Immunsuppressiva.

Die schematische Darstellung in *Abb. 3* zeigt eine einfache rationale Erklärung für die Wirkung einer Triple-Therapie: Steroide, Azathioprin und die Makrolide unterdrücken jeweils unterschiedliche Vorgänge des gesamten Prozesses, und wirken daher synergistisch.

1.2.6 Der immunsuppressive Wirkungsmechanismus von Cyclosporin A (CsA) und FK506 (Tacrolimus)

Cyclosporin A und FK506 besitzen gemeinsame Wirkmechanismen, aber es gibt einige deutliche Unterschiede zwischen beiden Substanzen (*Abb. 4*).

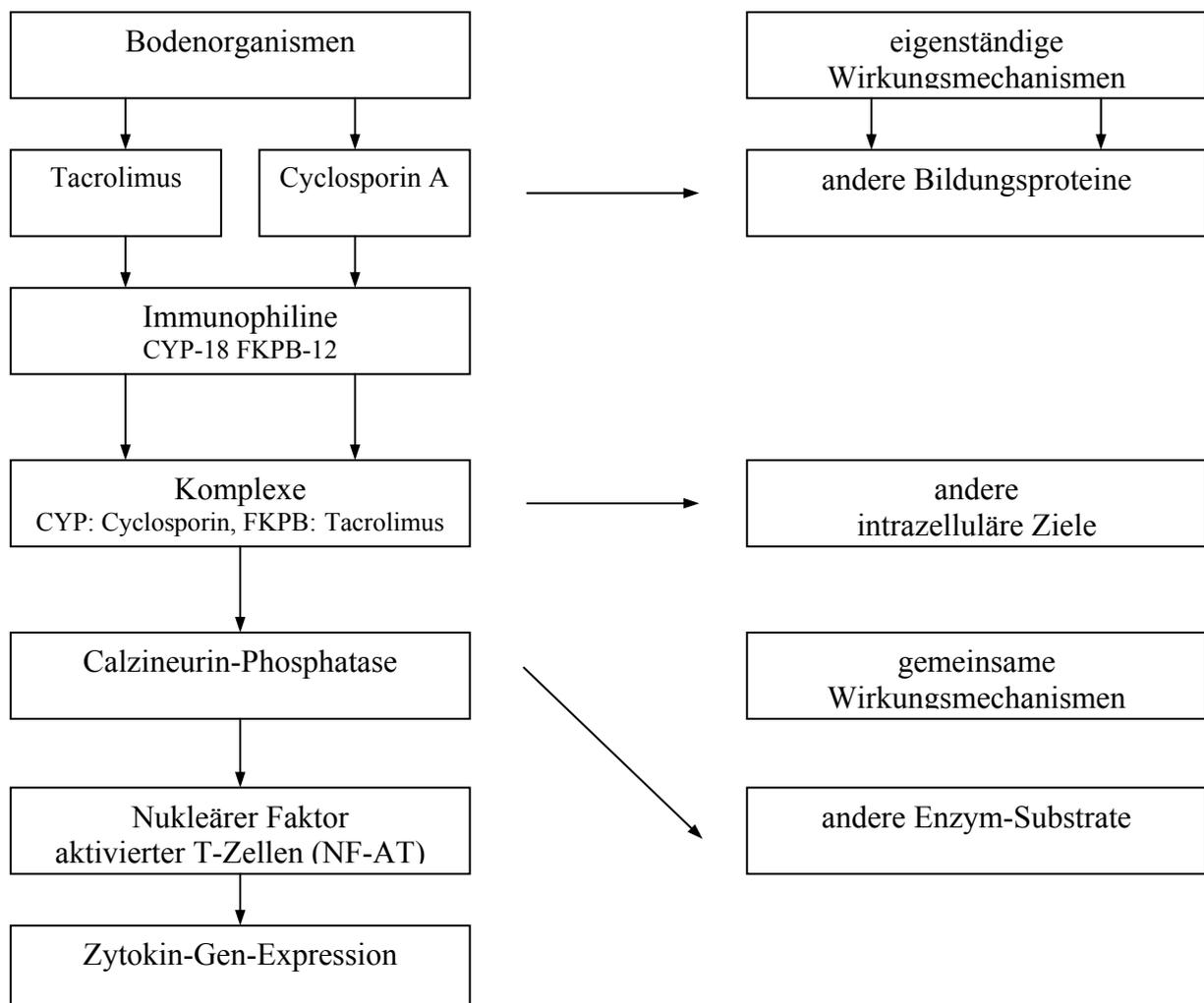


Abb. 4. Der Wirkungsmechanismus von FK506 (Tacrolimus) und Cyclosporin A (CsA).

Sowohl Cyclosporin A als auch FK506 wurden aus Bodenorganismen isoliert. Beide Substanzen binden an Proteine im Inneren von Säugetierzellen, die sog. Immunophiline (Abb. 4). Komplexe, die zwischen Cyclosporin A oder FK506 und einem Immunophilin gebildet werden, hemmen die Calcineurin-Phosphatase. Dieses Enzym ist von wesentlicher Bedeutung bei der Aktivierung von T-Zellen, denn es aktiviert einen Transkriptionsfaktor, genannt *nuclear factor of activated T-cells* (NF-AT). Da dieser Transkriptionsfaktor für die Expression von Genen für IL-2, IL-4, IFN- γ , TNF- α und anderen an der Abstoßungsreaktion beteiligten Zytokine verantwortlich ist, unterdrücken FK506 und Cyclosporin A die Transplantatabstoßung. Somit verhindert FK506 die T-Zellaktivierung, die Bildung zytotoxischer T-Zellen, die B-Zell-Proliferation, die Produktion löslicher Mediatoren wie IL-2, IL-3 und IFN- γ sowie die Expression von IL-2-Rezeptoren.

Da die Calcineurin-Phosphatase noch andere intrazelluläre Funktionen hat, lassen sich einige der gemeinsamen dosisabhängigen Nebenwirkungen dieser Substanzen, wie Neurotoxizität, Nephrotoxizität und Diabetogenität im Zusammenhang mit deren Wirkungen auf die Calcium-Calmodulin-Stoffwechselwege und Ca^{2+} abhängige cAMP-Signalübertragung erklären. Theoretisch gibt es in dieser Hinsicht keinen Unterschied zwischen den beiden Substanzen.

Die eigentliche physiologische Aufgabe der Immunophiline - auch bekannt als Topoisomerasen, weil sie andere Proteine falten und entfalten - liegt in der Regulation von Rezeptorfunktionen innerhalb der Zelle. Immunophiline sind mit den Steroid-Rezeptoren assoziiert, wobei verschiedene Immunophiline Teile verschiedener Rezeptoren bilden. Ein FK-Bindungsprotein (FKBP-52), das an Tacrolimus bindet, ist mit dem Glukokortikoid-Rezeptor (GC) assoziiert. Steroide binden, nachdem sie in die Zelle gelangt sind, an den GC-Rezeptor und bewirken, daß dieser sich aus dem Komplex löst und zum Zellkern wandert, wo er an die DNA bindet und die Aktivität einer Vielzahl von Genen reguliert. Es wird angenommen, daß FK506 durch Bindung an FKBP-52 die Affinität der Interaktionen innerhalb des GC-Komplexes verändert. Dies führt dazu, daß zur Aktivierung des GC-Stoffwechselweges eine geringere Steroid-Konzentration erforderlich ist. Das hat zwei wesentliche Konsequenzen: erstens einen Steroid-sparenden Effekt, der sich bei den Patienten in einem verminderten Steroid-Bedarf ausdrücken würde; und zweitens eine größere Wirkpotenz von FK506 im Vergleich zu Cyclosporin A, weil der GC-Rezeptor auch noch andere Signalübertragungswege innerhalb der Zelle regelt. Dazu gehört die Aktivierung und Funktion anderer Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, die bei immunologischen Reaktionen von Bedeutung sind (Abb. 5).

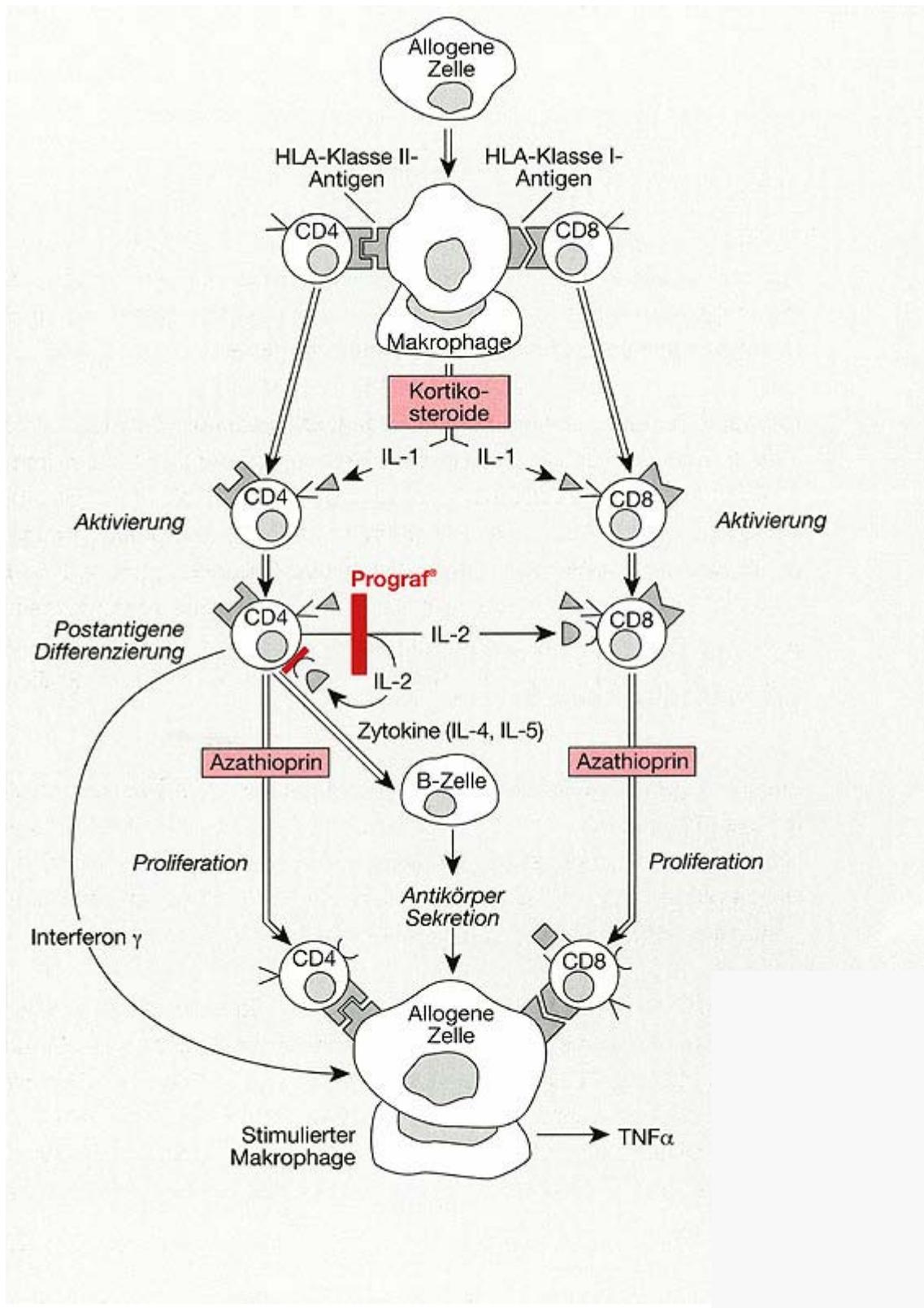


Abb. 5. Abstoßungsmechanismus: Das Zusammenwirken der verschiedenen Zelltypen bei einer Immunantwort und Angriffspunkte verschiedener immunsuppressiv wirkender Substanzen.

FK506 unterscheidet sich noch in anderen wichtigen Wirkungen von Cyclosporin A. So hemmt FK506 im Gegensatz zu Cs A die Signalübertragung über den IL-4-Rezeptor. Der zugrundeliegende Mechanismus ist derzeit noch nicht gänzlich geklärt. Dennoch läßt sich aus diesen Unterschieden schließen, daß FK506 eine bessere Wirkung auf Antikörperreaktion hat, was sich durch klinische Beobachtungen in vielen Zentren bestätigen ließ.

1.3 Stickoxid (NO)

1.3.1 Historischer Rückblick

Ein einfaches Gas, das Stickoxid (NO), war bisher hauptsächlich als Schadstoff in der Auto- und Industrieabgase bekannt (90). In den letzten Jahren entpuppte es sich jedoch als einer der potentesten Regulatoren verschiedenster Körperfunktionen. Aufgrund seiner niedrigen Konzentrationen in biologischen Systemen und seiner kurzen Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden blieb das Molekül lange Zeit unentdeckt.

Der wahrscheinlich erste Hinweis auf eine NO-Synthese in Säugetierzellen datiert bereits aus dem Jahr 1916, als entdeckt wurde, daß es während einer Infektion zu einer erhöhten Ausscheidung von Nitraten im Urin kommt, ohne daß damals natürlich der Zusammenhang mit der NO-Biosynthese aufgedeckt wurde (135). Erst Anfang der 80er Jahre wurde gezeigt, daß die Stickoxide *Nitrit* (NO^{2-}) und *Nitrat* (NO^{3-}) von verschiedenen Säugetierzellen und auch vom menschlichen Organismus produziert werden (66, 191).

1985 demonstrierten *Michael Marletta* und *Dennis Stuehr* von der Universität von Michigan sowie *John Hibbs* von der Universität von Utah dann, daß Makrophagen durch bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) zur Bildung von Nitrit und Nitrat stimuliert werden können (45, 81, 191). Zwei Jahre später wurde das chemisch labile NO als primäres Syntheseprodukt dieser Zellen nachgewiesen und gezeigt, daß das Stickstoffatom des NO aus einem der Guanidinstickstoffe der Aminosäure *L-Arginin* stammt (81). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden, mit der NO in wäßriger Lösung oxidiert wird, hatte man zunächst nur seine stabilen Oxidationsendprodukte, Nitrit und Nitrat nachweisen können.

Völlig unabhängig davon hatten *Furchgott* und Mitarbeiter von der *State University of New York* Anfang der 80er Jahre entdeckt, daß viele blutgefäßerweiternde Stoffe ihre Wirkung verlieren, wenn man die Endothelzellen entfernt (55). Sie schlossen aus ihren Befunden, daß diese gefäßerweiternde Stoffe nicht direkt die Blutgefäßwand dilatieren, sondern die Endothelzellschicht zur Freisetzung einer unbekanntes, gefäßerweiternden Substanz stimulieren. Diese Substanz, die sie „*endothelium derived relaxing factor*“ (*EDRF*) nannten, wirkte dann ihrerseits auf die glatte Gefäßmuskulatur. Keine der damals bekannten körpereigenen gefäßerweiternden Substanzen verhielt sich wie der neue EDRF (51, 91, 154). Jahrelang gelang es nicht, die Substanzen zu isolieren. Der Wirkmechanismus von EDRF war nur vergleichbar mit dem des körperfremden Medikaments *Nitroglyzerin*, das seit über 100 Jahren erfolgreich zur Behandlung von *Angina pectoris* eingesetzt wird (51).

Ferid Murad und Mitarbeiter an der *Stanford University* hatten Ende der 70er Jahre beschrieben, daß Nitroglyzerin und andere organische Nitrate selbst biologisch inaktiv sind, aber von den glatten Muskelzellen der Gefäßwand zu NO metabolisiert werden können. Das gebildete NO stimuliert dann die zytoplasmatische *Guanylatzyklase*, ein Enzym, welches aus *Guanosintriphosphat (GTP)* den intrazellulären Bottenstoff (*second messenger*), zyklisches *Guanosin-3,‘ 5‘-monophosphat (cGMP)*, produziert. Die Erhöhung des cGMP-Spiegels in der glatten Muskelzellen vermittelt die Relaxation der Gefäßmuskulatur (51, 154).

Mitte der 80er Jahre konnte die Arbeitsgruppe um *Ulrich Förstermann* zeigen, daß EDRF die erste körpereigene Substanz war, die – wie das aus Pharmaka freigesetzte NO – direkt die lösliche Guanylatzyklase stimuliert (51). Im Jahr 1987 wies dann die Arbeitsgruppe um *Salvador Moncada* an den *Wellcome Research Laboratories* in London mit physikalischen Methoden nach, daß der aus Endothelzellen freigesetzte EDRF wahrscheinlich mit NO identisch ist (154). Analog zum Makrophagensystem wurde die Aminosäure *L-Arginin* als Substrat der NO-Synthese in Endothelzellen identifiziert (81).

1.3.2 Chemie und Biochemie des Stickoxids

NO ist unter normalen atmosphärischen Bedingungen ein Gas. Es besitzt ein ungepaartes Elektron und wird dadurch zu einem hochreaktiven Molekül. Aufgrund seiner geringen Größe und elektrischen Neutralität kann synthetisiertes NO leicht die produzierende Zelle verlassen, in eine benachbarte Zielzelle hineindiffundieren und dort seine Wirkung ausüben. NO reagiert

bevorzugt mit metallhaltigen (besonders eisenhaltigen) Proteinen, was viele seiner physiologischen, aber auch toxischen Eigenschaften erklärt (7, 44, 64, 68, 100, 162, 165, 192).

Wie bereits erwähnt, ist die zytoplasmatische Guanylatzyklase das Zielenzym der biologischen Wirkungen von NO in vielen Geweben (im Gehirn, im peripheren Nervensystem und in Blutgefäßen) (51). Dieses Enzym ist ein Hämoprotein, d.h. neben der Proteinstruktur enthält es ein Eisenatom, das in ein Porphyringerüst eingebaut ist. Die Bindung von NO an das Häm-Eisen aktiviert das Enzym zur Produktion des sekundären Botenstoffs cGMP aus GTP. Das cGMP ist für die intrazelluläre Weitervermittlung der NO-Wirkungen in zahlreichen Geweben verantwortlich. Bei anderen Enzymen hingegen kann die Bindung von NO an ein Metallatom im aktiven Zentrum die enzymatische Funktion lahmlegen.

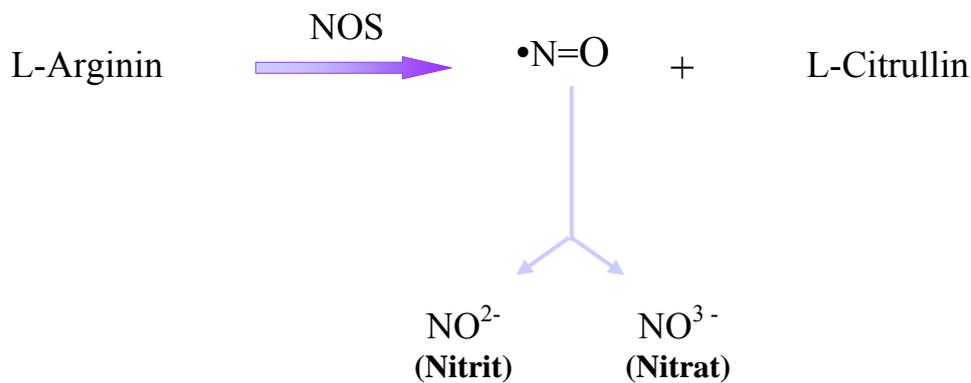
In biologischen Systemen reagiert NO innerhalb von Sekunden mit gelöstem Sauerstoff und Wasser zu einem Gemisch aus Nitrit (NO^{2-}) und Nitrat (NO^{3-}) (81). Die stabilen Endprodukte NO^{2-} und NO^{3-} sind dann mit verschiedenen Techniken nachzuweisen (67, 70, 82). Beide Anione sind biologisch weitgehend unwirksam, und diese Oxidation stellt den typischen Inaktivierungsmechanismus für NO dar. Im Gegensatz zu vielen anderen Botenstoffen benötigen Zellen somit keine Enzyme, um die Wirkungen von NO zu beenden.

1.3.3 Synthese und Wirkung von NO im Blutgefäßsystem

NO ist ein kurzlebiges, lipophiles, gasförmiges Radikal, daß durch Oxidation mit molekularem Sauerstoff aus der Guanidinogruppe der Aminosäure *L-Arginin* synthetisiert wird (*Abb. 6*) (66, 67, 81). Durch diese Reaktion entstehen NO und *L-Citrullin*. Bisher konnte kein anderes Substrat für die NO-Synthasen identifiziert werden.

Die Endothelzellen der Blutgefäße sind eine wesentliche physiologische Quelle von NO. Sie produzieren NO unter Basalbedingungen, und die Synthese kann durch verschiedene Rezeptorantagonisten (Acetylcholin, Peptide, ATP und ADP), aber auch durch die Scherkräfte des fließenden Blutes gesteigert werden. Endothelzellen enthalten eine eigene Ca^{2+} /Calmodullin-regulierte NO-Synthase, die bisher in keinem anderen Zelltyp gefunden wurde. Das von der Endothelzelle gebildete NO diffundiert in die darunterliegenden glatten Muskellzellen, wo es durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und Steigerung der

cGMP-Bildung zur Muskelrelaxation und Vasodilatation führt (16, 51, 101, 131, 139). Endothelzellen geben auch NO in das Gefäßlumen ab. Diese aktiviert die lösliche Guanylatzyklase in Thrombozyten und hemmt so ihre Aggregation und Adhäsion. Einige der Substanzen, die von aggregierenden Thrombozyten freigesetzt werden (z.B. ADP und Serotonin), sind selbst effiziente Stimulatoren der endothelialen NO-Synthese, so daß ein intaktes Endothel eine beginnende Thrombozytenaggregation durch Mehrproduktion von NO unterbrechen kann (131, 180).



Die **Abb. 6** zeigt die Entstehung von NO aus L-Arginin. Das außerdem entstehende L-Citrullin tritt in der Leber in den Harnstoffzyklus (Ammoniakentgiftung) ein. Katalysiert wird diese Reaktion von den NO-Synthasen (NOS). Die Inaktivierung von NO erfolgt nach wenigen Sekunden, indem es mit hoher Affinität an ein Hämprotein, welches zur Cytochrom P450-Gruppe (CYP) gehört, bindet und über Nitrosylhämoglobin und Methämoglobin in die stabilen Endprodukte Nitrit (NO²⁻) und Nitrat (NO³⁻) zerfällt (79). Es konnte gezeigt werden, daß mit quantitativer Zunahme der NOS auch die Enzymaktivität und damit die lokale NO-Produktion gesteigert wird.

1.3.4 Nomenklatur der NOS-Formen

Die Nomenklatur der NOS-Formen richtet sich nach der Kalziumab- bzw. unabhängigkeit der Enzymaktivität, nach der Zellform, aus der sie erstmals isoliert wurde und danach, ob das Enzym konstitutiv oder nach Induktion exprimiert wird (*Tab. 1*).

Die neuronale NO-Synthase (nNOS, auch NOS I genannt) wurde erstmals in Neuronen nachgewiesen (108). Sie ist Ca^{2+} abhängig und wird konstitutiv in verschiedenen neuronalen aber auch nicht-neuronalen Zellen exprimiert.

Als typischer Syntheseort der induzierbaren NO-Synthase (iNOS, auch NOS II genannt) sind zuerst Makrophagen identifiziert worden (189, 190). Die Induktion der iNOS kann durch verschiedene Zytokine erfolgen und es bedarf dann mehrere Stunden, bis es zur NO-Produktion kommt. Die induzierbare NO-Konzentration liegt allerdings um ein Vielfaches höher (ca. 1000-fach) als beim konstitutiven Enzym (77). *Hauschildt et al.* haben gezeigt, daß die iNOS von Ca^{2+} unabhängig ist (77). Es gibt allerdings jetzt auch Hinweise dafür, daß die Bildung oder zumindest die Aktivität der iNOS doch von Ca^{2+} abhängig ist (20). Wichtige Kofaktoren, die für die Entstehung und Aktivität der iNOS benötigt werden, sind NADPH, Tetrahydrobiopterin (BH4), FAD und GSH (108, 111, 147, 188, 195, 202). *Nussler et al.* konnten zeigen, daß die folgenden Zelltypen eine typische iNOS besitzen: Kupffer-Zellen, Hepatozyten, Milzzellen, Knorpelzellen und glatte Muskelzellen (10, 32, 83, 139, 147, 181). Weitere Zelltypen, die ebenfalls über eine iNOS verfügen, sind Fibroblasten, Endothelzellen und verschiedene Tumorzelllinien (104, 140, 163, 189, 192, 202).

Die dritte NOS-Form, die endotheliale NO-Synthase (eNOS, auch NOS III genannt) ist wie die nNOS Ca^{2+} abhängig und kommt vor allem in Endothel vor (163). Sie ist für die Regulation des Vasotonus von zentraler Bedeutung (72, 112).

Somit lassen sich die NOS folgendermaßen zusammenfassen:

- iNOS: induzierbare NO-Synthase (Makrophagen, Hepatozyten und Kupffer Zellen) (117, 148, 195)
- cNOS: konstitutive NO-Synthase (e-NOS in Endothelzellen und n-NOS in Neuronen) (*Tab. 1*) (112).

	Vorkommen	Kofaktoren	Kompetitive Inhibitoren	Inhibitoren der mRNA-Synthese	Aktivatoren
cNOS	-Vasc. Endothel -Neuronalzellen -Nebenniere -Nierenzellen -Thrombozyten	- Ca^{2+} -Calmodulin -NADPH	-N-Nitro-L-Arginin -N-Nitro-L-Arg.- Methylester -N-Monoethyl L-Arg. -N-Amino-L-Arginin -N-Iminoethyl-L- Ornithin		-L-Arginin -L-Homoarginin -Methyl-Ethyl- Ester von L-Arg. L-Homoarg. Dipeptidanaloga von L-Arg.

iNOS	-Makrophagen -Neutr. Granuloz. -Kupfferzellen -Hapatozyten -glatte Gefäßmusk. -renales Mesang. -vask. Endothel	-NADPH -Tetrahydrobiopteren -FAD -Flavoprotein	s. cNOS zusätzlich -L-Canavanin	Glukokortikoide -Cycloheximid -Polymixin	-s. cNOS zusätzlich -Endotoxin -IFN- γ -TNF- α -Zytokine -Mg ²⁺
-------------	---	---	---------------------------------------	--	--

Tab. 1 faßt die wichtigsten Eigenschaften der iNOS und cNOS zusammen.

1.3.5 Hämostasiologische Funktion

Seit einer der potentesten Vasodilatoren, der *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) als NO identifiziert wurde, ist klar, daß anorganische Molekül wesentlich an der Regulation der Gefäßweite beteiligt ist (51, 93, 154). In Anwesenheit von Ca²⁺ wird durch cNOS aus Gefäßmuskelzellen ohne Stimulus eine konstante Menge an NO freigesetzt, welche durch z.B. Bradykinine kurzfristig erhöht werden kann (22). iNOS dagegen, welches Ca²⁺ unabhängig ist, wird erst zwei Stunden nach Aktivierung durch LPS oder proinflammatorische Zytokine exprimiert und setzt dann simultan NO über mindestens 48 Stunden frei. Die Muskelrelaxation an glatter Arterienmuskulatur ist endothelabhängig, d.h. an isolierten Arterienmuskelzellen ohne Endothel ist keine Relaxation möglich (55, 74, 91). Aus Gefäßwandzellen freigesetztes NO stimuliert in benachbarten Gefäßmuskelzellen die lösliche Guanylatzyklase, um Magnesium- Guanosintri-phosphat (Mg-GTP) in Cyclo-Guanosinmonophosphat (cGMP) umzuwandeln, welches seinerseits die cGMP abhängige Proteinkinase aktiviert, was zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung der leichten Myosinketten und zur Muskelrelaxation führt (139).

Die Venen haben eine wesentlich geringere basale NO-Produktion. Deshalb sind sie besonders sensibel auf exogenes NO, z.B. in Form von medikamentösen Nitrovasodilatoren. NO beeinflusst außerdem die Thrombozytenfunktion (100, 131). Erstens stimulieren aggregierende Plättchen die NO-Freisetzung aus Endothelzellen und zweitens können die Thrombozyten NO selber bilden, was schließlich zu einer Hemmung der Plättchenaggregation, zur Hemmung der Vasokonstriktion und zur Steigerung des regionalen

Blutflusses führt. NO kann bei thrombotischer Verschiebung eines Gefäßes auch die Perfusion im Kollateralkreislauf steigern und somit einen ischämischen Schaden reduzieren. NO wirkt deshalb sehr gut auf Thrombozyten, weil diese im Vergleich zu anderen Blutzellen einen hohen Gehalt an Guanylatzyklase haben.

1.3.6 Rolle bei immunologischen Reaktionen

Während die hämostasiologische Funktion und Wirkungsweise von NO inzwischen weitgehend bekannt ist, sind die Kenntnisse über seine Rolle bei immunologischen Reaktionen noch unzureichend und daher Gegenstand aktueller Forschung (116).

Wie bereits in Herz- und Lungentransplantationsmodellen gezeigt wurde, ist eine akute Transplantatabstoßung mit einem simultanen Anstieg von NO (reflektiert durch die stabilen Endprodukte im Serum $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ in μM) assoziiert (92,115, 205, 206). Darüberhinaus wurde bei Rattenlebertransplantatabstoßung mittels *in situ*-Hybridisierung eine hochregulierte iNOS-Genexpression sowohl in den infiltrierenden Leukozyten als auch in den Hepatozyten beobachtet. Ein Beispiel hierfür liefern die experimentellen Untersuchungen von Kuo, der im Rattenmodell der akuten Abstoßung zeigte, daß während der akuten Abstoßung ca. 93% aller Zellen des Portalinfiltrats sowie ca. 76% aller Hepatozyten das Enzym für die Stickoxidsynthese, die induzierbare NO-Synthase, exprimieren. Dagegen lediglich ein kleiner Anteil der Endothelzellen eine iNOS-Expression aufweist (Abb. 7) (110).

In der Leber wird NO nach Stimulation mit Endotoxin oder anderen bakteriellen Produkten von Kupffer-Zellen und nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen von Hepatozyten selber, katalysiert durch die induzierbare NOS (iNOS), synthetisiert (30, 31, 59, 63, 82, 138, 180, 208). Nach Stimulation kommt es zu einer sehr viel höheren NO-Produktion, so daß das Radikal vorwiegend zytotoxische Wirkungen hat, wohingegen es im Rahmen der Basalproduktion als *messenger* fungiert (139). Hierfür ist entscheidend, daß NO mit hoher Affinität an das prosthetische Eisenzentrum der Hämgruppe des Cytochrom P450 bindet und dadurch zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung verschiedener Isoenzyme führt.

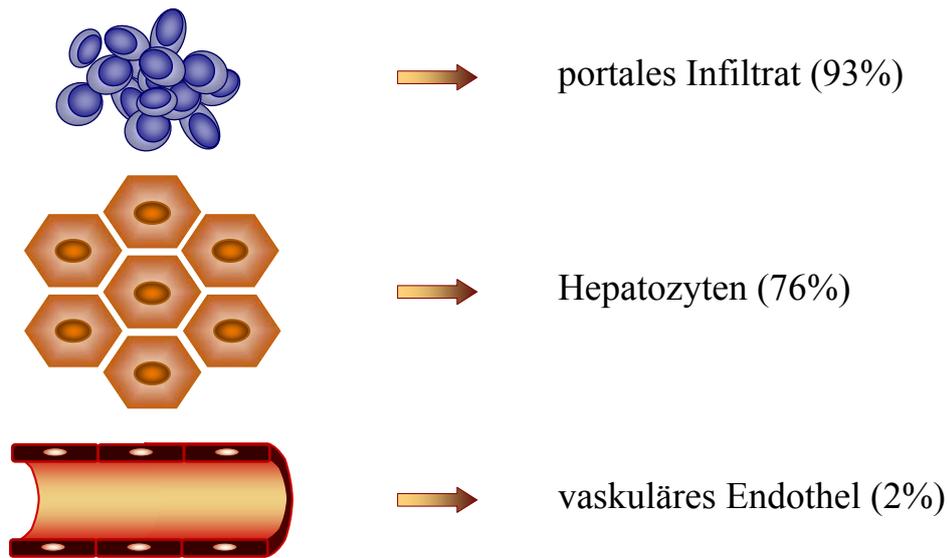


Abb. 7. *iNOS-Expression während der akuten Abstoßung nach Lebertransplantation.*

Aus Makrophagen freigesetztes NO trägt aber wesentlich zur Infektabwehr bei, indem es zur Hemmung der Mitochondrienatmung und somit zur Zytotoxizität gegen Tumorzellen, Bakterien, Pilze und Protozoen führt. Das entstehende cGMP fördert wiederum die Freisetzung lysosomaler Enzyme und steigert die Phagozytose (7).

Allerdings kann sich eine erhöhte NO-Produktion im Fall einer Sepsis auch negativ auf verschiedene Organe auswirken. Beim SIRS (*systemic inflammatory response syndrom*) vermindert das durch iNOS entstandene NO das Ansprechen der Monozyten auf β -Agonisten, so daß es zur kardialen Dysfunktion mit Hypotonie kommt, obwohl hierbei keine Koronarischemie besteht (74).

In der Leber kommt es zu einer Verminderung des Glukose- und Harnstoffmetabolismus (Ammoniakentgiftung), sowie zu einer Reduktion der GAPDH-Aktivität und zu Reduktion der Protein-, Fibrinogen- und Albuminsynthese, welche dosisabhängig und voll reversibel ist (32, 178, 179). Durch die lokale Hypotonie infolge Vasodilatation kommt es zur Änderung des Verhaltens von Leukozyten, Thrombozyten und anderen Blutzellen (131).

Auch bei der Transplantatabstoßung kommt es als Antwort auf die lokale Expression von proinflammatorischen Zytokinen zur vermehrten Produktion von NO (117). Im Tiermodell (Laborratte) konnte gezeigt werden, daß es bei untherapierten lebertransplantierten Tieren im Gegensatz zu Isografttransplantierten und mit FK506 therapierten Empfängertieren zu einem signifikanten Anstieg iNOS-positiver Makrophagen kommt (63). Die Immunsuppression mit FK506, Cyclosporin A und Steroiden oder einer Kombination führte in einem anderen

Versuch zur signifikanten Reduktion der lokalen iNOS-mRNA und Enzymaktivität (23). Die Bedeutung von NO für die Transplantationsmedizin unterstützten Rattenversuche, die gezeigt haben, daß eine alleinige Therapie mit Aminoguanidinhydrochlorid (AGH, selektiver iNOS-Inhibitor) zu einem signifikant längeren Transplantatüberleben im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe führt (207). Bei lebertransplantierten Ratten konnten während der Rejektion sowohl Hepatozyten, als auch transplataninfiltrierende, vor allem periportal lokalisierte mononukleäre Zellen als iNOS-Quelle identifiziert werden (110).

NO ist aber nicht nur lokal wirksam. Nach Lebertransplantation konnten bis zum 4.-6. postoperativen Tag erhöhte Serumnitrat-Spiegel gemessen werden, welche in Abwesenheit von Komplikationen anschließend abfielen. Dieser Effekt zeigte sich nicht bei anderen großen chirurgischen Eingriffen wie Leberteilresektion oder koronarem Bypass. Im Falle einer Abstoßung oder Infektion fielen die Spiegel nicht ab bzw. stiegen entsprechend wieder an, wobei sie hierfür ein sehr früher Marker waren, die gut mit dem Serum TNF α -Spiegel sowie der Anzahl IL-2-Rezeptor positiven Blutlymphozyten korrelierten und sich nach einer Hochdosiskortisontherapie wieder normalisierten (41).

1.3.7 Stimulation und Inhibierung der NO-Synthesen

Eine endogene NO-Synthase wurde erstmalig in pathogenfreien Ratten nach Gabe von Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) beobachtet (66). Später konnte nachgewiesen werden, daß Makrophagenlinien der Maus hohe NO²/NO³-Spiegel erzeugen, wenn sie *in vitro* mit LPS und/oder IFN- γ inkubiert werden. Gleiche Effekte konnten durch Zugabe des TNF- α und TNF- β erzielt werden (42, 44, 189-191). *Nussler et al.* konnten zeigen, daß tierische und humane Hepatozyten eine maximale NO-Produktion aufweisen, wenn sie mit einer Kombination aus LPS, IL-1, TNF- α und IFN- γ stimuliert werden (44, 124, 148). Zusätzlich ließ sich demonstrieren, daß Kupffer-Zellen, die vorher mit LPS behandelt wurden, einen signifikanten NO²/NO³-Anstieg in Hepatozyten erzeugen. Gemischte Kulturen aus Hepatozyten und Kupffer-Zellen zeigen einen höheren Anstieg der NO-Produktion, als wenn beide Zelltypen allein mit Zytokinen behandelt werden (10). Eine Aktivierung der cNOS kann durch endogene Vasodilatoren wie Histamin, Thrombin, Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) oder Kalziumionophoren erfolgen (51, 55, 56, 154).

Die Bildung von NO kann mit verschiedenen kompetitiven Inhibitoren des Enzyms blockiert werden. Die meisten dieser Inhibitoren sind L-Arginin-Analoga, die eine kompetitive

Hemmung der NO-Synthasen bewirken. Es wurde eine Reihe von Substrat-Analoga beschrieben, die zumeist im terminalen Guanidinrest des Arginins Substituenten tragen (71, 148). Obwohl sie zur Aufhellung der physiologischen Rollen des NO entscheidend beigetragen haben, ist ihre Spezifität für die NO-Synthase im Vergleich zu anderen Arginin-metabolisierenden Enzymen (z.B. Arginase) noch nicht ausreichend untersucht. Mittlerweile ist eine Fülle verschiedener Inhibitoren bekannt, die mehr oder weniger spezifisch eine Enzymart hemmen können. Die gebräuchlichsten kompetitiven Inhibitoren beider Enzyme sind N^G-Monomethyl-L-Arginin (NMA) und Aminoguanidinhydrochlorid (AGH) (14, 20, 28, 29, 71, 95, 113, 114, 151).

Die Entwicklung spezifischer Inhibitoren der NO Synthese könnte weitreichende Auswirkungen auf die pharmakologische Erkrankungen haben. Ebenfalls von Bedeutung für die kardiovaskuläre Prävention sind die hemmende Wirkung von NO auf die Thrombozyten-aggregation und eine damit verbundene antithrombotische Wirkung sowie eine hemmende Wirkung auf die endotheliale Anhaftung von Leukozyten (56). Eine ausführliche Zusammenfassung der heute bekannten L-Arginin-Analoga und ihrer Wirkungsweise ist von *Nathan* veröffentlicht worden und in der *Tab. 2* dargestellt (140).

Substanzklasse	Struktur	Selektivität
Arginin-Derivat	$ \begin{array}{c} \text{NH}_2 \quad \text{CO}_2 \\ \\ \text{X} \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{HN} \quad \text{R} \\ \\ \text{R}_1 \quad \text{R}_2 \quad \text{X} \\ \\ \text{H} \quad \text{NHCH}_3 \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{H} \quad \text{NHNO}_2 \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \quad \text{NHNO}_2 \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{H} \quad \text{NHNH}_2 \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{H} \quad \text{NHNH}_2 \quad (\text{CH}_2)_2 \\ \\ \text{H} \quad \text{NH-} \quad \text{CH}_2 \\ \\ \text{H} \quad \text{NH}_2 \quad \text{O} \end{array} $	L-NMMA cNOS ≥ iNOS L-NA cNOS >> iNOS L-NAME cNOS >> iNOS L-NAA cNOS ≈ iNOS L-NH ₂ -Hom. cNOS ≈ iNOS L-CP-ARG cNOS > iNOS L-Canavanin cNOS > iNOS
Aminoguanidin		cNOS << iNOS
Aminotriazol		cNOS > iNOS

Tab. 2. NO-Synthase-Inhibitoren (Substanzenanaloga).

1.3.8 Einfluß der NO-Biosynthese auf die Biologie und Pathologie der Leber

Die Biosynthese von NO wird in der Leber im Rahmen von Entzündungsreaktionen induziert (148). Daraus resultieren einige der typischen Veränderungen des Leberstoffwechsels, die bei Infektionserkrankungen, insbesondere bei septischen Krankheitsbildern oder während der akuten Abstoßung beobachtet werden können.

Zu den spezifischen Wirkungen des NO in den Hepatozyten gehören die Hemmung der Proteinsynthese, die Inhibition der Cytochrom P450 Enzyme der Biotransformation und der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die im Glukosestoffwechsel eine wichtige Rolle spielt (15, 31, 179, 182).

Der genaue Mechanismus der Proteinsynthesehemmung bleibt weiterhin ungeklärt. Für den Leberstoffwechsel konnte diese Beobachtung allerdings von außerordentlicher Bedeutung sein, da die hepatozelluläre Insuffizienz unter anderem durch eine Verminderung der Proteinsynthese gekennzeichnet ist (27). Eine Inhibition der allgemeinen Proteinsynthese der Kupffer-Zellen durch endogen produziertes NO ließ sich bis jetzt nicht nachweisen (180).

1.4 Cytochrome P450 (CYP) und Isoenzyme

1.4.1 Die Cytochrom P 450 Superfamilie

Cytochrome P450 (CYP) sind die geschwindigkeitbestimmenden Enzyme im Fremdstoffmetabolismus der Leber (58). Die meisten sind induzierbar und werden gewebespezifisch exprimiert. Sie wurden erstmals 1958 als „zellfärbendes Pigment“ der Leber unabhängig von *Grafinkel* und *Klinkenberg* beschrieben (58, 106). Der Name Cytochrom P450 leitet sich davon ab, daß Cytochrome im reduzierten Zustand und nach Begasung mit Kohlenmonoxid ein Differenzspektrum mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigen. Anhand der Absorption ist mit dem molaren Extinktionskoeffizienten eine Quantifizierung möglich (152, 153).

Die *mischfunktionellen Oxygenasen*, wie diese Enzymgruppe auch genannt wird, befindet sich in der Membran des endoplasmatischen Retikulums vor allem der Leber, aber auch in anderen Organen wie Nebennierenrinde, wobei sie dort vor allem an der Steroidbiosynthese beteiligt sind (137). Hierfür ist entscheidend, daß NO mit hoher Affinität an das prosthetische Eisenzentrum der Hämgruppe des Cytochrom P450 bindet und dadurch zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung verschiedener Isoenzyme führt.

Die mischfunktionellen Oxygenasen bestehen aus über 70 verschiedenen Enzymen, die strenggenommen keine Isoenzyme sind, da sie sich nach Vorkommen und Substratspezifität unterscheiden.

Die Cytochrom P450-Superfamilie umfaßt derzeit 481 Isoformen in 85 verschiedenen Eu- und 20 Prokaryontenspezies (141) (Tab 3). Die Einteilung der Cytochrom P450-Enzyme basiert *per conventionem* auf ihren Aminosäuren-Sequenzhomologien. Innerhalb einer Familie sind sie zu mehr als 40%, innerhalb einer Subfamilie mindestens zu 55% identisch. Cytochrom P450-Proteine werden mit „CYP“ abgekürzt. Darauf folgt eine arabische Ziffer, welche die Familie bezeichnet, und ein lateinischer Großbuchstabe für die jeweilige Subfamilie. Einzelne Isoenzyme werden mit einer weiteren arabischen Ziffer chronologisch durchnummeriert. Dem gesamten Symbol wird ein lateinischer Kleinbuchstabe für die jeweilige Spezies vorangestellt. Damit ergibt sich beispielsweise für das humane Cytochrom P450 1A2 das Symbol hCYP1A2.

CYP Isoenzyme	Anteil der Verstoffwechslung
1A2	13%
1B1	<1%
2A6	4%
2B6	<1%
2C	18%
2D6	bis zu 2.5%
2E1	bis zu 7%
3A4	bis zu 28%

Tab. 3 zeigt die unterschiedliche Bedeutung der einzelnen in dieser Arbeit untersuchten CYP-Isoenzyme wie 1A2, 2E1 und 3A4.

1.4.2 Biochemie der Cytochrome P450 (CYP)

In einer sogenannten Phase-I oder Funktionalisierungsreaktion werden durch Cytochrome P450 neben endogenen Substanzen wie Fettsäuren, Steroide und Prostaglandine vor allem apolare, lipophile Fremdstoffe wie Pharmaka, Industriechemikalien, Nahrungsmittelbestandteile und Umweltgifte metabolisiert. Durch Einführen oder Modifikation funktioneller Gruppen entstehen reaktive polare Metabolite, die eine notwendige Voraussetzung zur Entgiftung von Fremdstoffen sind. Diese Metabolite werden in einer Folgereaktion, auch Phase-II oder Konjugationsreaktion genannt, durch Sulfatierung, Glutathionkonjugation, Acetylierung oder Konjugation mit Aminosäuren in hydrophile, leichter eliminierbare Endprodukte konvertiert.

Das Ausmaß der Biotransformation wird durch das Gleichgewicht von Phase-I zu Phase-II bestimmt. Kommt es aufgrund von hohen CYP-Gehalten bzw. einem Mangel an Phase-II-Konjugation zu einem Überschuß an reaktiven Metaboliten, so steigt die Wahrscheinlichkeit eines für die Zelle schädlichen Ereignisses.

Neben spezies- und substratspezifischen Unterschieden bestehen auch organspezifische Unterschiede, beispielsweise bei Cytochrom P450 1A1, das nach Induktion bei der Ratte in der Leber, beim Menschen aber in der Lunge exprimiert wird (130). Somit erlauben die Untersuchungen zu Cytochromen P450 aus Mensch und Ratte keine absolute Extrapolation von Ergebnissen im Tierversuch (Laborratte) auf die Situation beim Menschen.

1.5 Technik der orthotopen Rattenlebertransplantation

S. Lee gilt als Pionier in der Entwicklung der Rattenlebertransplantation. 1973 stellte er das erste Modell der orthotopen Rattenlebertransplantation (oRLTx) vor (119).

Wie in der Humanlebertransplantation verwandte er einen extrakorporalen porto-jugulären Bypass zur Dekompensation des Splanchnikus-Gebietes während der anhepatischen Phase. Er führte alle Anastomosen in mikrochirurgischer Nahttechnik durch. Die arterielle Versorgung des Transplantates erfolgte mit Hilfe eines langen Donor-Aortensegmentes. Den Spender-Gallengang implantierte er in das Duodenum des Empfängers.

Mit dieser Methode führte er die ersten 64 erfolgreichen Lebertransplantationen an der Ratte durch und erzielte eine Überlebensrate von 74 % (119).

Die Technik war jedoch so komplex und anspruchsvoll, daß keine andere Forschergruppe in der Lage war, diese Resultate zu reproduzieren (47).

1975 veröffentlichte *Lee* daraufhin eine vereinfachte Technik der oRLTx: Er modifizierte sein Modell an zwei wesentlichen Stellen:

- Er verzichtete auf die Arterialisierung des Transplantates mit der Begründung: „*The rat liver deprived of hepatic artery flow not only tolerates transplantation well but also functions normally in the host for an indefinite period... Eliminating the hepatic artery anastomosis not only simplified the procedure but also eliminated the risk of hemorrhage from that anastomosis, which occasionally complicated transplantations.*“

- Er änderte die Reihenfolge der Anastomosen und den Zeitpunkt der Reperfusion, indem er während der anhepatischen Phase die *suprahepatische V. cava* und die *V. portae* anastomosierte, die Leber reperfundierte und erst danach die *V. cava infrahepatica* wiederherstellte. So verkürzte er die anhepatische Phase von 35-45 auf 25 Minuten, wodurch der extrakorporale Shunt entbehrlich wurde: „*This Shunt was the source of a number of technical problems that included clotting of the shunt, increased blood loss, and prolonged operative time*“ (118).

1979 veröffentlichten *N. Kamada* und *Roy Y. Calne* eine weitere vereinfachte oRLTx-Technik. Sie verzichteten ebenfalls auf die Arterialisierung und den porto-jugulären Shunt. Die *V. portae*, später auch die *infrahepatische V. cava*-Anastomose fertigten sie mit Hilfe eines Polyäthylen-Cuffs (97-99, 172). Dadurch konnte die anhepatische Phase auf 15-17 Minuten verkürzt werden.

Die Implantation des Gallengangs in das Duodenum, wie *S. Lee* sie beschrieben hatte, führte häufig zu ascendierender Cholangitis, Gallengangsnekrosen und zur lokalen Nekrose des Duodenums. Deshalb rekonstruierten sie den Gallengang mit Hilfe zweier Polyäthylen-Cuffs, die sie teleskopartig ineinander schoben. Die bei *Kamadass* oRLTx-Methode gewonnene Verkürzung der Pfortaderabklemmzeit auf sicher weniger als 20 Minuten war von einer hohen Überlebensrate der Empfängertiere gefolgt, die (länger als eine Woche) ca. 83% betrug (97, 98). In Kürze wurde es zu einem populären Modell zur Erforschung von Konservierungsfragen sowie von metabolischen Funktionen der transplantierten Leber und von immunologischen Aspekten der Lebertransplantation (99, 193, 194). In demselben Jahr

fürhte *F. A. Zimmermann* eine weitere Vereinfachung der oRLTx ein; er rekonstruierte den Gallengang mittels eines Teflon-Splints (210).

M. Miyata verwendete die Cuff-Technik auch zur erfolgreichen Anastomosierung der *suprahepatischen V. cava*. So verkürzte er die anhepatische Phase auf 13-14 Minuten. Die 2-Monate-Überlebensrate lag bei 55% (136).

A. Settaf stellte 1986 ebenfalls eine oRLTx-Technik vor, bei der die *suprahepatische V.cava*-Anastomose mittels Cuff wiederhergestellt wurde. Die anhepatische Phase betrug 11 Minuten. Die 2-Monate-Überlebensrate lag bei 70% (172).

S. Tsuchimoto veröffentlichte 1988 eine ähnliche oRLTx-Technik, mit der er eine 100-Tage-Überlebensrate von 71,4% erzielte (199).

R. Engemann beschrieb 1985 ausführlich eine oRLTx-Technik mit Rearterialisierung: Wie *S. Lee* bediente er sich eines abdominellen Spender-Aortensegments, das er End-zu-Seit mit der Empfänger-Aorta anastomosierte. Er verzichtete auf Cuffs, sondern führte alle Gefäßanastomosen in mikrochirurgischer Nahttechnik durch. Den Gallengang rekonstruierte er wie *F. A. Zimmermann* mittels eines Teflon-Splints (47, 98, 210).

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

-*Y. Hasuike* anastomosierte 1988 die Spender-Aorta und die rechte *A. renalis* des Empfängertieres mittels Cuff-Technik (76)

-*R. Steffen* anastomosierte den Spender-*Truncus coeliacus* und die Empfänger-*A. hepatica communis* unter Verwendung eines Cuffs (186)

-*W. Gao* anastomosierte die Spender-*A. hepatica communis* und die Empfänger-*A. hepatica propria* mit Hilfe eines Kunststoffsplints (57).

1.6 Morphologie der Rattenleber

1.6.1 Makroskopische Anatomie

Die Leber ist das größte Organ der Ratte. Bei ein und derselben Rasse und gleicher Ernährung besteht eine gute Korrelation zwischen dem Gewicht der Ratte und dem der Leber; bei der Lewis-Ratte beträgt das Lebergewicht ca. 3% des Körpergewichts (121, 166).

Der gesamte subdiaphragmatische Raum wird von der Leber eingenommen, die sich aus vier Lappen zusammensetzt; ventral liegen der *Lobus medianus* und der *Lobus lateralis sinister*. Weiter dorsal befinden sich der *Lobus lateralis dexter* und der *Lobus caudatus*. Diese 4 Lappen stehen über eine parenchymatöse Achse um die *V. cava inferior* herum miteinander in Verbindung. Der trapezförmige *Lobus medianus* wird durch die *Fissura umbilicalis* in einen linken und rechten Anteil unterteilt. Dort setzt auch das *Lig. falciforme* an, das Aufhängeband des *Lobus medianus*, das eine Verbindung zum Diaphragma herstellt. Der rhombenförmige *Lobus lateralis sinister* wird teilweise vom *Lobus medianus* bedeckt und verdeckt seinerseits den *Lobus caudatus*. Der *Lobus lateralis dexter* wird durch eine tiefe frontale Fissur in zwei gleiche, pyramidenförmige (ventrale und dorsale) Anteile unterteilt. Der *Lobus caudatus* wird ebenfalls durch eine tiefe frontale Fissur in zwei Anteile gegliedert, zwischen denen der Ösophagus verläuft.

Wie beim Menschen erlaubt die portale Aufteilung eine Differenzierung der Leber in 8 Segmente. Unter Verwendung der Nomenklatur von *Couinaud* sieht diese funktionelle Gliederung folgendermaßen aus (*Abb. 8*) (170).

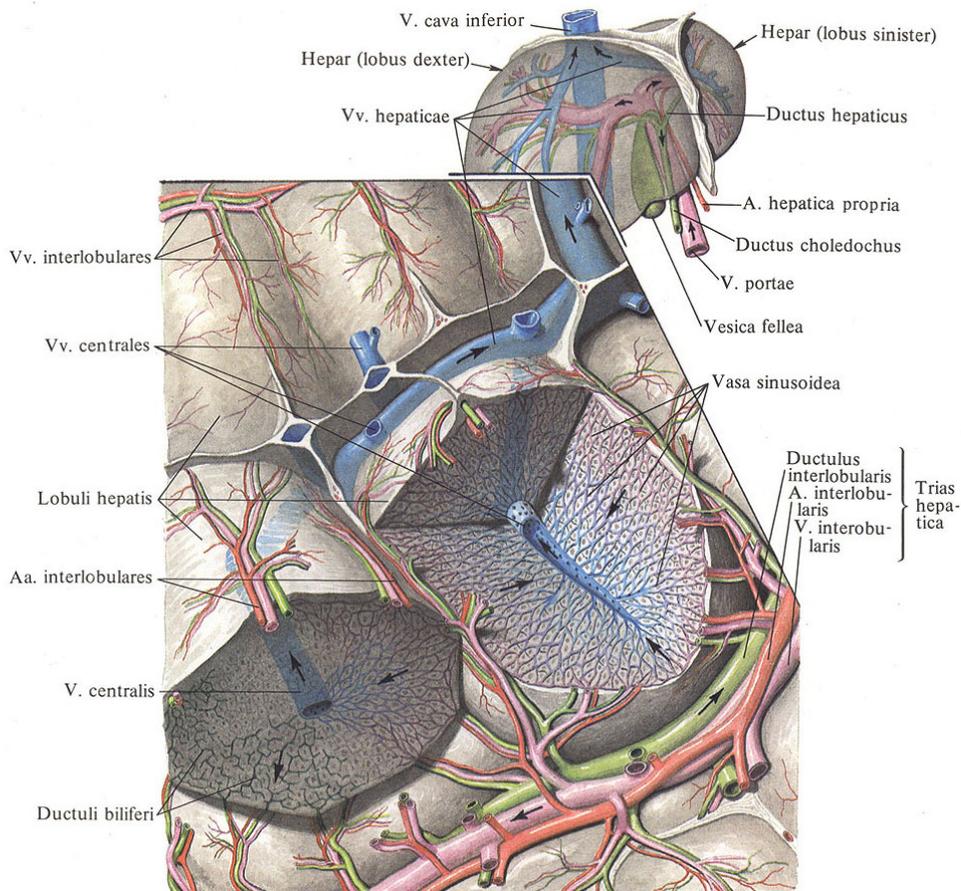


Abb. 8. Mikroskopische Anatomie der Leber (*Anatomie*, Verlag „Medizina“ 1978, UdSSR).

Die *A. hepatica communis* stammt aus dem *Truncus coeliacus*, verläuft in der *Pars vasculosa* des *Lig. hepatoduodenale*, gibt die *A. gastroduodenalis* ab und schließt sich als *A. hepatica propria* der *V. portae* an. Beide ziehen zusammen zur Leberpforte. Die *V. portae* verläuft im *Lig. hepatoduodenale* am weitesten dorsal; auf halber Strecke findet die *V. gastroduodenalis* Anschluß. Die *V. portae* übernimmt mit 70-80% den Hauptanteil des hepatischen Blutflusses, die *A. hepatica propria* liefert 20-30% (169, 170).

Die extrahepatisch gelegene Leberpforte endet dort, wo die Gefäß- und Gallengangsabgänge den *Lobus lateralis sinister* erreichen. Der Gallengang, bzw. seine Verzweigungen befinden sich oberflächlich. Die *A. hepatica propria* und ihre Äste liegen zwischen dem Gallengang (bzw. seinen Abgängen). Zusätzlich werden die medialen und dorsalen Anteile des *Lobus lateralis sinister* von der *A. hepatica sinistra* versorgt; sie entspringt aus der *A. gastrica sinistra* und verläuft entlang des Ösophagus; von dort zieht sie zur Dorsalseite des *Lobus lateralis sinister*. Der *Ductus choledochus*, die *A. hepatica* und die *V. portae*, bzw. ihre Abzweigungen, verlaufen stets gemeinsam zu den verschiedenen Lebersegmenten.

Dagegen zeigen die Lebervenen eine eigene Aufteilung; die untere Gruppe besteht aus 4 Venen (aus dem *Lobus lateralis dexter* und *Lobus caudatus*), die direkt in die *intrahepatische V. cava inferior* münden. Die obere Gruppe besteht aus 3 großen Venen (*V. suprahepatica dextra*, *V. sagitalis* und *V. suprahepatica sinistra* aus dem *Lobus medianus* und dem *Lobus lateralis sinister*), die in die *suprahepatische V. cava inferior* – direkt unter deren Durchtritt durch das Diaphragma – münden.

Das *Lig. hepatoduodenale* besteht aus der transparenten bindegewebigen *Pars flaccida*, die den Eingang des *Foramen bursae omentalis* bedeckt, und aus der *Pars vasculosa*; in ihr verläuft der *Ductus choledochus* als oberflächliches Element. Er ist von lockerem Bindegewebe, in seinem distalen Anteil von reichlich durchblutetem Pankreasgewebe umgeben und mündet ca. 5-8 mm vom *Pylorus* entfernt in das *Duodenum*.

Das Pankreas ist kein individualisiertes Organ. Die Läppchen liegen verstreut im Mesoduodenum; ihre 15-20 Gänge münden in den Gallengang.

Die Rattenleber besitzt keine Gallenblase (166).

1.6.2 Mikroskopische Anatomie

Die Leber ist von einer dünnen Bindegewebskapsel, der *Glisson'schen* Kapsel, umgeben. Ihre Ausläufer strahlen als interlobuläres Bindegewebe in das Leberinnere ein, gliedern das Parenchym in Läppchen und umschließen die Gefäße der *Glisson'schen Trias*: Die *Aa. interlobulares*, die *Vv. interlobulares* und die interlobulären Gallengänge. Insgesamt ist der Bindegewebsanteil der Leber, insbesondere der Rattenleber, sehr gering.

Es gibt drei Konzepte zur Strukturierung des Leberparenchyms: Das Leberläppchen, das Portalläppchen und den Leberazinus.

Das Leberläppchen zeigt im histologischen Schnitt ein annähernd 6-eckiges Anschnittsprofil um einer Zentralvene. Die periportalen Felder zwischen jeweils 3 oder 4 Läppchen enthalten die Gefäße der *Glisson'sche Trias*. In den Läppchen befinden sich Leberzellplatten, bestehend aus 1 bis maximal 2 Hepatozytenlagen, die miteinander zusammenhängen, ein dreidimensionales Gerüst ergeben und radiär von der Zentralvene nach außen strahlen. Zwischen ihnen liegen die Lebersinusoiden, welche die Zentralvene mit den Endverzweigungen der *A. hepatica propria* und der *V. portae* verbinden. Die Wand der Sinusoide und die Leberzellen werden durch den flüssigkeitsgefüllten *Disse'schen* Raum voneinander getrennt. Die Sinusoide anastomosieren miteinander durch Öffnungen in den Leberzellplatten. Die Grenzplatte schließt das Leberläppchen gegen das interlobuläre Bindegewebe ab und läßt nur sehr enge Öffnungen für den Durchtritt der terminalen Gefäße frei. Dieses Zentralvenenläppchen gilt als das klassische Leberläppchen. Es wird vor allem als anatomische Einheit gesehen. Bei der Ratte ist die Läppchengliederung der Leber wegen der geringen Bindegewebsbildung nicht so deutlich zu erkennen.

Die Gliederung der Leber in Portalvenenläppchen begründet sich mehr auf funktionelle Zusammenhänge. Das Portalvenenläppchen ist durch 3 Zentralvenen definiert, die sich um einen zentralen Gallengang gruppieren. Es enthält diejenigen aneinander grenzenden Segmente dreier klassischer Leberläppchen, deren Sekret in den gemeinsamen interlobulären Gallengang fließt. Das Portalvenenläppchen stellt so den Drüsencharakter der Leber in den Vordergrund.

Die Pfortader und die *A. hepatica propria* gewährleisten eine sehr reiche Blutversorgung der Leber. In der Leberpforte spalten sich diese beiden Hauptäste in große Äste, die, umgeben

von Bindegewebe, in das Lebergewebe ziehen. Während ihres Verlaufs geben sie kleine Seitenäste ab. Der Gallengang passiert ebenfalls die Leberpforte; er entsteht aus zahlreichen kleinen Gallengängen, die zusammen mit den Ästen der Blutgefäße die *Glisson'sche Trias* bilden. Die Endäste der Trias-Gefäße (Terminalgefäße) verlaufen entlang der Grenzen des klassischen Leberläppchens, bzw. in der Azinusachse. Sie spalten kurze Seitenäste ab, die die Grenzplatte durchqueren und in die Sinusoide münden. Die Wand der Seitenäste der Pfortader enthält kontraktile Endothelzellen, die den Zustrom zu den Sinusoiden regulieren. Die meisten Äste der Leberarterie formen innerhalb der Trias einen Kapillarplexus um die Gallengänge, der somit vor allem für die Versorgung des Bindegewebsgerüsts und der Gallengänge zuständig ist. Diejenigen Endäste der Leberarterie, die keinen Plexus bilden, münden in die Seitenzweige der Pfortaderäste oder direkt in die Sinusoide. Die Sinusoide strahlen radiär in die Zentralvene ein; diese zieht durch das Läppchenzentrum und stößt am Außenrand des Läppchens senkrecht auf eine Schaltvene, die ohne Beziehung zur Trias entlang der Läppchenbasis verlaufen und sich über Sammelvenen zu den Lebervenen vereinigen.

Das Gallenganssystem beginnt mit intralobulären Gallenkapillaren. Sie liegen zwischen zwei benachbarten Leberzellen und gestalten ein dreidimensionales Netz, das sich um die Leberzellen legt. Die Wand der Kapillaren wird von den Oberflächen der angrenzenden Leberzellen gebildet. Die Schaltstücke, sehr kurze und enge Kanälchen, führen die Galle aus den Kapillaren in die *Hering-Kanäle*, die an den Randbegrenzungen der klassischen Leberläppchen, bzw. in der Achse des Leberazinus in Begleitung der terminalen Leberarterien und Pfortader liegen. Ihre Wände werden von isoprismatischem Epithel ausgekleidet. Sie leiten die Galle an den Ecken des Leberläppchen in die interlobulären Gallengänge der *Glisson'schen Trias*. Das typische Epithel der Schaltstücke und der *Hering-Kanäle* kann durch Zellteilungen auswuchern, z.B. bei Verschlüssen der großen Gallengänge außerhalb des Lebergewebes.

Das Lebergewebe setzt sich zu etwa 80% aus Parenchymzellen, zu 16% aus Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES), den Kupffer-Zellen und Endothelzellen, sowie zu 4% aus sonstigen Zellelementen zusammen.

Die Hepatozyten sind 20-30 μm \varnothing sechseckige Zellen, die entweder an den *Disse'schen* Raum, an eine benachbarte Leberzelle oder an das Lumen einer Gallenkapillare grenzen.

Untereinander sind Hepatozyten durch zahlreiche Haftkomplexe miteinander verbunden; insbesondere kommen verhältnismäßig viele „*gap junctions*“ vor.

Die *Kupffer-Zellen* sind Bestandteile des retikuloendothelialen Systems (RES); sie stammen von Monozyten ab, die mit dem Blut in die Leber gelangen; dort sind sie oft an strategischen Punkten des sinusoidalen Lumens, z.B. an Verzweigungen und Einmündungen, mittels ihrer Podien ausgespannt. Sie besitzen einen großen, ovalen und relativ chromatinarmen Kern, der oft eine Hervorbuchtung ins Gefäßlumen zeigt. Ihr Zytoplasma enthält häufig Anzeichen von Phagozytose in Form von Fetttropfen, Gallepigment und eisenhaltigen Körnchen. Die *Kupffer-Zellen* befinden sich auf dem Endothel, ohne besondere Kontaktstrukturen mit ihm zu bilden. Ihre langen Fortsätze erstrecken sich auf das Endothel der gleichen, aber auch der gegenüberliegenden Seite der Sinusoidalwand. *Kupffer-Zellen* zeichnen sich durch Organellenreichtum, besonders durch Peroxisomen, und eine hohe Peroxidaseaktivität aus.

Subendothelial im *Disse'schen* Raum befinden sich einige fett-speichernde *Ito-Zellen*. Diese können nach Differenzierung in Fibroblasten im chronisch geschädigten Lebergewebe die Fähigkeit zur Synthese von Bindegewebe erlangen und somit eine bedeutsame Rolle bei der bindegewebigen Umbildung des Organs spielen. Denkbar ist auch eine Beteiligung am Vitami-A-Stoffwechsel, weil *Ito-Zellen* dieses speichern.

In das Endothel der Sinusoide sind noch *Pit-Zellen* eingelagert, mit unbekanntem, möglicherweise endokrinen oder immunologischen Funktionen.

Der *Disse'sche* Raum trennt die Endothelzellen von der Oberfläche der Hepatozyten. In ihm findet man intralobuläres Retikulengeflecht, einige wenige Fibroblasten und vereinzelt fett-speichernde *Ito-Zellen*. Das aus den Sinusoiden austretende Plasma kann sich im *Disse'schen* Raum frei verteilen; der unmittelbare Kontakt mit der mit Mikrovilli ausgestatteten Leberzelloberfläche erleichtert den Substanz-austausch.

Im periportalen Bindegewebe kommen bei der Ratte relativ oft kleine Rundzellherde vor. Diese Zellen gehören dem lymphatischen Gewebe an. Falls sich zusätzlich leukozytäre Elemente darin finden, liegt ein pathologischer Zustand vor (60, 96, 170).

1.7 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die orthotope Lebertransplantation stellt dank der Optimierung chirurgischer Technik und Verfügbarkeit neuer Immunsuppressiva ein Routineverfahren mit akzeptablem Langzeiterfolg dar. Trotz dieser Entwicklung in der Transplantationschirurgie kommt es bei einem Teil der lebertransplantierten Patienten zu einer oder mehreren Abstoßungsreaktionen, die mit einer drastischen Erhöhung der Immunsuppression therapiert werden müssen, um den immunologischen Transplantatverlust zu verhindern. Die Kenntnis dieser immunologischen Pathomechanismen, die zur Abstoßung der Organtransplantate führen, könnten transplantatprotektive diagnostische und therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen.

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde die Rolle von Stickoxid (NO) nach orthotoper Lebertransplantation im Rattenmodell (oRLTx) untersucht. Wie bereits in Herz- und Lungentransplantationsmodellen gezeigt wurde, ist eine akute Abstoßung mit einem simultanen Anstieg von NO (reflektiert durch die stabilen Endprodukte im Serum $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ in μM) assoziiert (205, 206). Darüberhinaus wurde bei Rattenlebertransplantatabstoßung mittels *in situ*-Hybridisierung eine hochregulierte iNOS-Genexpression sowohl in den infiltrierenden Leukozyten als auch in den Hepatozyten beobachtet (110). Daher war das Ziel dieser tierexperimentellen Studie die Rolle von NO-Antagonisten nach oRLTx zu charakterisieren. Es wurde postuliert, daß sich eine Reduzierung von NO bei Empfängertieren protektiv im Sinne einer signifikant längeren Transplantatüberlebenszeit auswirken könnte.

2. Material und Methode

2.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden ingezüchtete männliche Lewis-(RT¹) und DA-Ratten (RT₁^{av1}) (Carles-River Wiga GmbH, Sulzfeld, BRD) verwendet. Es handelt sich um Tiere aus Inzuchtstämmen, für deren Aufbau 10-50 Jahre kontrollierter Zuchtarbeit erforderlich sind. Über mindestens 20 Generationen muß in engster Verwandtschaftspaarung ein Zuchtkern fortgeführt werden, bei dem die Weiterführung zur nächsten Generation für die ganze Population jeweils auf einem einzigen Bruder-Schwester-Paar beruht. Durch regelmäßige Kontrollen an vielen verschiedenen Genorten wird gesichert, daß es sich tatsächlich um genetisch identische Tiere handelt.

Das Gewicht der Tiere betrug 180-200 g, wobei das Gewicht der Empfängertiere um ca. 10-20 g höher lag als das der Spendertiere; dadurch wurde die Lebertransplantation operativ-technisch erleichtert.

Die Tiere wurden einzeln in Macrolonkäfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, BRD) auf Einstreu und bei einer Raumtemperatur von 19-24 °C sowie einem Beleuchtungsintervall von 6.00 bis 18.00 Uhr im Tierstall des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung (TU München, Klinikum Rechts der Isar) gehalten. Sie erhielten Wasser und eine Haltungsdiät (Pressfutter, Altromin 1324 Standarddiät, Lage, BRD) jeweils *ad libitum*.

2.2 Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche waren gemäß Tierschutzgesetzes von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern, München) unter dem Aktenzeichen 211-2531-1/96 zuvor genehmigt worden.

2.3 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 5 Versuchsgruppen gebildet (*Tab. 4*). Dabei wurden nur solche Tiere in die Auswertung eingezogen, die folgende Überlebenskriterien erfüllten: keine intraoperativen

Komplikationen, anhepatische Phase unter 20 min, Gesamt-Anästhesie- und Operationsdauer unter 1,5 Stunden und intraoperativer Blutverlust unter 1,0 ml.

Gruppe I	syngene Kontrolle	(n=12)	DA → DA
Gruppe II	allogene Kontrolle	(n=11)	DA → LEW
Gruppe III	allogen mit Immunsuppression (FK506) ¹	(n=12)	DA → LEW
Gruppe IV	allogen mit subtherapeutischer Immunsuppression (FK506) ² und AGH-Substitution ³	(n=13)	DA → LEW
Gruppe V	allogen mit AGH-Substitution ³	(n=11)	DA → LEW

¹FK506 *high dose* (Tacrolimus, Prograf;[®] Applikation *post-transplantationem* 1 mg/kg KG/d, *subcutan*)

²FK506 *low dose* (Tacrolimus, Prograf;[®] Applikation *post-transplantationem* 0,01-0,03 mg/kg KG/d, *subcutan*)

³AGH (Aminoguanidinhydrochlorid, 1% 3 ml/d *prae-* (-7 Tage) und *post-transplantationem*, *per os*)

Tab. 4. Zusammenfassung der Versuchsgruppen (Gr. I-V).

Das experimentelle Studienprotokoll sah folgendermaßen aus:

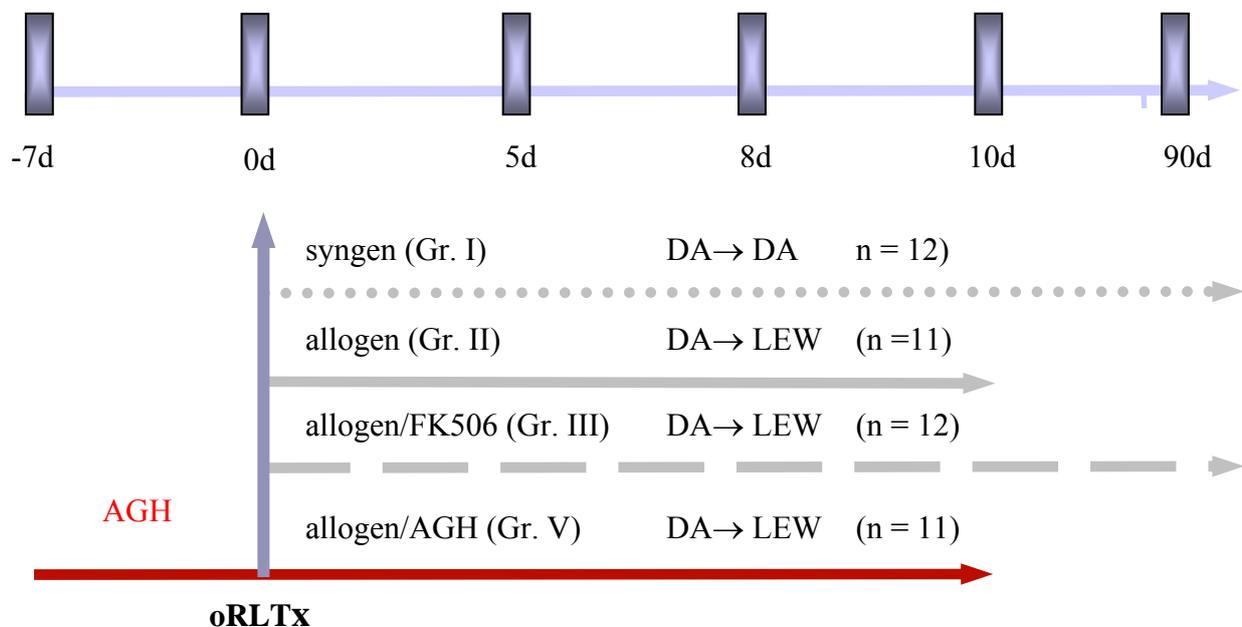


Abb. 9. Das experimentelle Studienprotokoll (Gruppe IV analog zur Gruppe V).

Die Empfängertiere (*ET*) in den Gruppen IV und V erhielten täglich (angefangen am 7 Tag vor der Transplantation) 3 ml 1% AGH *per os* (Aldrich Chemical Company, Inc., USA).

Während der Explantation wurden die Lebern *in situ* mit 50 ml eisgekühlter (4°C) Ringer-Lösung (Delta Pharma[®], BRD) über das infrarenale Aortensegment mit einem Druck von 100 mm Hg perfundiert (Dauertropfperfusion) (53). Dadurch wurde eine simultane arteriell-venöse Perfusion (*via Truncus coeliacus* und *Vena portae*) erreicht. Nach 1-stündiger kalter Lagerung in derselben Lösung wurden die Lebern orthotop transplantiert (*s. unter 2.4*).

Am 5., 8. und 10. postoperativen Tag wurden die *ET* sakrifiziert und Blut zur Bestimmung von Leberfunktionsparameter und NO-Spiegel sowie Biopsien zur histologischen Aufarbeitung entnommen (*s. unter 2.6., 2.7.3., 2.7.4*).

2.4 Chirurgisches Vorgehen

2.4.1 Operationsvorbereitung und Anästhesie

Präoperativ mußten die Tiere eine 8-stündige Nahrungskarenz einhalten. Vor der Transplantation kam dem Ausschluß von Bronchopneumonien große Bedeutung zu. Diese häufigsten Infektionen in der Rattenzucht können die Widerstandsfähigkeit der Tiere gegenüber dem atemdepressorisch wirkenden und atemwegsreizenden Äther soweit herabsetzen, daß es schon bei niedrigen Dosierungen zu unverhältnismäßig tiefen Narkosen oder sogar zum Atemstillstand kommen kann. Symptome dieser Pneumonie sind deutlich hörbare Rasselgeräusche. Bei der Sektion erkrankter Tiere fanden sich ausgedehnte Lungenabszesse und Atelektasen. Tiere in schlechem Allgemeinzustand wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

Der operative Eingriff, die Blutentnahmen und Sektionen wurden unter Äther-Inhalationsnarkose durchgeführt; diese Narkose ist besonders in der anhepatischen Phase der Empfänger-Operation gut steuerbar. Weitere Vorteile des Äthers sind die große therapeutische Breite und das schnelle Aufwachen der Tiere nach der Operation.

Für Narkosezwecke sollte Äther nur in gereinigter Form als „*Aether pro narcosi*“[®] (Riedel-de Haen GmbH, Seelze, BRD) in dunklen Flaschen, die kühl und lichtgeschützt gelagert

werden, Verwendung finden. Licht, Luft und Wärme führen zu Verunreinigungen des ansonsten recht inerten Äthers durch Zersetzungsprodukte (Säuren, Peroxide, Aldehyde).

Die klassische Äthernarkose führt die reversible Ausschaltung von Bewußtsein und Schmerzempfindung, eine Herabsetzung des Schutz- bzw. Abwehrreflexe, eine Muskelrelaxation und anterograde Amnesie herbei.

Die traditionellen vier Narkosestadien, die für Äthernarkose beschrieben sind (Analgesie, Exzitation, Toleranzstadium und Asphyxie), lassen sich auch bei der Anwendung dieser Narkose bei der Ratte beobachten. Die Narkosetiefe läßt sich durch Beobachtung der Atmung und des Muskeltonus bestimmen. So ist die Atmung im Analgesie- und Exzitationsstadium beschleunigt und unregelmäßig, während der Muskeltonus und das Reflexniveau gesteigert sind. Im Toleranzstadium wird die Atmung ruhiger und regelmäßiger, die Muskulatur erschlafft und die Muskelreflexe erlöschen.

Prämedikationen sind bei der Äthernarkose der Ratte überflüssig. Die Narkose wird *per inhalationem* in einem Narkosegefäß aus Glas eigeleitet, auf dessen Boden mit Äther getränkte Mullkompressen plaziert sind. Nach Verlust der Stellreflexe kann die Ratte aus dem Glasgefäß genommen werden. Die Narkose wird in einem *offenen System* mit einer Nasenmaske aufrecht erhalten. Die Nasenmaske wird aus einer Perfusorspritze hergestellt, aus der der Kolben entfernt wird. Die ersten zwei Drittel werden mit Mulltupfern gefüllt und diese nach Bedarf mit Äther getränkt. Die offene Seite der Spritze wird vor der Rattennase plaziert. Die Narkosetiefe läßt sich durch Konzentrationsänderung des Äthers regulieren. Ein Nachteil der Äthernarkose ist die starke Bronchialsekretion; die Vorteile - große therapeutische Breite, einfache Handhabung und gute Steuerbarkeit sowie ein schnelles postoperatives Aufwachen der Tiere – überwiegen jedoch (65, 121).

2.4.2 Operationstechnik

Die Operationen wurden als *arterialisierte orthotope Rattenlebertransplantationen (oRLTx)* mit mikrochirurgischer Nahttechnik, modifiziert nach dem Modell von *Engemann und Steffen* durchgeführt (47, 186).

2.4.2.1 Präparationsphase der Spenderoperation

Zu Beginn wurde die Bauchhaut rasiert und desinfiziert. Nach medianer Laparotomie von der *Symphyse* bis zum *Xyphoid* wurde der Situs mittels vierer Haltehacken exponiert und in dieser Lage fixiert. Das *Xyphoid* wurde mit Hilfe einer Fixationsnaht nach kranial gezogen und fixiert.

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

Zur Präparation des *Lig. hepatoduodenale* wurden der *Lobus medianus* der Leber nach kranial geklappt; anschließend wurde das Darmkonvolut in eine feuchte Mullkomresse eingeschlagen und nach links gelagert. Zunächst wurde die *V. gastroduodenalis* doppelt ligiert und abgesetzt, dann die *V. portae* zwischen der Einmündung der *V. lienalis* und der Leberpforte stumpf vom Bindegewebe freipräpariert (23). Es folgte nun die zweifache Ligatur und Durchtrennung der *A. gastroduodenalis* und die leberferne Ligatur und Durchtrennung des *Ductus choledochus*. Unter leichtem Zug am Ligaturfaden wurde nun der *Ductus choledochus* querinzidiert, ein an den Enden angeschrägter Gallengangssplint von 8 mm Länge (22-G, Vasculon[®] Plus, Ohmeda AB, Helsingborg, Schweden) in das Lumen eingeführt und mit einer monofilen Ligatur (7/0 Ethilon schwarz monofil, Ethicon GmbH, Norderstedt, BRD) in seiner Position fixiert. Wichtig ist es, daß der Splint nicht zu weit in den Leberhilus hineingeschoben wird, so daß eine Drainage aller sich im Hilus zum *Ductus choledochus* vereinigenden Gallengänge gewährleistet ist.

Der infrahepatische Verlauf der *V. cava* wurde oberhalb der Einmündung der rechten *V. renalis* isoliert und die rechte *V. suprarenalis* sowie die benachbarte Lumbalvene gemeinsam cavanah ligiert. Durch kurzzeitiges, linksseitiges Verlagern der Leber konnten Leber und suprahepatische *V. cava* von dorsal eingesehen und von Retroperitoneum und Diaphragma abgelöst werden.

Nach stumpfem Spalten des Retroperitonealraumes folgte zunächst die Freilegung der rechten Gefäßseite des Aortensegmentes vom Zwerchfelldurchtritt bis zur Bifurkation. Unter Erhaltung der rechten *A. renalis* wurden alle rechtseitig entspringenden Arterien ligiert und durchtrennt. Danach wurde die Bauchaorta von der linken Seite her freigelegt: Der *Truncus coeliacus*, die *A. mesenterica superior* und die linke *A. renalis* wurden aufgesucht und weitere

linksseitige Aortenäste nach Ligatur durchtrennt. Zur Präparation des *Truncus coeliacus* wurde das Darmkonvolut nun nach rechts gelagert. Zwischen dem *Truncus coeliacus* und der *A. mesenterica superior* liegt eine derbe Bindegewebsplatte. Diese wurde direkt am *Truncus coeliacus* durchtrennt und der *Truncus coeliacus* von seinem Abgang aus der Aorta bis zu seiner Trifurkation freigelegt, woraufhin die *A. gastrica sinistra* und die *A. lienalis* doppelt ligiert und abgesetzt wurden. Nach Zurückverlagerung des Darmkonvoluts konnte der Verlauf der *A. hepatica* bis zur Leberpforte dargestellt werden. Zur vollständigen Isolierung des abdominellen Aortensegments wurden die die Aorta abdominalis überkreuzende *V. renalis sinistra* sowie beide Nierenarterien doppelt ligiert und durchtrennt. Mittels eines Mikrogefäßclips (Mehdorn-Bierner-Gefäßclip, Aesculap AG&Co KG, Tutlingen, BRD) wurde die Aortenbifurkation abgeklemmt.

2.4.2.2 Perfusionsphase und Organkonservierung

Zur Beginn der Perfusionsphase der Spenderoperation wurde zunächst ein Mikrogefäßclip oberhalb des *Truncus coeliacus* angebracht. Mit einer bifurkationsnahen Punktion der *Aorta abdominalis* und Einführen eines Perfusionskatheters (14-G, Venflon® 2, ABOC Health Care Company, Helsingborg, Schweden) begann die Auswaschperfusion mit der auf 4°C gekühlten Perfusionslösung. Der Perfusionsdruck lag bei 100 mm Hg, der dem physiologischen Aortendruck der Ratte entspricht (53). Es wurden 50 ml der Ringer-Lösung perfundiert, was dem zur Äquilibration erforderlichen 6-fachen Organgewicht entspricht (84). Um den Blut- und Perfusatabfluß zu ermöglichen, mußte unmittelbar zu Beginn der Perfusion über eine Zwerchfellinzision die *suparhepatische V. cava* durchtrennt werden. 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 Nierenveneneinmündung und nach Absetzen der rechten *V. suprarenalis* sowie der proximalen Pfortader wurde die simultane portale Perfusion beendet und die Pfortader an der Inzisionsstelle vollständig abgesetzt. Die Aorta wurde dicht 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 ca. 45-60 min lang in einem auf 4°C gekühlten Konservierungsbad gelagert (193, 194).

2.4.2.3 Präparationsphase ex situ

In der Präparationsphase wurden an der *V. portae* (14-G, Venflon® 2, ABOC Health Care Company, Helsingborg, Schweden) sowie *infrahepatische V. cava inferior* (12-G, Vygonület® Teflon, Aachen, BRD) in Cuff-Technik jeweils ein Cuff angebracht und in dieser Position fixiert (Abb. 10-a, -b, -c, 11) (136, 186).

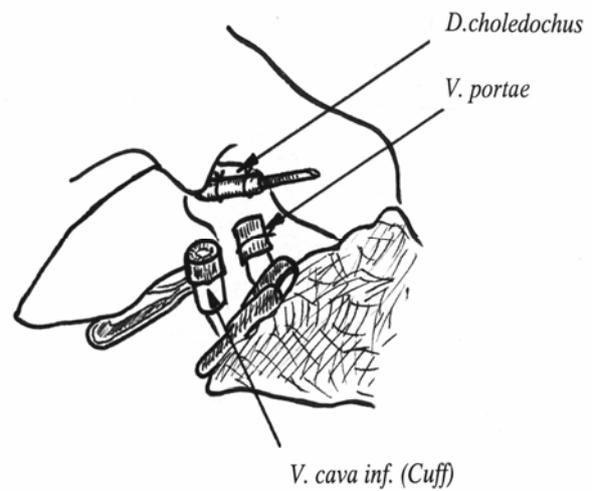
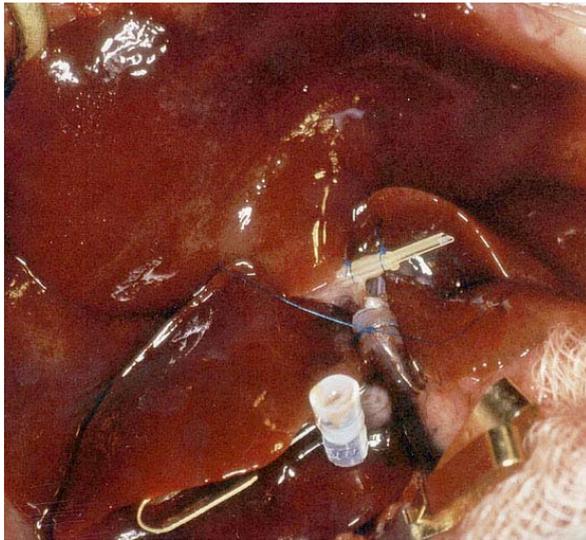


Abb.10-a. Darstellung der Pfortaderanastomose in Cuff-Technik.

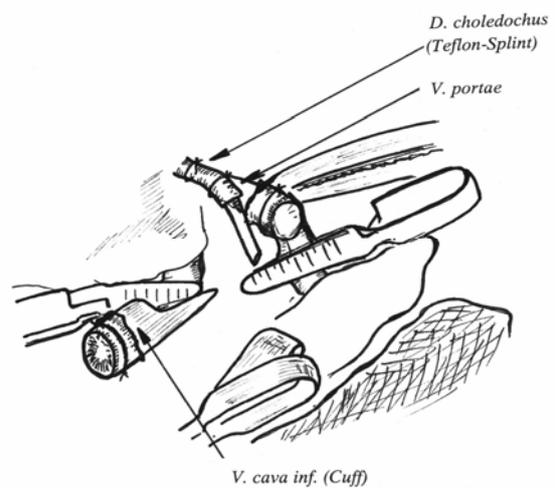
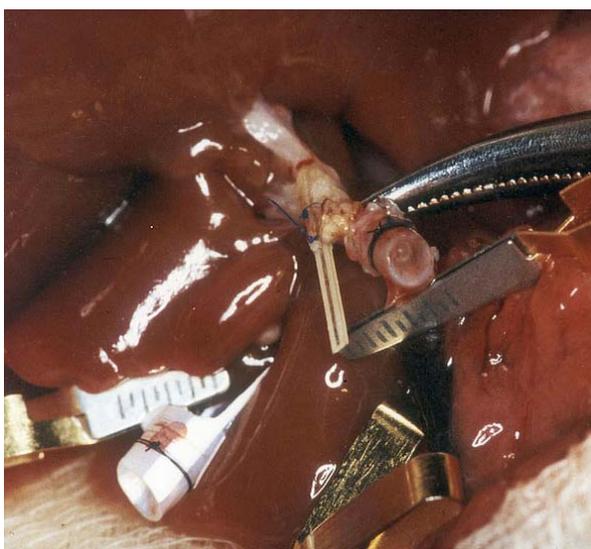


Abb.10-b. Pfortaderanastomose vor Reperfusion.

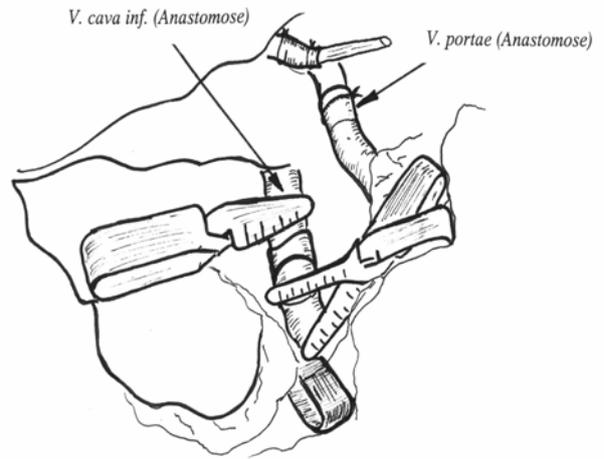
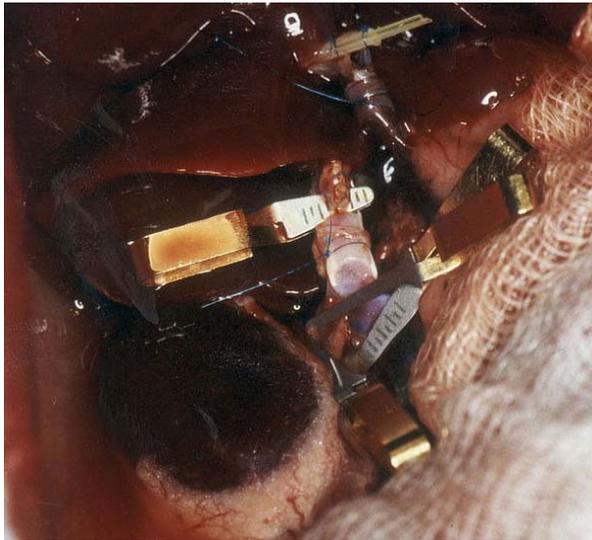


Abb.10-c. Darstellung der V. cava inf.-Anastomose in Cuff-Technik.

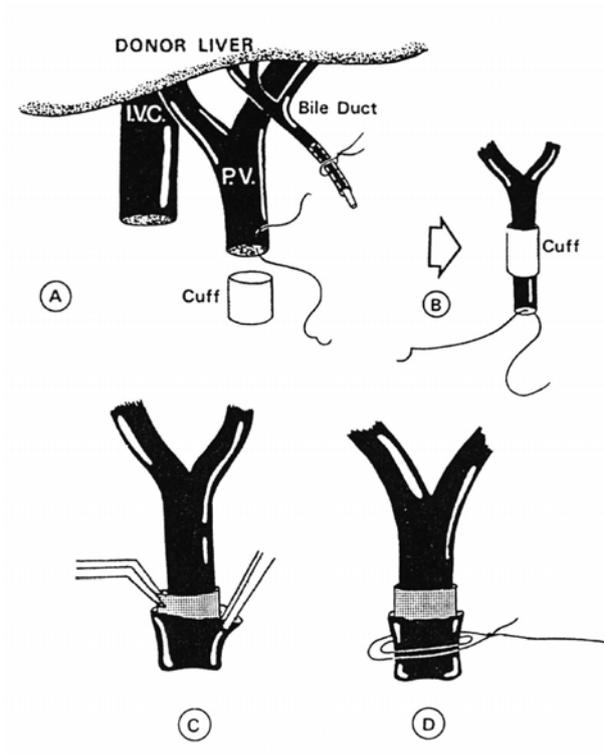
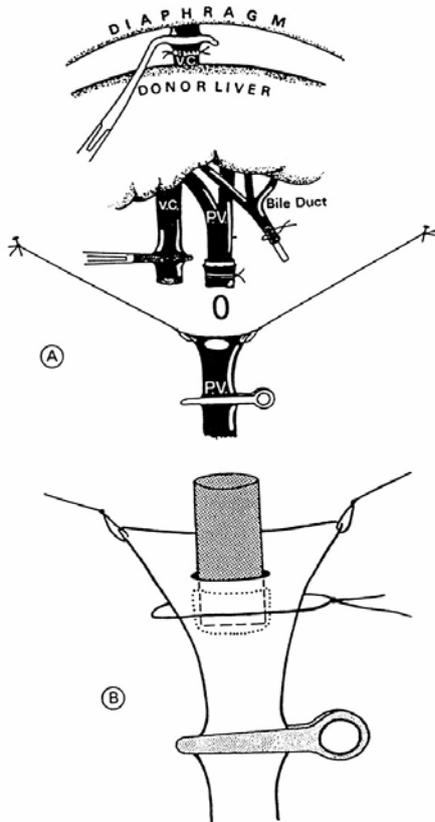


Abb.11. Schematische Darstellung der Cuff-Technik.

2.4.2.4 Präparationsphase der Empfängeroperation

Nach Rasieren und Desinfizieren der Bauchhaut erfolgte die Eröffnung des Abdomens durch eine mediane Laparotomie von der *Symphyse* bis zum *Xyphoid*. Die Bauchhöhle wurde mit Hilfe von 4 Bauchdeckenhacken aufgespannt. Wie bei der Spenderoperation wurde das *Xyphoid* nach kranial fixiert.

Die Hepatektomie des Empfängertieres erfolgte weitgehend analog den entsprechenden Präparationsschritten beim Spender, so daß im folgenden nur Abweichungen beschrieben werden: Die linke *V. phrenica*, 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 zuerst 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 an der zwerchfellnahen *suprahepatischen V. cava* angebrachte Gefäßklemme (Satinsky-Klemme) geschlossen.

Nach Verschuß der *V. portae* mittels eines Mikrogefäßclips begann die kritische anhepatische Phase, die einen Zeitraum von 20 Minuten nicht überschritten hat.

2.4.2.5 Explantation der Eigenleber

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

Vor Einbringen des Transplantates wurde eine feuchte, gekühlte Mullkomresse in das Leberbett eingelegt. Anschließend wurde die zu transplantierende Leber aus dem Konservierungsbad gehoben und orthotop im Empfängersitus plaziert.

2.4.2.6 Anastomosierung der suprahepatischen V. cava

Zunächst wurden zwischen der zu anastomosierenden *suprahepatischen V. cava* der Spender- und Empfängertiere diagonal zwei Eckfäden (9/0 Ethilon) angelegt und verknotet, so daß ein kleiner Kreisbogen von der Hinterwand gebildet wurde. Anschließend wurde die Hinterwand der *suprahepatischen V. cava* fortlaufend von innen genäht. Bei Erreichen der gegenüberliegenden Ecknaht wurde dieser Faden nun am zwerchfellseitigen Stumpf nach außen durchgestochen, mit dem zweiten Eckfaden verknotet und anschließend für die Naht der Vorderwand verwendet. Um Luftbläschen zu eliminieren und dadurch eine Luftembolie zu vermeiden, wurde vor Vervollständigung der Anastomose das Gefäßlumen mit isotoner Kochsalzlösung gespült (NaCl 0,9%).

2.4.2.7 Anastomosierung der V. portae und der infrahepatischen V. cava

Nach Entfernung der Mullkomresse und Hochlagern des *Lobus medianus* und des *Lobus lateralis sinister* ließ sich die Leberpforte darstellen. Die Pfortader des Spenderorgans mit einem zuvor angebrachten Cuff wurde von der Pfortader des Empfängertieres in Cuff-Technik anastomosiert und mit einer Ligatur (7/0 Ethilon) fixiert (*Abb. 10-a, b*) (26, 186).

Sofort nach Fertigstellung der Pfortaderanastomose erfolgte die Reperfusion des Transplantates durch Abnehmen des Gefäßmikroclips und der Satinsky-Klemme an der *suprahepatischen V. cava*, so daß die Blutstauung in den unpaarigen Bauchorganen aufgehoben wurde. Die kritische anhepatische Phase war nun beendet.

Die Anastomosierung der *infrahepatischen V. cava* erfolgte in einer zur Pfortaderanastomosierung analogen Cuff-Technik (*Abb. 10-c*) (186, 199).

2.4.2.8 Arterialisierung der Leber

Zur Rearterialisierung des Transplantates wurde das Aorten-patch der Spenderleber in Cuff-Technik an die *A. hepatica communis* (20-G, Venflon[®] 2, ABOC Health Care Company, Helsingborg, Schweden) des Empfängertieres angebracht und in dieser Position mit einem monofilen Faden (7/0 Ethilon) fixiert (43, 57, 186, 199).

2.4.2.9 Rekonstruktion des Gallengangs

Im Anschluß an die Reperfusion und Arterialisierung des Transplantats folgte die Rekonstruktion des Gallengangs. Der Gallengang des Empfängertieres wurde quer inzidiert und der durch eine Ligatur im Spender-Gallengang fixierte Splint an seinem freien Ende in den Empfänger-Gallengang eingeführt. Über dem Splint wurden die beiden Gallengangsstümpfe mittels zweier Ligaturen miteinander verbunden und fixiert (7/0 Ethilon) (Abb. 10-a, -b, 12).

Die Empfängeroperation wurde mit mehrmaliger Spülung der Bauchhöhle (Ringer-Lösung) und Verschuß der Bauchdecke in 2 Schichten (Muskel/Faszie und Haut) abgeschlossen (47, 121).

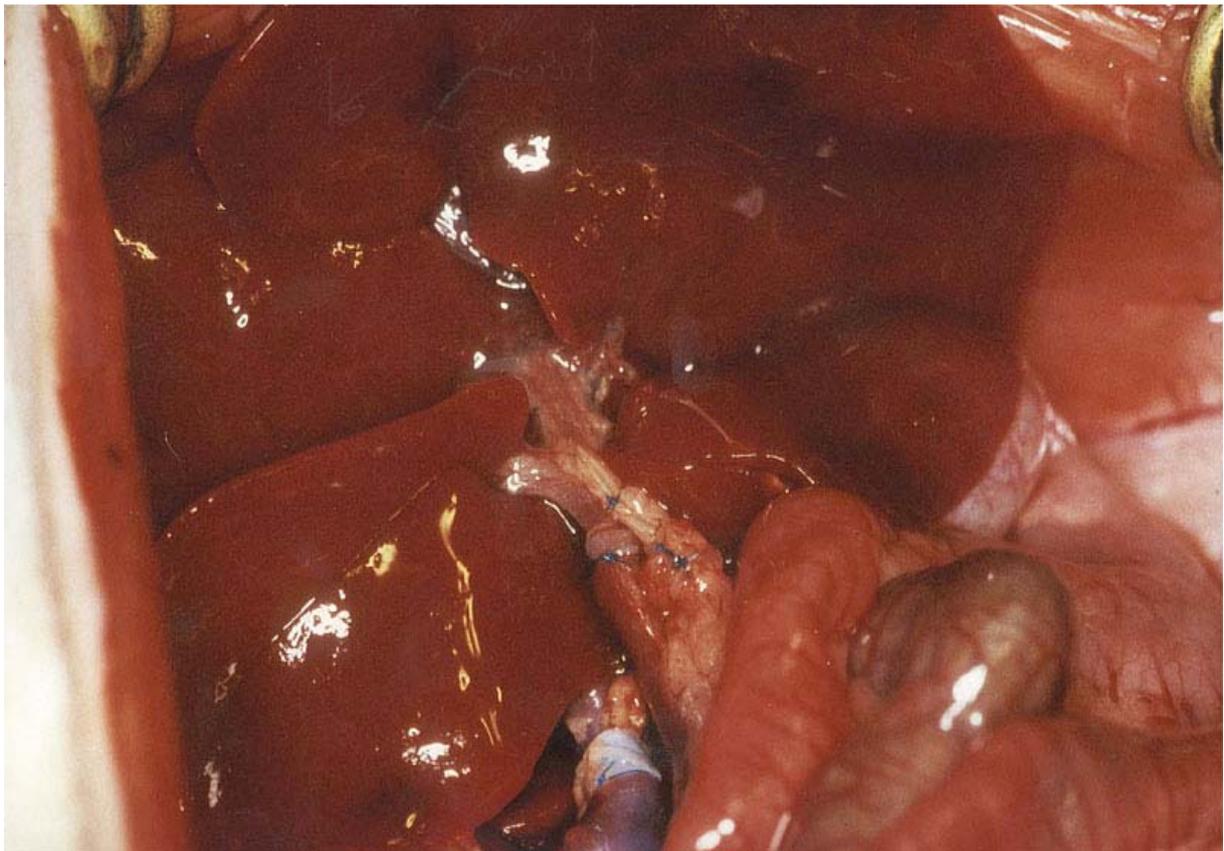


Abb. 12. Der operative situs nach Revaskularisierung des Transplantats und Gallenganganastomose.

2.5 Postoperative Nachsorge

Nach der Operation kamen die Empfängertiere in Einzelkäfige unter Infrarot-Wärmestrahler und hatten sofort Zugang zum Trinkwasser. Die Nahrungskarenz wurde postoperativ nicht fortgesetzt. Die postoperative Beobachtungszeit betrug je nach Gruppe zwischen 5 Tagen und 6 Monaten. Als Parameter für den postoperativen Verlauf wurden das Körpergewicht ermittelt und der Allgemeinzustand der Empfängertiere dokumentiert.

2.6 Sektion

In definierten Zeitabständen (am 5., 8., 10., 30. und 90. postoperativen Tag) wurden Sektionen vorgenommen: Nach Ermittlung des Körpergewichts wurde das venöse Blut zur Bestimmung von Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (ASAT, GOT), Glutamatdehydrogenase (GIDH), Phosphocholinesterase (PChE), alkalischen Phosphatase (AP), Bilirubin und Albumin sowie von Nitrit/Nitrat ($\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$) entnommen und die Tiere durch eine Ätherüberdosis sakrifiziert. Das Plasma wurde bis zur Bestimmung der o.g. Parameter bei -80°C aufbewahrt.

Nach Explantation der Leber wurden Biopsien zur histologischen Aufarbeitung aus dem *Lobus medianus*, *Lobus lateralis sinister* und aus dem Leberhilus entnommen und konserviert.

Das operative Teil dieser Arbeit wurde von einer Person ohne Assistenz durchgeführt.

2.7 Untersuchungsmethoden

2.7.1 Intraoperatives Monitoring

Intraoperativ wurde die Atemfrequenz, Herzfrequenz pro Minute ausgezählt und Körpertemperatur beim Spendertier nach Laparotomie, beim Empfängertier nach Laparotomie und Reperfusion gemessen.

2.7.2 Lebergewicht

Direkt nach Explantation der Leber und nach der kalten Konservierung wurde das Lebergewicht bestimmt: Nach 1-minütiger Abtropfzeit wurde die Leber gewogen (MAUL parcel S-Präzisionswaage, BRD). Das Lebergewicht ergab sich aus dem ermittelten Wert abzüglich dem Gewicht von einem Gefäßmikroclip (an der *infrahepatischen V. cava inferior*) und zweier Cuffs (an der *V. portae* und *infrahepatischen V. cava inferior*).

2.7.3 Leberfunktionsparameter

Serum-ASAT, -GIDH, -AP, -Bilirubin, -Albumin und -PChE wurden bei Spendertieren intraoperativ, bei Empfängertieren am 5., 8., 10., 30. und 90. postoperativen Tag bestimmt. Die Entnahme von ca 500 µl Blut erforderte die Punktion einer Schwanzvene unter einer leichten Ätherinhalationsnarkose. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und die oben genannten Leberfunktionsparameter mit optimierten Standardmethoden der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie im Mikroanalysegerät (Hitachi® 747, Institut für Klinische Chemie, Klinikum rechts der Isar der TU München) photometrisch bestimmt.

Aus dem entnommenen Blut wurden die Referenzbereiche für ASAT, AP, PChE, GIDH, Albumin und Bilirubin ermittelt und in Form von Mittelwert±Standardabweichung des Mittelwerts angegeben.

Die Bestimmung von FK506-Blutspiegel erfolgte mittels eines halbautomatisierten Testverfahrens FK-MEIA (Mikropartikel-Enzym-Immunoassay, ABOT IMX Analysegerät, Institut für Klinische Chemie, Klinikum rechts der Isar der TU München) (50, 52, 69).

2.7.3.1 Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Cytochrom P450 (CYP)-Isoenzyme

Die enzymatischen Aktivitäten der verwendeten Zellsuspensionen aus der explantierten Lebern wurden in Abhängigkeit der Substratspezifität der Cytochrome P450 mit verschiedenen Aktivitätstests wie folgt bestimmt:

- Ethoxy-Resorufin-O-Deethylase-Test (EROD) für CYP 1A1 und CYP 1A2
- Hydroxylierung von Chloroxazon für CYP 2E1

- Lidokain-Test für CYP 3A4.

2.7.4 NO-Messung

2.7.4.1 Direkte Methoden (HPLC-Methode)

Die wohl einfachste Methode zum Nachweis der NO-Synthese ist die alleinige Bestimmung von Nitrit (NO^{2-}) nach der Methode von *Griess* (70). Diese Methode eignet sich allerdings nur zum Nachweis der NO-Synthese unter Zellkulturbedingungen. Dabei wird der Überstand einer Zellkultur mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus 1% Sulfanilamid und 0,1% N-1-Naphthyläthylendiamin, gelöst in 45% Essigsäure, versetzt. Der rotviolette Farbton, der sich bei der Anwesenheit von NO^{2-} entwickelt, kann dann bei einer Wellenlänge von 543 nm gelesen werden.

Die Bestimmung beider Endprodukte Nitrit (NO^{2-}) und Nitrat (NO^{3-}) hat in menschlichen und tierischen Körperflüssigkeiten (z.B. Serum) Bedeutung, da hier das Verhältnis von Nitrit und Nitrat nicht unbedingt konstant ist. Die *HPLC-Methode* (*high performance liquid chromatography*), die in dieser Arbeit zur Anwendung kam, basiert ebenfalls auf der Reaktion nach *Gries* (70). Die zu testende Probe wird nach Entproteinisierung über HPLC-Kadmiumkolonne (Fa. Waters, USA) gegeben, wobei NO^{3-} in NO^{2-} konvertiert wird. Nachfolgend kann dann NO^{2-} nach der *Griess-Reaktion* bestimmt werden (67).

Mit der relativ aufwendigen Methode *elektronenparamagnetischen Resonanz-Spektroskopie* (ERP) können NO-bindende Eisenkomplexe in Geweben und isolierten Zellen nachgewiesen werden (45, 79, 115, 179). NO ist als Radikal in der Lage, spezifische Eisen-Nitrosyl-Komplexe aufzubauen. Einer dieser Komplexe ist Bi-Schwefel-Eisen-Dinitrosyl, mit einem für NO spezifischen Absorptionsmaximum (116).

Eine andere Methode des direkten NO-Nachweises ist die Chemiluminiszenz, bei der Nitrit und Nitrat zu NO reduziert werden, das dann mit Ozon eine meßbare Reaktion eingeht (15). Die Klonierung von induzierbaren (iNOS) (16-18) und konstitutiven (cNOS) NO-Synthasen erlaubt es, die Intensität der mRNA für die NO-bildenden Enzyme *in vivo* und *in vitro* über sogenanntes „*Northern Blotting*“ zu messen (15, 93, 112, 122, 124, 129). Diese molekularbiologische Methode ermöglicht es z.B. den Einfluß verschiedener Zytokine auf die Induktion der iNOS näher zu studieren, wie kürzlich an Rattenhepatozyten gezeigt wurde (59).

Eine weitere Methode besteht im „*Western Blotting*,“ wo Antikörper gegen die NO-Synthase sichtbare Komplexe bilden können (201).

Die letzte direkte Methode ist die Bestimmung der NOS-Enzymaktivität, die hauptsächlich zum Nachweis der iNOS dient: Zytosol aus isolierten Zellen oder Gewebe wird nach konventionellen Methoden extrahiert und dann mit verschiedenen Kofaktoren, die zur Bildung von $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ notwendig sind, inkubiert. Das gebildete $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ wird dann durch die oben beschriebene Methode bestimmt. Diese Methode ist erfolgreich bei der Stimulierung der iNOS in tierischen und humanen Hepatozyten angewendet worden.

2.7.4.2 Indirekte Methoden

Die folgenden Methoden können zum indirekten Nachweis der NO-Bildung dienen, da ihre Effekte durch die Anwesenheit von kompetitiven Inhibitoren teilweise oder ganz rückgängig gemacht werden können. Die NO-abhängige Aktivierung zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) ist ein empfindlicher Marker sowohl der induzierbaren als auch der konstitutiven NOS (28), was in humanen und Rattenhepatozyten demonstriert werden konnte (9). Die Bestimmung von cGMP kann durch kommerziell erhältliche Reaktionskits z.B. in Zellkulturen, einfach durchgeführt werden.

Eine weitere Methode ist der Nachweis des bei der NO-Synthese aus L-Arginin anfallenden L-Citrullins. Radioaktiv markiertes L-Arginin wird zu Zellkulturen gegeben und die Menge entstehenden L-Citrullins gemessen (82, 208). Diese Methode läßt sich in der Leber allerdings nur mit Schwierigkeiten anwenden, da L-Citrullin sofort in den Harnstoffzyklus aufgenommen und metabolisiert wird.

2.7.5 Lichtmikroskopie

In allen Versuchsgruppen (Gr. I-V) wurden am 5., 8., 10., 30. und 90. postoperativen Tag die Biopsien aus dem *Lobus lateralis sinister*, *Lobus medianus* und Leberhilus sowohl für konventionelle (Hämatoxilin-Eosin, H.E.) als auch für immunhistochemische (monoklonale Antikörper, mAb) Färbungen entnommen.

Zur morphometrischen Untersuchung wurden bei einer Vergrößerung von 12,5 x 40 pro Präparat jeweils 10 Gesichtsfelder a' 100 Felder unter Verwendung eines Okular-Zählnetzes

(Leitz-Strichplatte 10X10, 100 Felder=0,084 mm²) ausgewertet. Hierbei wurde die Anzahl der Entzündungszellen in den Sinusoiden und den Portalfeldern ausgezählt.

2.7.5.1 Der Gefrierschnitt

Unmittelbar nach Explantation der Organe wurde das gewonnene Material in vorher bereitgestellte Kunststoffläschchen gelegt, mit Einbettmedium (Tissue freezing medium[®], Leica instruments GmbH, Nussloch, BRD) übergossen und für ca. 10 Sekunden in Isomethylbutan (2-Methylbutan, Sigma Aldrich, Steinheim, BRD) getaucht, das wiederum in flüßigem Stickstoff gekühlt war. Die so gewonnenen Gefrierblöcke wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt. Zur Anfertigung der Schnitte wurden die gefrorenen Blöcke bei einer Kammertemperatur von -23°C im Kryostat (Leitz KG, München, BRD) auf dem Schneidetisch fixiert und dann die Schnitte mit einer durchschnittlichen Dicke von 5-7 µm (HE-Färbung und Immunhistologie) angefertigt. Diese Schnitte wurden auf Objektträgern aufgebracht, acetonfixiert und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

2.7.5.2 Der Paraffinschnitt

Ein anderer Teil der entnommenen Transplantate wurde zur Anfertigung der konventionellen Histologie unmittelbar nach Explantation in 3,7%-iger, gepufferter Formalinlösung (Merck, Darmstadt, BRD) fixiert. Der nächste Arbeitsschritt bestand in der Einbettung der Organe in flüßiges Paraffin (60°C) (*Paraffinum liquidum*, hauseigene Apotheke).

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Härtung auf Eis konnten von den Paraffinblöckchen am Mikrotom ca. 5 µm dünne Membranen geschnitten werden. Diese wurden in ein erwärmtes Wasserbad gelegt, mit einem Glasobjektträger aufgefangen und mit Hämatoxilin-Eosin (Merck, Darmstadt, BRD) gefärbt.

2.7.5.3 Konventionelle Histologie (HE-Färbung)

Für die Weiterbearbeitung wurden die Schnitte aufgetaut, luftgetrocknet und anschließend mit Hämatoxillin-Eosin (HE) (Merk, Darmstadt, BRD) gefärbt. Die HE-Färbung stellte das

Zytosol rot und die Zellkerne bläulich bis lila dar, was eine Aussage über die Stärke einer Zellinfiltration ermöglichte. Die semiquantitative Auswertung der konventionellen Histologie diente als Grundlage der Klassifikation des Abstoßungsgrades, entsprechend der für humane Lebertransplantate gültigen Einteilung nach *Snover* (60, 96, 107, 166, 174-176).

2.7.5.4 Die immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an den Gefrierschnitten der transplantierten Lebern durchgeführt. Hierfür wurden monoklonale Antikörper (mAb), die nach Bindung an ihr jeweiliges Epitop und nach entsprechenden Auswasch,- und Reinigungsschnitten, mit der Peroxidase/Antiperoxidase-Methode gefärbt. Im einzelnen wurden folgende Strukturen angefärbt:

- Makrophagen, Kupffer-Zellen (CD 11b*, Fa. Serotec, UK)
- Monozyten, Granulozyten, Makrophagen (CD 11b/c*, Fa. Pharmingen, USA)
- Monozyten, Granulozyten (ED2*, Fa. Serotec, UK)
- T-Helferzellen (CD4*, Fa. Serotec, UK)
- IL-2 Rezeptor der T-Lymphozyten (CD 25*, Fa. Pharmingen, USA)

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

Gegengefärbt wurde mit Peroxidase konjugiertem F(ab')₂-Fragment von Ratte-anti-Maus IgG (Pharmingen, USA).

2.7.6 Klassifikation der Abstoßung nach Snover

<i>Akute zelluläre Abstoßung</i>	<i>European System</i>	<i>NIDDK System</i>
<i>mild (gering ausgeprägt)</i>	<i>Die inflammatorischen Veränderungen sind im allgemeinen mild und weisen eine fleckige Verteilung innerhalb Portalfelder auf. Die Schädigung der Gallengänge und die Entzündung der venösen Endothelauskleidung sind ebenfalls gering ausgeprägt.</i>	<i>Abstoßung in einigen Triaden, begrenzt auf Portalräume.</i>
<i>moderat (mäßige ausgeprägt)</i>	<i>Die inflammatorischen Veränderungen sind ausgedehnter, mit der Beteiligung großer Anzahl von Portalfeldern. Die Schädigung der Gallengänge und die Entzündung der venösen Endothelauskleidung deutlich ausgeprägt.</i>	<i>Abstoßungsinfiltrat, welches die meisten von Triaden involviert, mit oder ohne Ausbreitung auf die Lobuli. Keine Anzeichen von zentrolobulären Nekrosen, „balloning“ oder „drapout“.</i>
<i>schwer (stark ausgeprägt)</i>	<i>Alle drei klassischen Zeichen der akuten Abstoßung sind vorhanden. Sie können zusätzlich von periportal und vaskulären Veränderungen begleitet werden.</i>	<i>Abstoßungsinfiltrat in einigen oder allen Triaden, mit oder ohne Ausbreitung auf die Lobuli, assoziiert mit der schweren lobulären Inflammation und Nekrose.</i>

Tab.5. Klassifikation der akuten Abstoßung des Lebertransplantats. NIDDK: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (175, 177).

2.8 Statistische Auswertung

2.8.1 Deskriptive Statistik

Von den erfassten Meßgrößen wurden der arithmetische Mittelwert (\bar{x}), die Standardabweichung (S), die Standardabweichung des mittleren Fehlers (SD) sowie der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) mit Hilfe des SPSS/PC+V2.0 Programms (215) für Personal Computer berechnet.

Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

2.8.2 Varianzanalyse

Zur statistischen Untersuchung wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mittels des *Man-Whitney U-Test* für unabhängige Stichproben berechnet und die Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant bewertet.

3. Ergebnisse

3.1. *In vivo*

3.1.1. Transplantatüberleben in den Kontrollgruppen (Gr. I und II)

Die Abb. 13 zeigt das Überleben der Kontrolltiere (*Gr. I* - syngene Kontrolle und *Gr. II* - allogene Kontrolle). Da es sich um ein orthotopes Modell handelt, korreliert das Überleben der Tiere eng mit dem eigentlichen Transplantatüberleben. Der Todeszeitpunkt wurde somit als Abstoßungszeitpunkt gewertet. Alle syngen transplantierten Tiere (*Gr. I*) überlebten für den den Zeitraum der Nachbeobachtung (≥ 90 Tage), was als indefinitives Transplantatüberleben gewertet wurde.

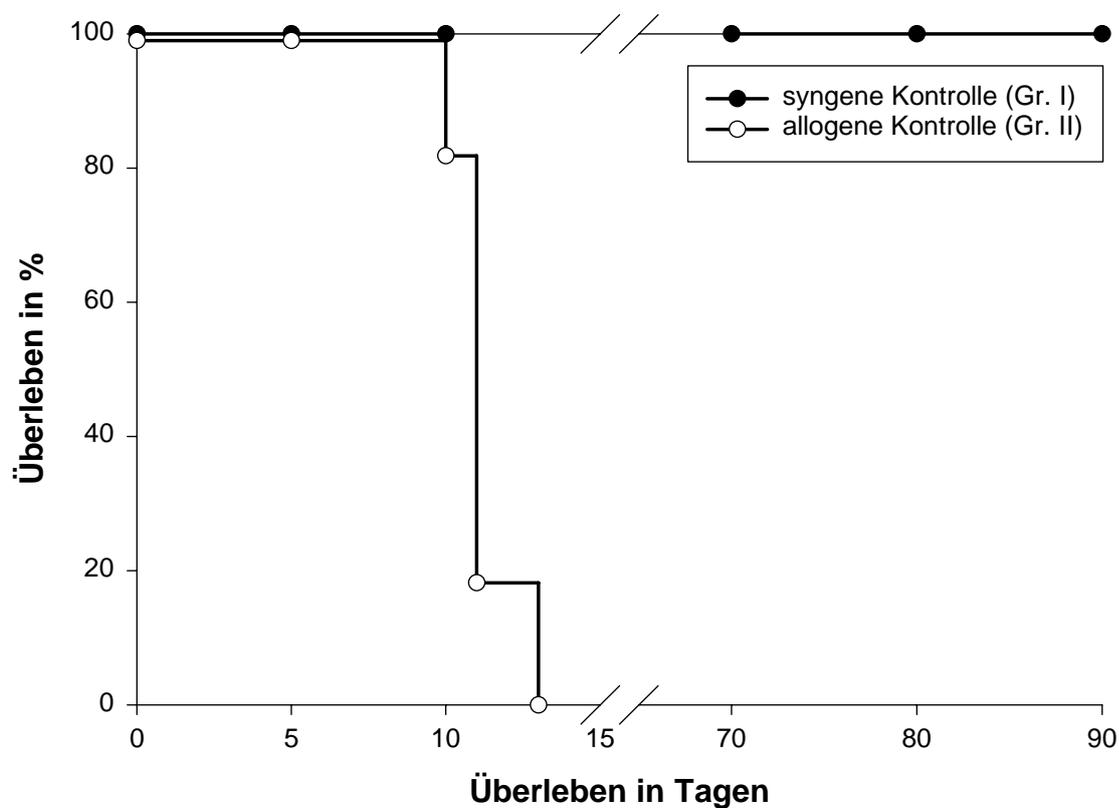


Abb. 13. Überleben der Kontrolltiere.

Die allogenen transplantierten, unterapierten Tiere (*Gr. II*) verstarben alle in einem Zeitraum von 10 bis 13 Tage nach oRLTx, - hieraus ergibt sich ein mittleres Transplantatüberleben von $11,2 \pm 0,3$ Tagen.

3.1.2 Transplantatüberleben unter Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

3.1.2.1 Effektivität der iNOS-Hemmung

Um die Effektivität der AGH Therapie zu kontrollieren, wurden bei unbehandelten Kontrolltieren (*Gr. II*) und in den mit AGH (1%, 3 ml/d, *p.o.*, Applikation ab Tag -7 vor oRLTx) therapierten ET (*Gr. IV* und *V*) am Tag der Transplantation (Tag 0) die Serumspiegel von $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ gemessen. *Abb. 14* stellt die daraus gewonnenen Ergebnisse graphisch dar. Es sind Summenwerte der Serumspiegel ($\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$, μM) aufgetragen.

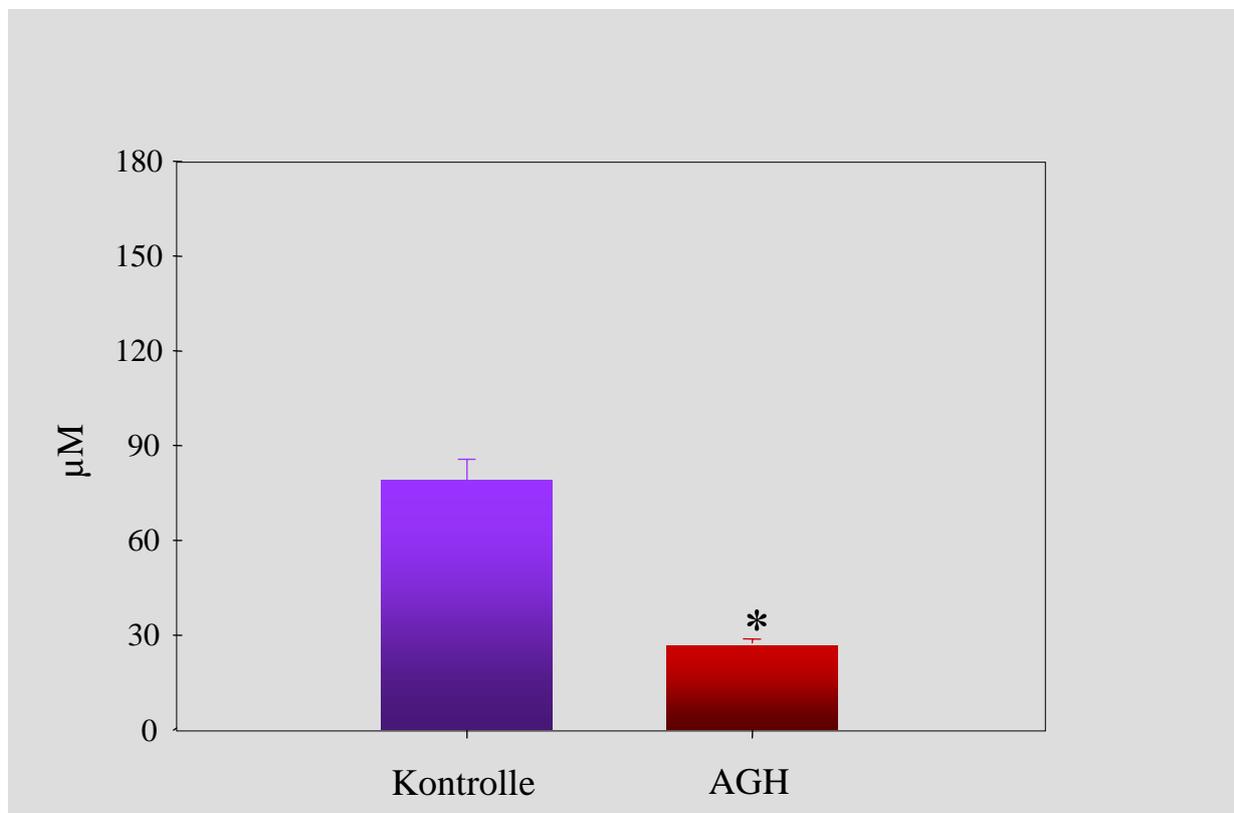


Abb. 14. Serumwerte von $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$, $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $*p < 0.05$ vs. Kontrolle.

Aus der Grafik ist ersichtlich, daß die Behandlung der *ET* (Gr. IV und V) mit einem iNOS-Inhibitor Aminoguanidinhydrochlorid (AGH) zu einer signifikanten Erniedrigung des $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ Spiegels im Serum führt (unbehandelte Kontrolle $88,1 \pm 4,1 \mu\text{M}$, $n=6$; AGH-behandelte *ET* $27,0 \pm 2,5 \mu\text{M}$, $n=24$; $\text{MW} \pm \text{SEM}$, $*p < 0,05$ vs. Kontrolle).

3.1.2.2 Transplantatüberleben unter Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)

Die Abb.15 zeigt das Überleben der Empfängertiere (*ET*) unter Inhibition der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Es ist zu erkennen, daß trotz verminderter Serumspiegel von $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ (vgl. 3.1.2.1) kein verlängertes Überleben der *ET* erzielt werden konnte. Die alleinige Hemmung der iNOS führt somit zu keiner ausreichenden Immunsuppression. Alle *ET* ($n=11$) verstarben vom 10. bis 13. Tag post-oRLTx, was einem mittleren Transplantatüberleben von $11,4 \pm 0,3$ Tagen entspricht.

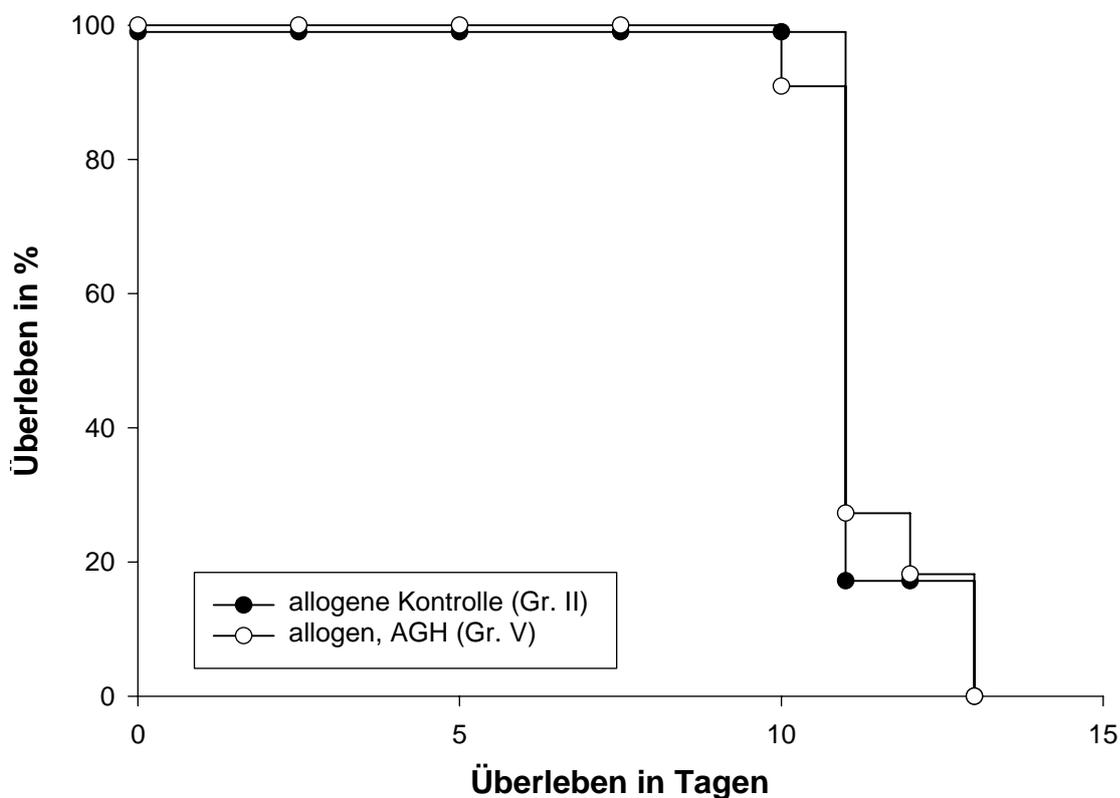


Abb. 15. Überleben unter Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS).

3.1.3 Transplantatüberleben unter Immunsuppression mit FK506

Um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für das bereits etablierte FK506 bezüglich seiner immunsuppressiven Wirksamkeit zu ermitteln, wurde FK506 in Dosen von 0,01 bis 1 mg/kg/KG/d *s.c.* appliziert. Die Abb. 16 zeigt die Überlebenskinetik der ET, die mit FK506 immunsupprimiert wurden (Gr. III).

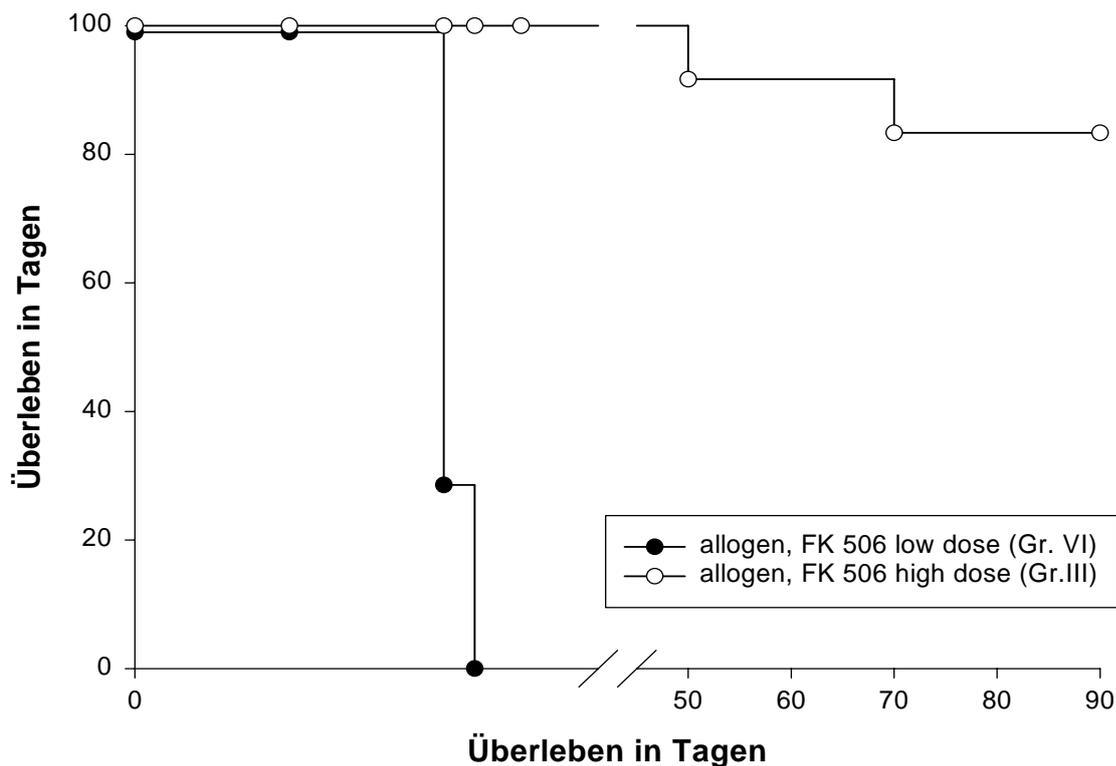


Abb. 16. Überleben unter Immunsuppression mit FK 506.

Aus der Abb. 16 ist ersichtlich, dass eine Dosis von 0,01 bis 0,03 mg/kg/KG/d, verabreicht über den gesamten postoperativen Zeitraum, sich dabei als subtherapeutisch erwies. Das mittlere Transplantatüberleben betrug $10,3 \pm 0,2$ Tage ($n=7$). Erst mit einer Dosis von 1 mg/kg/KG/d konnte ein langfristiges Transplantatüberleben für den Zeitraum der Therapie (mittleres Transplantatüberleben $85 \pm 3,6$ Tage, $n=12$) erzielt werden. Bei 11 von 12 ET konnte dadurch ein langfristiges Transplantatüberleben erreicht werden ($85 \pm 3,6$ Tage).

3.1.4 Transplantatüberleben unter kombinierter Therapie (Gr. IV)

Um einen potenziellen Synergismus zwischen FK506 (*Gr. III*) und AGH (*Gr. V*) bezüglich einer immunsuppressiven Wirksamkeit zu untersuchen, wurden einige *ET* ($n=13$) mit einer kombinierten Therapie aus FK506 (subtherapeutische Dosis, *low dose*) und AGH behandelt. Die *Abb. 17* stellt die dabei gewonnenen Ergebnisse im Vergleich zur allogenen Kontrollgruppe (*Gr. II*) graphisch dar.

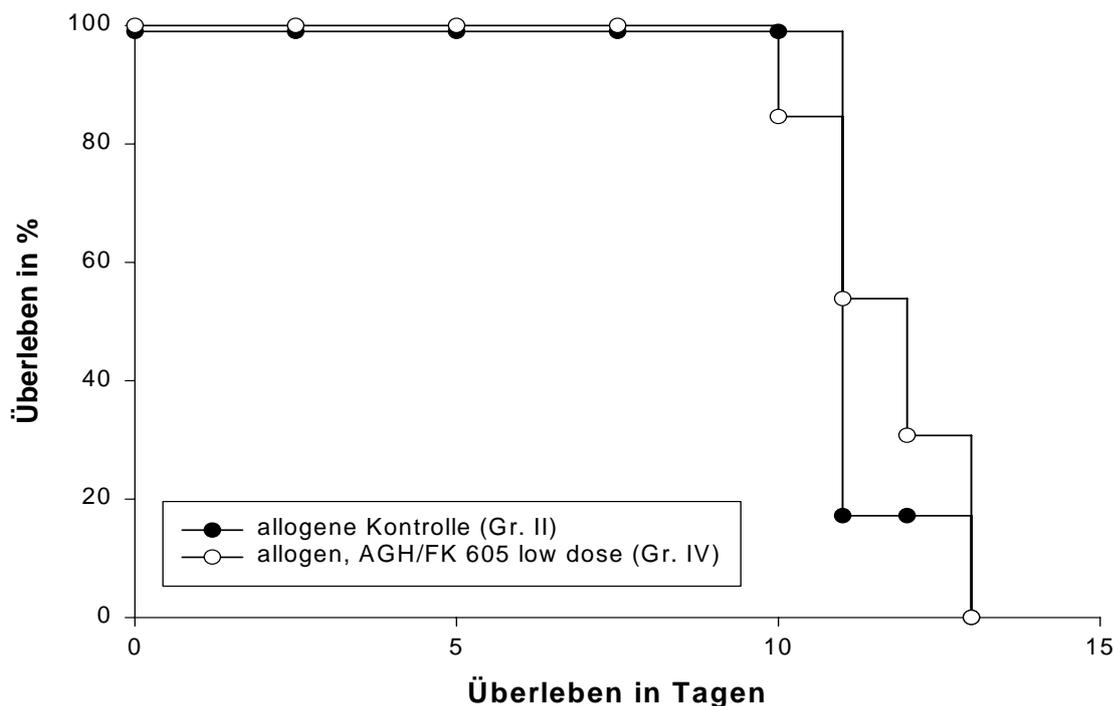


Abb. 17. Überleben unter Kombinationstherapie.

Aus der *Abb. 17* wird ersichtlich, daß durch eine Kombination von FK506 (0,01-0,03 mg/kg KG/d, *s.c.*) und AGH (1%, 3 ml/d, *p.o.*) keine Verlängerung des Transplantatüberlebens (*Gr. IV* vs. allogener Kontrolle, *Gr. II*) erzielt werden konnte. Das mittlere Transplantatüberleben betrug $11,7 \pm 1,7$ Tage ($n=13$). Somit konnte im Modell der orthotopen arterialisierten Lebertransplantation in der Ratte kein Synergismus bezüglich der immunsuppressiver Wirksamkeit zwischen AGH und FK506 nachgewiesen werden. Zum Teil schienen sich die Nebenwirkungen beider Substanzen (Pleuraergüße, neurologische Erscheinungen) sogar zu addieren, ohne daß ein ähnlicher Effekt für die Wirkungen der einzelnen Substanzen (AGH und FK506) zu beobachten war.

3.1.5. Zusammenfassung der *in vivo* Ergebnisse

Die Studie umfaßte insgesamt 6 Gruppen mit jeweils 11 bis 13 transplantierten Ratten. Die Gruppeneinteilung und das Überleben der Empfängertiere sind zusammenfassend in der *Tab. 6* dargestellt. Die Gesamterfolgsrate (d.h. Überlebenszeit zwischen 5 und 90 Tagen) der durchgeführten oRLTx (n=96) betrug ca. 93 %.

Gruppe	Bezeichnung	oRLTx	Anzahl (n) der oRLTx	Eizelüberleben in Tagen	Mittleres Überleben in Tagen (\pm SE)
I	Syngene Kontrolle	DA→DA	12	90, 90, 90, 90, 90, 90, 90, 90, 90, 90, 90, 90	90 (\pm 0)
II	Allogene Kontrolle	DA→LEW	11	13, 11, 11, 10, 11, 11, 13, 11, 10, 11, 11	11,2 (\pm 0,3)
III	Allogen mit FK506 high <i>dose</i> ⁽¹⁾	DA→LEW	12	90, 90, 90, 90, 50, 90, 90, 90, 90, 70, 90, 90	85 (\pm 3,6)
IV	Allogen mit FK506 low <i>dose</i> ⁽²⁾ und AGH ⁽³⁾	DA→LEW	13	13, 10, 11, 13, 12, 11, 11, 13, 13, 11, 10, 12, 12	11,7 (\pm 0,3)
V	Allogen, AGH	DA→LEW	11	11, 12, 11, 13, 11, 11, 10, 11, 13, 11, 11	11,4 (\pm 0,3)
VI	Allogen FK506 low <i>dose</i> ⁽²⁾	DA→LEW	7	11, 10, 11, 10, 10, 10, 10	10,3 (\pm 0,2)

Tab. 6. Gruppeneinteilung und Überleben der Empfängertiere.

¹ **FK506 high dose** (Tacrolimus, Prograf;[®] Applikation *post-transplantationem* 1 mg/kg KG/d, s.c.)

² **FK506 low dose** (Tacrolimus, Prograf;[®] Applikation *post-transplantationem* 0,01-0,03 mg/kg KG/d, s.c.)

³ **AGH** (Aminoguanidinhydrochlorid, 1% 3 ml/d *prae*-(-7 Tage) und *post-transplantationem*, p.o.).

3.1.6 Zusammenfassung der Transplantat-Überlebenskinetik

Aus der *Abb. 18* wird ersichtlich, daß in der syngenon Kontrollgruppe (*Gr. I*) sowie in der mit FK506 immunsupprimierten Gruppe (*Gr. III*) bei allen *ET* ein langfristiges Transplantatüberleben ($85 \pm 3,6$ Tage) erzielt werden konnte ($n=12$). Die Lebern von vollallogenen Spendern (*Gr. II*) wurden nach 10 bis 13 Tagen (allogene Kontrolle, $n=11$, mittleres Transplantatüberleben $11,2 \pm 0,3$ Tage) abgestoßen. Desweiteren zeigen unsere Ergebnisse, daß mit einer AGH-Konzentration von 1% (3 ml/d, *per os*) kein signifikant längeres Transplantatüberleben (*vs.* allogener Kontrolle, *Gr. II*) erreicht werden konnte. Die Lebern wurden nach 10 bis 13 Tagen ($n=11$, mittleres Transplantatüberleben $11,4 \pm 0,3$ Tage) abgestoßen. Nur bei 2 von 11 Tieren (15%) konnte ein langfristiges Transplantatüberleben erreicht werden (≥ 90 Tage). Mit AGH ließ sich also, im Gegensatz zu FK506, kein langfristiges Transplantatüberleben erreicht werden. Der Versuch, den höheren Prozentsatz der indefinitiv überlebenden *ET* durch Steigerung der Tagesdosis von AGH zu erreichen, scheiterte am Ableben der Tiere nach 3 bis 7 Tage infolge therapiebedingter Nebenwirkungen ($n=6$, mittleres Transplantatüberleben $7,5 \pm 0,8$ Tage).

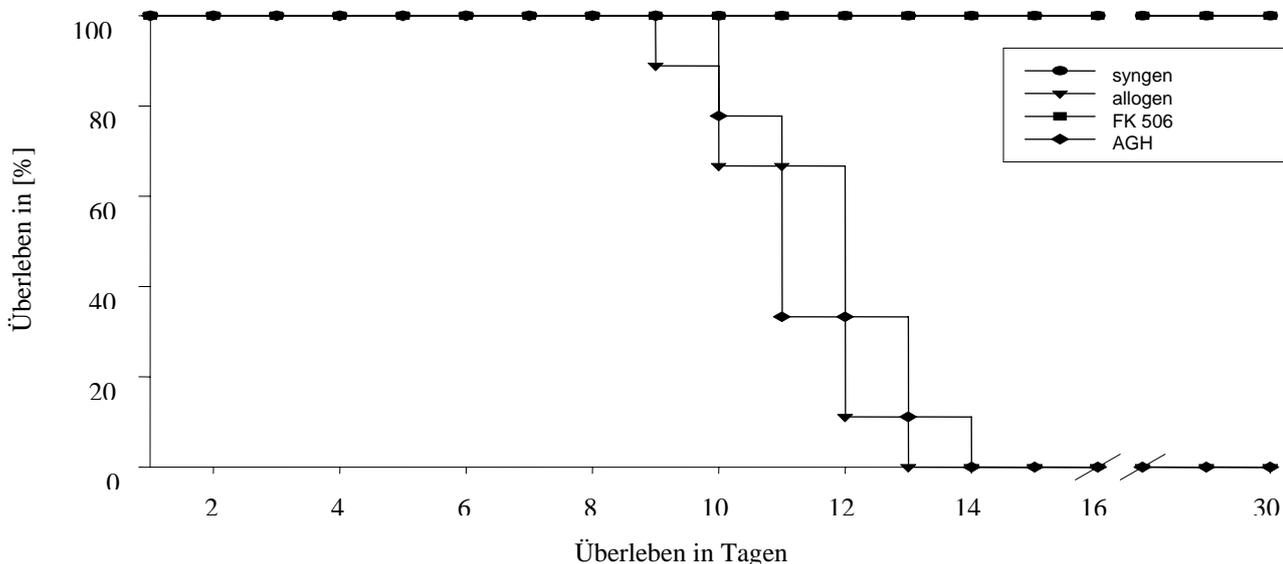


Abb. 18. Zusammenfassung der Transplantat-Überlebenskinetik in den einzelnen Gruppen.

3.2 Enzymaktivität im Serum

Die Empfängertiere (ET) in den Gr. I, III, IV und V zeigten ab dem 5. postoperativen Tag tendenziell eine Normalisierung der Leberfunktionsparameter, reflektiert durch Enzymaktivitäten von GOT, GlDH, AP und PChE im Serum. Nach 30 Tagen unterschieden sich die Enzymaktivitäten bei den ET in den Gr. I und III nicht mehr signifikant von den präoperativ gemessenen Werten (Abb. 19, 20, 22; Tab. 7, 8, 10).

Im Gegensatz dazu zeigten unbehandelte allogene ET (Gr. II) bereits ab dem 5. Tag signifikant höhere Werte an GOT (1135 ± 316 U/l), AP (344 ± 90 U/l) und Bilirubin ($6,7 \pm 0,4$ mg/dl) sowie am 10. Tag eine Reduktion der Lebersyntheseparameter (PChE 1010 ± 20 U/l; Albumin $2,7 \pm 0,5$ g/dl) (Abb. 18-21, Tab. 7-11).

Bei den AGH-behandelten ET (Gr. V) wurden bis zum 8. Tag keine signifikanten Unterschiede, verglichen mit den ET der Gr. I und III, beobachtet. Im weiteren Verlauf (8. und 10. Tag) kam es zu einem signifikanten Anstieg von GOT (264 ± 52 U/l), AP (412 ± 58 U/l), Bilirubin ($2,7 \pm 0,5$ mg/dl) sowie Verminderung von PChE (970 ± 130 U/l) und Albumin ($3,0 \pm 0,6$ g/dl) (Abb. 19-22).

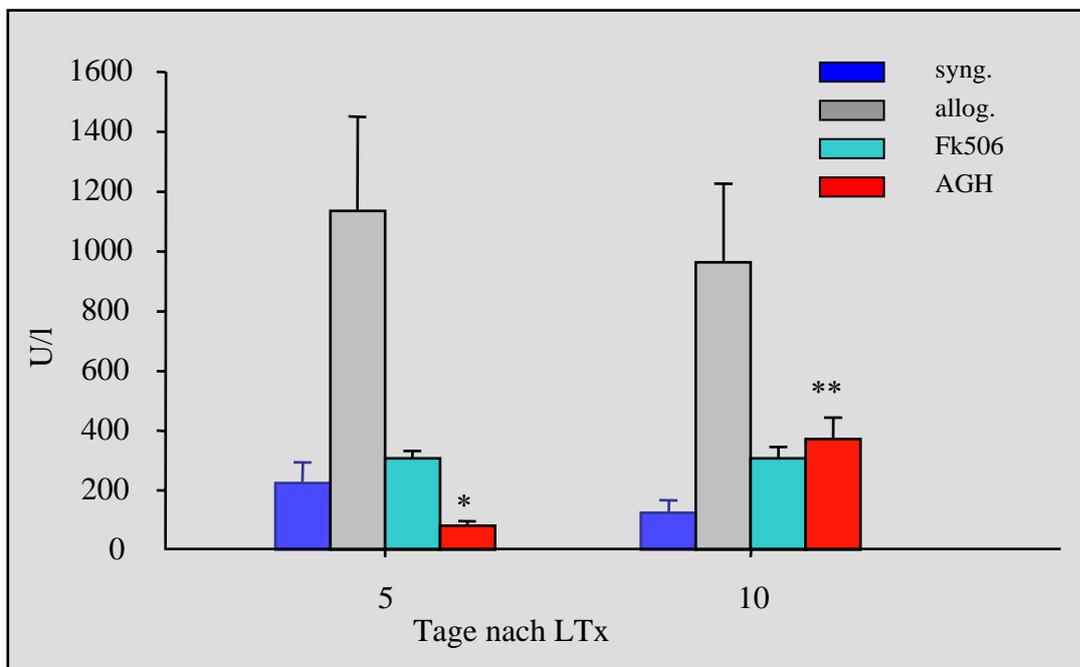


Abb. 19. Enzymatische Aktivität von GOT in den Gr. I-IV (Gr. IV analog zur Gr. V), $MW \pm SEM$, * $p < 0.05$ vs. Allog., ** $p < 0.05$ vs. Syng. und Allog.

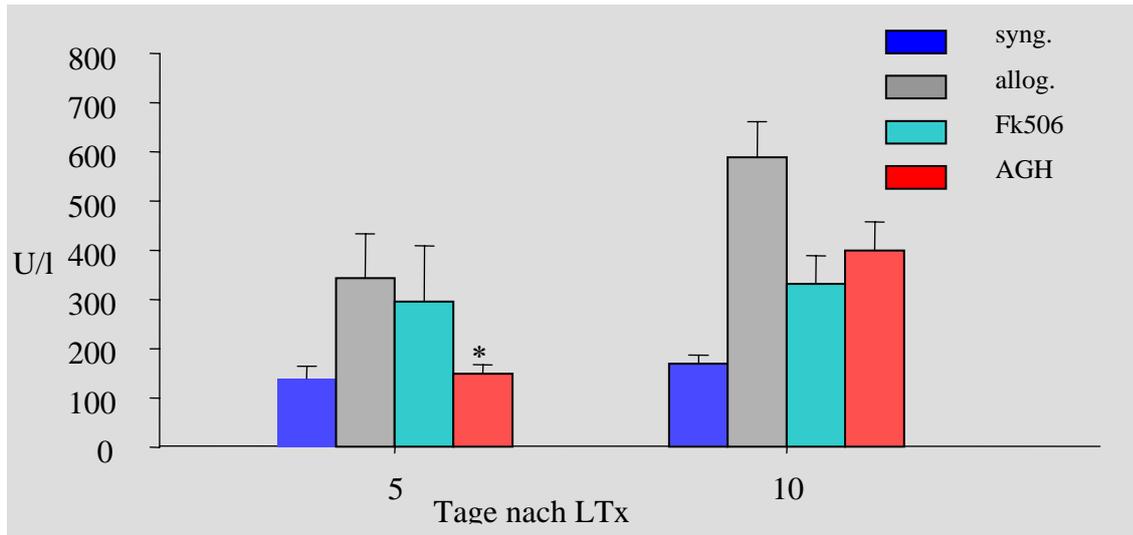


Abb. 20. AP (U/l), MW \pm SEM, * p <0.05 vs. Allog.

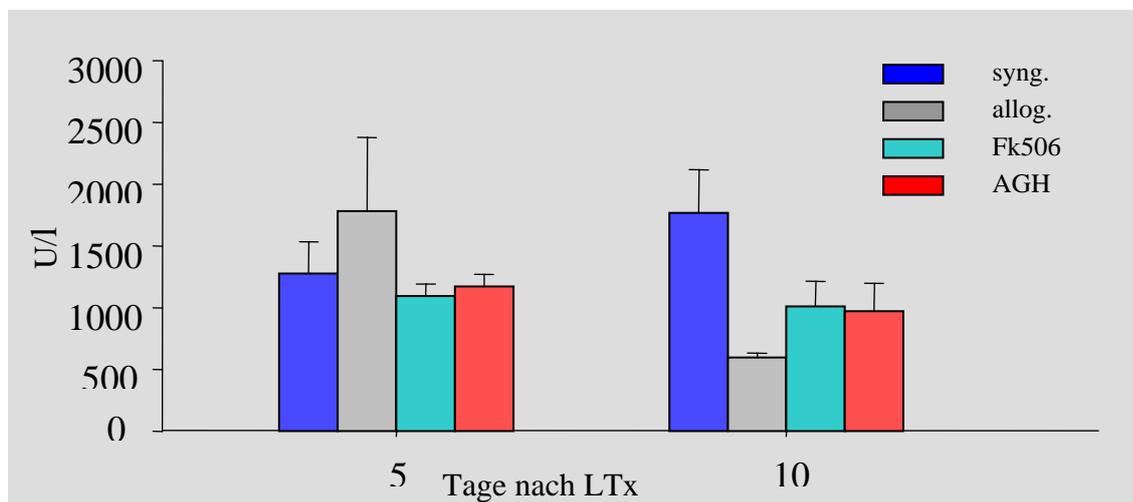


Abb. 21. Bilirubin (mg/dl), MW \pm SEM, * p <0.05 vs. Allog.

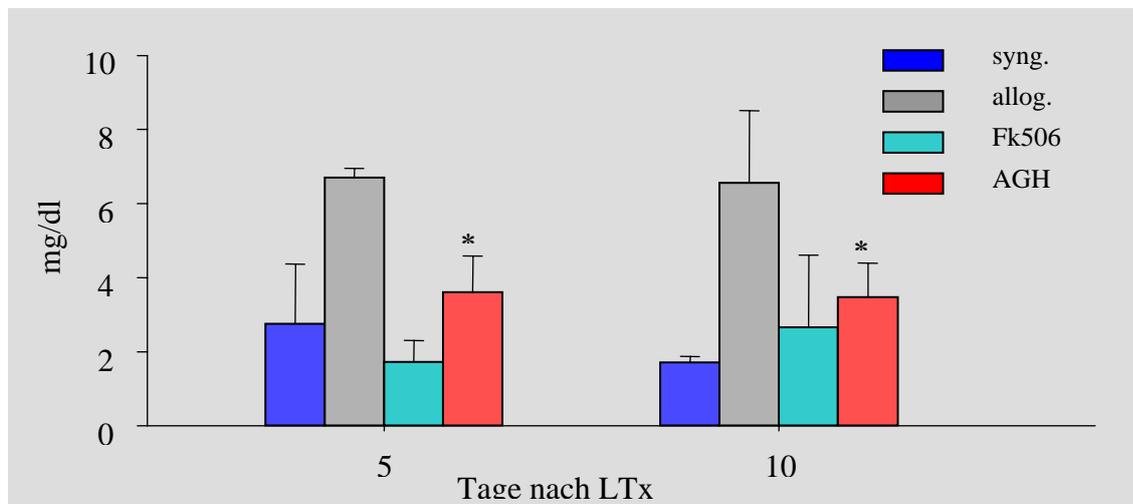


Abb. 22. PChE (U/l), MW \pm SEM.

Gruppe/Tag	5d	8d	10d	30d	90d
I	225±69	351±58	126±43	35±3.5	56±10,456
II	1135±316	473±75	974±232		
III	307±26	142±24	308±39	45±5,5	88±15,5
IV	164±90	138±15	592±204		
V	82±16	459±26	264±52		

Tab. 7. Verlauf von Serum-GOT (U/l).

Gruppe/Tag	5d	8d	10d	30d	90d
I	139±26	302±52	162±27	102±32	302±77
II	344±90	478±34	589±72		
III	298±73	179±29	320±47	199±34	490±95
V	149±28	297±59	412±58		

Tab. 8. Verlauf von Serum-AP (U/l).

Gruppe/Tag	5d	8d	10d	30d	90d
I	2,7±0,9	2,9±0,6	4,3±1,9	4,7±0,5	6,7±1,9
II	0,2±0,0	1,6±0,9	0,6±0,1		
III	2,4±1,9	3,7±0,6	2,7±0,2	5,2±0,6	6,3±1,2
V	1,4±1,1	3,5±0,9	3,0±0,6		

Tab. 9. Verlauf von Serum-Albumin (g/dl).

Gruppe/Tag	5d	8d	10d	30d	90d
I	1280±260	960±60	1700±220	1260±160	1460±120
II	1170±100	1310±370	1010±20		
III	1100±109	760±220	1100±144	860±120	1680±94
IV	830±140	1510±370	1770±350		
V	1180±190	120±138	970±130		

Tab. 10. Verlauf von Serum-**PChE** (U/l).

Gruppe/Tag	5d	8d	10d	30d	90d
I	2,3±0,5	2,1±0,4	1,8±0,3	4,1±1,6	3,7±1,2
II	6,2±0,5	1,8±0,2	6,6±1,9		
III	1,7±0,2	1,5±0,7	2,7±1,2	3,7±1,0	4,,2±0,8
IV	2,5±0,5	2,6±0,4	3,4±1,6		
V	3,0±0,4	1,6±0,1	2,7±0,5		

Tab.11. Verlauf von Serum-**Bilirubin** (mg/dl).

Die Tab. 7-11 zeigen die Gesamtheit der Ergebnisse der Leberfunktionsparameter für die jeweiligen Gruppen am 5., 8., 10., 30. und 90. Tag nach der Transplantation. Die Daten sind als MW±SEM dargestellt.

3.3 NO²⁻/NO³⁻-Konzentration im Serum

Bei den *ET* der *Gr. I* und *III* konnte bis zum 10. Tag kein signifikanter Anstieg von NO²⁻/NO³⁻-Konzentration (48,3±7,7 µM bzw. 61,4±5,3 µM) über den präoperativen Normwert (88,1±4,1 µM) beobachtet werden. Bei diesen *ET* der stieg der Serumspiegel von NO²⁻/NO³⁻ in den ersten Stunden nach Reperfusion an. Der Maximalwert von 148,3±17,8 (µM) wurde am 1. postoperativen Tag erreicht. Des weiteren war in diesen Gruppen am 5. postoperativen Tag keine signifikante Konzentrationsabweichung vom Referenzbereich zu verzeichnen (31,1±1,2 µM bzw. 41,2±2,9 µM). Innerhalb von 48 Stunden nach Transplantatreperfusion sank die NO²⁻/NO³⁻-Konzentration wieder auf Werte innerhalb des Referenzbereiches.

Im Gegensatz dazu lagen bereits am 5. Tag in der *Gr. II* gemessene NO²⁻/NO³⁻-Werte (190,0±2,5 µM) deutlich über dem präoperativ ermittelten Normwert (88,1±4,1 µM) und nahmen im weiteren Verlauf (am 8. und 10. Tag) signifikant zu. Das Maximum von 498±118 µM wurde am 10. postoperativen Tag erreicht.

Ein signifikanter Anstieg von NO über den Normwert blieb bei den mit *AGH*-behandelten *ET* (*Gr. IV und V*) bis zum 8. Tag (75,0±4,0µM) aus. Danach war eine Zunahme der NO²⁻/NO³⁻-Werte (im Gegensatz zu den *Gr. I* und *III*) zu verzeichnen. Diese blieben jedoch bis zum 10. Tag (161,6±29,7µM) signifikant niedriger als bei den unbehandelten *allogenen ET* (*Gr. II*) (497,7±117,7 µM; p<0,03).

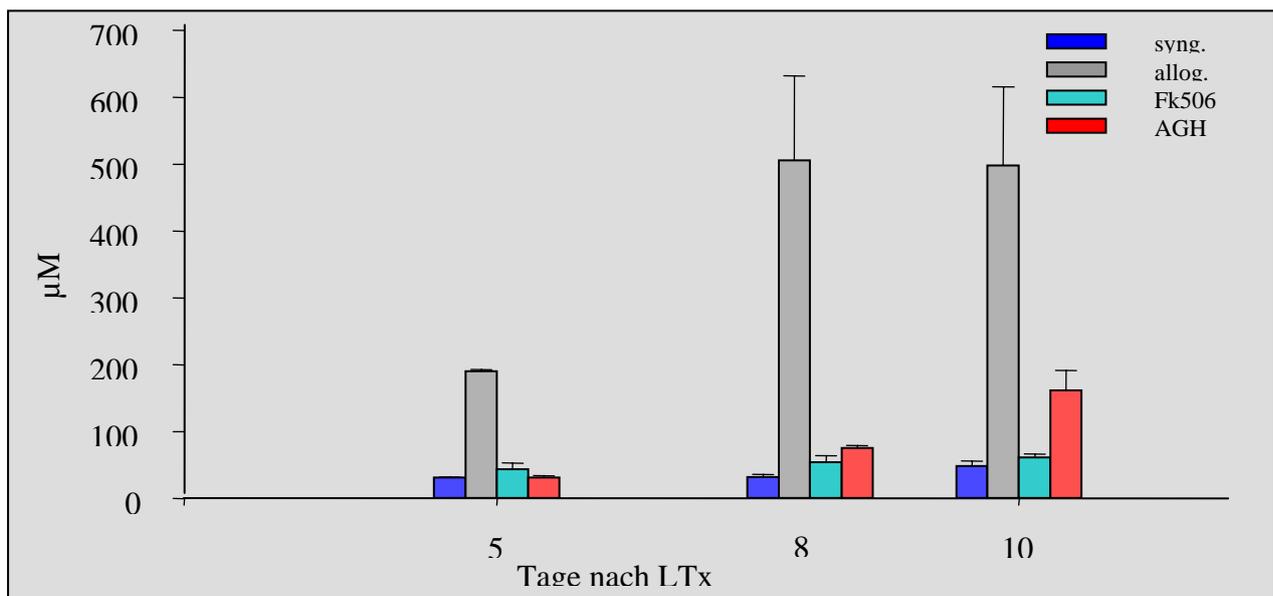


Abb. 23. Serum NO²⁻/NO³⁻ post transplantationem in den *Gr. I-V* (MW ± SEM, *p < 0.05 vs. allog; **p < 0.05 vs. Allog. und Syng.).

Gruppe/Tag	5d	8d	10d	30d	90d
I	31,1±1,2	32,1±3,9	48,3±7,8	52,8±8,9	58,8±9,4
II	190,0±2,6	505,6±126,2	498±118		
III	31,2±2,9	75,0±4,0	161,6±28,9	71,6±4,8	70,1±8,9
V	43,6±9,4	57,2±8,3	61,4±5,4		

Tab. 12. Serum- NO^2/NO^3 (μM), Daten sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ dargestellt.

3.4 Aktivität von CYP-Isoenzymen (1A1, 1A2, 2E1, 3A4) in der Leber.

Darüberhinaus verglichen wir die Ergebnisse mit Protein- und Aktivitätsmessungen der zytoplasmatischen CYP-Isoenzyme 1A1, 1A2, 2E1 und 3A4 der jeweiligen Gruppen als Ausdruck der mikrosomalen Leberfunktion .

Seit den Versuchen von *Cassoly* und *Gibson* von 1974 ist bekannt, daß NO an Häm-moleküle bindet (25). Inzwischen wissen wir, daß die Mehrzahl der bisher bekannten biologischen Effekte von NO auf der direkten Aktivierung oder Hemmung spezifischer Enzyme beruht. Auf molekularer Ebene steuert NO die Enzymaktivität durch die Bindung an prosthetische Eisengruppen wie Hämgruppen, Eisen- Schwefel- Cluster oder binukleären Eisenzentren (3). Cytochrom P450, welches entscheidend ist für die Entgiftungsfunktion der Leber, enthält eine Hämgruppe, die NO mit hoher Affinität reversibel an seiner Fe- und S-Gruppe bindet. Bisher konnte *in vitro* eine Aktivitätshemmung für die Isoenzyme 1A1, 1A2, 2B1, 2B2, 2E1 und 3A4 gezeigt werden (24, 103). Aus dieser Gruppe sind lediglich 1A2, 2E1 und 3A4 an der Verstoffwechslung in der humanen Leber beteiligt, so daß wir deren Aktivität bei der Abstoßung (*Gr. II* und *V*) miteinander sowie mit den Ergebnissen der syngenen (*Gr. I*) und immunsupprimierten Kontrollgruppen (*Gr. III*) verglichen haben.

In unseren Versuchen fiel die Aktivität von 1A1, 1A2 2E1 und 3A4 bei der akuten Abstoßung (*Gr. II*, allogene Kontrollgruppe) bereits am 5. postoperativen Tag und erreichte am 10.

postoperativen Tag die Werte wie folgt: 28,6%, 34,5%, 92,9%, 0,07% (Tab. 12-15, Daten sind in pmol/min/mg als $MW \pm SEM$ dargestellt.).

Im Gegensatz dazu zeigte die Aktivitätsmessung der Isoenzyme in der AGH-behandelten Gruppe (Gr. V) signifikant höhere Werte (7,9% bzw. 7,26%, Gr. V vs. Gr. I, $p < 0,02$, was in diesem Modell eine transplantatprotektive Wirkung von AGH als selektiven iNOS-Inhibitor wahrscheinlich macht.

Gruppe/Tag	5d	8d	10d
I	5,1±0,5	17,5±3,0	28,6±2,4
II	9,6±1,1	0,6±0,2	1,0±0,2
III	5,1±0,3	1,1±0,1	1,0±0,3
IV	3,5±1,0	1,8±0,9	1,9±0,2
V	1,2±0,2	1,1±0,2	0,4±0,1

Tab. 12. CYP-Isoenzym 1A1.

Gruppe/Tag	5d	8d	10d
I	11,0±0,4	11,6±1,5	6,9±0,8
II	4,2±0,4	1,3±0,2	2,0±0,3
III	2,0±0,1	1,8±0,3	1,8±0,4
IV	6,5±0,3	3,7±1,3	5,2±0,4
V	5,6±1,1	3,6±0,3	2,5±0,4

Tab. 13. CYP-Isoenzym 1A2.

Gruppe/Tag	5d	8d	10d	30d	90d
I	168,0±11,0	121,5±5,6	130,1±6,0	154,4±28,0	84,1±6,9
II	90,0±7,5	16,9±2,2	1,4±2,6		
III	55,8±5,5	70,6±9,2	64,9±13,2	47,1±13,9	64,9±13,2
IV	39,2±11,6	29,5±11,0	52,7±8,5		
V	14,6±6,0	7,2±3,5	16,3±2,9		

Tab. 14. CYP-Isoenzym 2E1.

Gruppe/Tag	5d	8d	10d	30d	90d
I	327,7±54,8	427,3±94,9	873,9±217,0	312,9±64,3	111,8±25,0
II	347,2±98,8	2,6±1,3	0,6±0,3		
III	164,0±11,2	47,4±8,4	103,7±24,8	80,0±7,0	62,5±29,6
IV	79,5±29,9	14,1±5,5	81,6±8,3		
V	100,2±7,7	99,6±18,1	120,3±26,2		

Tab. 15. CYP-Isoenzym 2E1.

3.5 Histologie

Lichtmikroskopisch ergab sich in Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten der Leberproben in den *Gr. I* und *III* ab dem 5. postoperativen Tag eine weitgehend normale Gewebsstruktur, die auch im weiteren Verlauf (8., 10., 30. und 90 Tag) erhalten blieb. Es lag kein Anhalt für eine akute Transplantatabstoßung vor.

Im Gegensatz dazu war bei den unbehandelten *allogen* Transplantierten *ET (Gr. II)* ab dem 5. Tag eine beginnende akute Abstoßungsreaktion mit Infiltration der Portalfelder des Leberparenchyms durch Entzündungszellen, insbesondere aktivierten Lymphozyten, sowie eine Endothelialitis und Destruktion von Gallengängen zu beobachten (entsprechend Grad 3 nach *Snover*) (*Abb. 23-b*) (174, 175). Neben ballonierten Hepatozyten fanden sich zahlreiche Einzelzellnekrosen in Form von azidophilen Körperchen (*Councilman bodies*) mit perifokalen Entzündungsinfiltraten. Die genannten Transplantatveränderungen nahmen im weiteren Verlauf (8. und 10. Tag) deutlich zu (*Abb. 24-b*).

Bei den *AGH*-behandelten *ET (Gr. IV und V)* zeigte sich am 5. und 8. postoperativen Tag zum Teil keine Abstoßungsreaktion (2 von 13 *ET*) (*Abb. 23-c*). Andere Fälle wiesen jedoch eine akute Abstoßungsreaktion entsprechend Grad 2 bis 3 auf. Die Abstoßung der Transplantate trat im Vergleich zu *Gr. II* später auf und war teilweise schwächer ausgeprägt. Desweiteren wurden in einzelnen Gewebsschnitten ab dem 8. postoperativen Tag fokale Nekrosen, Hämorrhagien und intravasale Thromben bei insgesamt einer mäßigen, entzündlichen Zellaktivität beobachtet.

Am 10. postoperativen Tag war die Abstoßungsreaktion der *AGH*-behandelten *ET* immer noch deutlich schwächer ausgeprägt als die der unbehandelten *allogen* Transplantierten (*Gr. II*). Während die *ET* in der *Gr. II* praktisch kein vitales Leberparenchym, sondern nur noch Nekrosen in Abräumung und Organisation zeigten (*Abb. 24-b*), waren in der *AGH*-behandelten Lebern noch größere erhaltene Leberparenchymreste erkennbar (*Abb. 24-d*).

Die immunhistochemischen lichtmikroskopischen Untersuchungen unter Verwendung von monoklonalen Anti-CD11,- -CD8- und -ED1-Antikörpern zeigten in allen Gruppen qualitativ sowie semiquantitativ eine Korrelation mit den in HE-Färbung festgestellten Transplantatveränderungen. Dabei war die Infiltration der Gewebsschnitte mit immunkompetenten Effektorzellen bei den *AGH*-behandelten *ET (Gr. IV und V)* deutlich weniger ausgeprägt als bei den unbehandelten *allogenen ET (Gr. II)*.

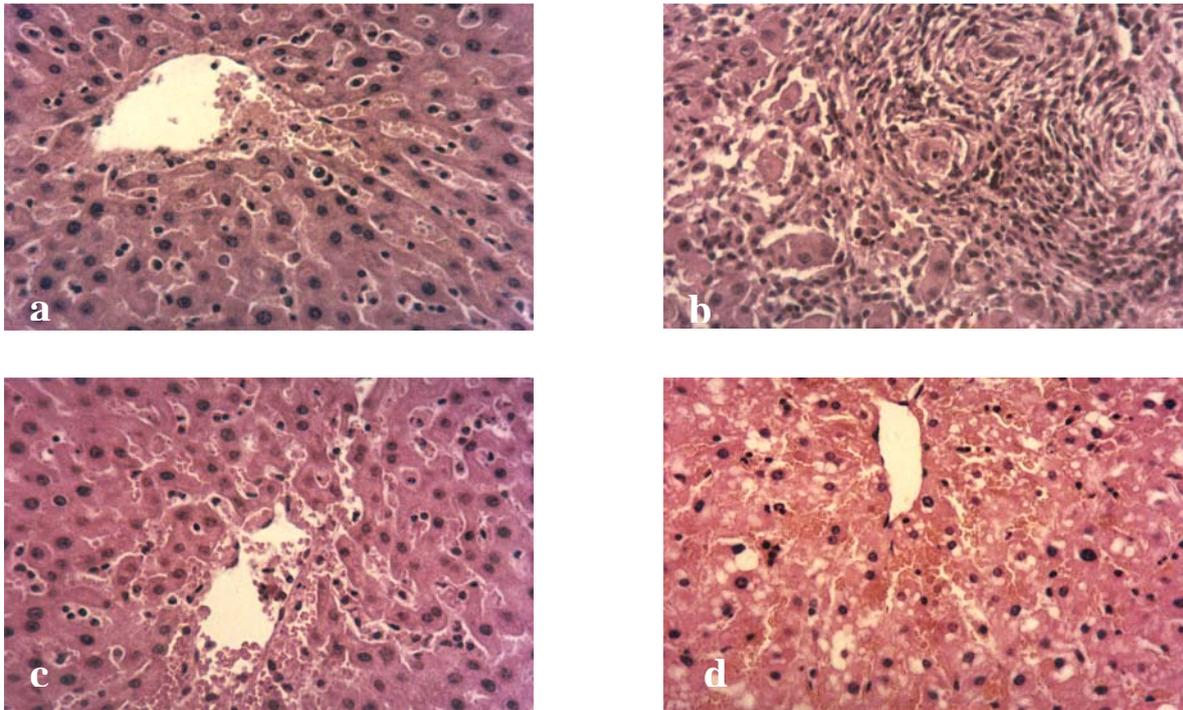


Abb. 23-a, -b, -c, -d. Konventionelle Histologie (HE-Färbung) am 5. postoperativen Tag Gr. I (a), II (b), III (c) und V (d).

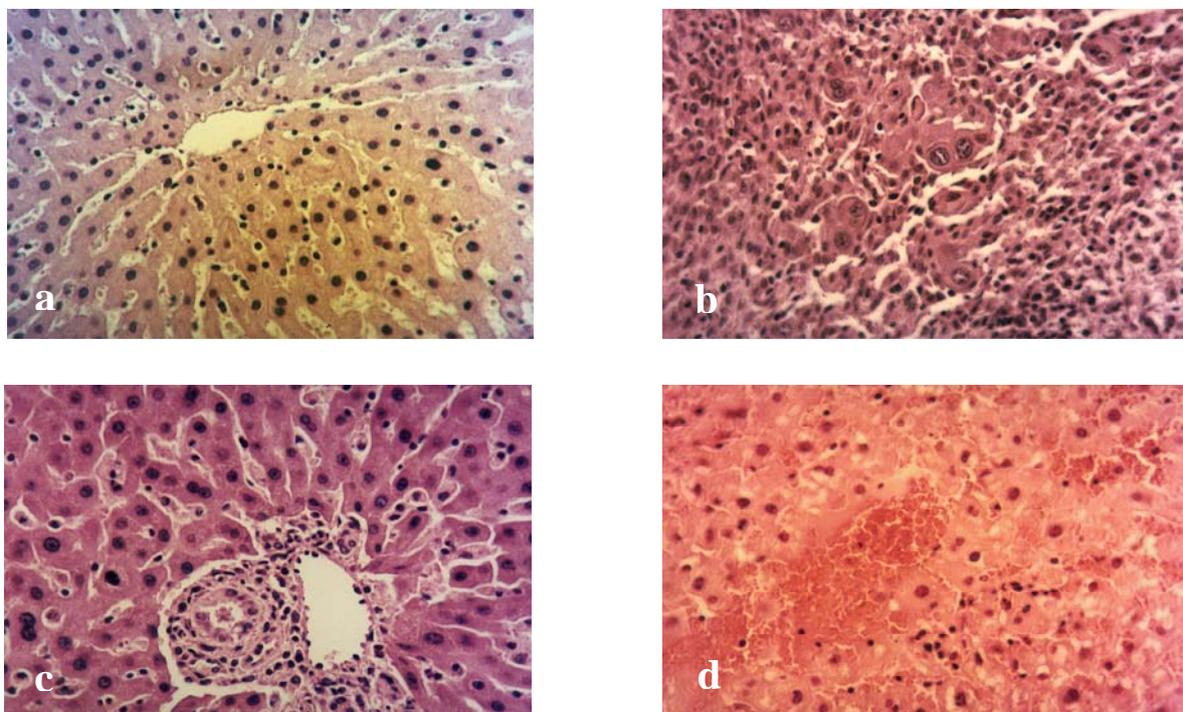


Abb. 24-a, -b, -c, -d. Konventionelle Histologie (HE-Färbung) am 10. postoperativen Tag Gr. I (a), II (b), III (c) und V (d).

4. Diskussion

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde die Rolle von Stickoxid (*NO*) nach orthotoper arterialisierter Lebertransplantation im Rattenmodell (*oRLTx*) untersucht. Als selektiver Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase (*iNOS*) wurde Aminoguanidinhydrochlorid (*AGH*) verwendet (28, 29, 71, 95, 113, 151). Die stabilen Endprodukte der endogenen NO-Produktion (NO^{2-}/NO^{3-}) wurden über eine modifizierte Griess-Reaktion mit *high performance liquid chromatography* (*HPLC*) gemessen (67, 70). Zum Monitoring hepatozellulärer Schäden infolge der akuten Abstoßungsreaktion wurden die klinisch etablierten Leberfunktionsparameter herangezogen (171). Die semiquantitative Auswertung der konventionellen Histologie diente als Grundlage der Klassifikation des Abstoßungsgrades, entsprechend der für humane Lebertransplantate gültigen Einteilung nach *Snover* (60, 96, 107, 166, 174-176).

Wie bereits in Herz- und Lungentransplantationsmodellen gezeigt wurde, ist eine akute Transplantatabstoßung mit einem simultanen Anstieg von NO (reflektiert durch die stabilen Endprodukte im Serum NO^{2-}/NO^{3-} in μM) assoziiert (205, 206). Darüberhinaus wurde bei Rattenlebertransplantatabstoßung mittels *in situ*-Hybridisierung eine hochregulierte *iNOS*-Genexpression sowohl in den infiltrierenden Leukozyten als auch in den Hepatozyten beobachtet (111). Daher war das Ziel dieser tierexperimentellen Studie, die Rolle von NO-Antagonisten nach *oRLTx* zu charakterisieren. Es wurde postuliert, daß sich eine Reduzierung von NO bei Empfängertieren (*ET*) protektiv im Sinne einer signifikant längeren Transplantatüberlebenszeit auswirken könnte.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Behandlung der *ET* (Gr. IV und V) mit dem *iNOS*-Inhibitor Aminoguanidinhydrochlorid (*AGH*) zu einer signifikanten Erniedrigung der NO^{2-}/NO^{3-} -Konzentration im Serum führt (unbehandelte *ET* $88,1 \pm 4,1 \mu M$ vs. *AGH*-behandelten-*ET* $27,0 \pm 2,5 \mu M$, $p \leq 0,05$).

Desweiteren zeigten die Messwerte der Enzymaktivitäten in den Gr. I (syngene Kontrollgruppe), Gr. III (*FK506* immunsupprimierte Kontrollgruppe) und in den mit *AGH*-behandelten Gruppen IV (Kombinationstherapie mit *FK506-low dose* und *AGH*) und Gr. V (*AGH*-Substitution) ab dem 5. postoperativen Tag eine tendenzielle Normalisierung der

Leberfunktionsparameter, reflektiert durch Enzymaktivitäten von GOT, GIDH, AP und PchE im Serum. Im Gegensatz dazu zeigten unbehandelte allogene ET (Gr. II) bereits ab dem 5. Tag signifikant höhere Werte an GOT (1135 ± 316 U/l), AP (344 ± 90 U/l) und Bilirubin ($6,7\pm 0,4$ mg/dl) sowie am 10. Tag eine Reduktion der Lebersyntheseparameter (PchE 570 ± 30 U/l; Albumin $0,6\pm 0,1$ g/dl) (*Abb. 17-20, Tab. 7-11*).

Bei den AGH-behandelten ET (Gr. V) wurden bis zum 8. Tag keine signifikanten Unterschiede, verglichen mit den ET der Gr. I und III, beobachtet. Im weiteren Verlauf (am 8. und 10. Tag) kam es zu einem signifikanten Anstieg von GOT (364 ± 52 U/l), AP (412 ± 58 U/l), Bilirubin ($2,9\pm 0,7$ mg/dl) sowie Verminderung von PchE (970 ± 130 U/l) und Albumin ($3,0\pm 0,6$ g/dl) im Serum.

Darüberhinaus verglichen wir die Ergebnisse von Protein- und Aktivitätsmessungen zytoplasmatischer CYP-Isoenzyme 1A1, 1A2, 2E1 und 3A4 der jeweiligen Gruppen als Ausdruck der mikrosomalen Leberfunktion. Erwartungsgemäß zeigten die am Lebermetabolismus beteiligten Cytochrome P450 bei den mit AGH-behandelten ET signifikant höhere Umsätze als in der allogenen unbehandelten Kontrollgruppe (Gr. II). In unseren Versuchen reduzierte sich die Aktivität von 1A1, 1A2, 2E1 und 3A4 bei der akuten Abstoßung (allogene Kontrollgruppe, Gr. II) bereits am 5. postoperativen Tag und erreichte am 10. postoperativen Tag die Werte wie folgt: 28,6%, 34,5%, 92,9%, 0,07% (Gr. II vs. Gr. I) (*Tab. 13-16, pmol/min/mg*). Im Gegensatz dazu zeigte die Aktivitätsmessung der Isoenzyme 2E1 und 3A4 in der AGH-behandelten Gruppe (Gr. V) signifikant höhere Werte (7,9% bzw. 7,26%, Gr. V vs. Gr. I, $p < 0,02$), was in diesem Modell eine transplantatprotektive Wirkung von AGH als selektiven iNOS-Inhibitor auf die mikrosomale Leberfunktion wahrscheinlich macht. Die gute Vergleichbarkeit von Daten innerhalb und zwischen den verschiedenen Gruppen zeigte die hohe Validität der verwendeten Meßsysteme. Die ermittelten quantitativen speziesspezifischen Unterschiede bei Mensch und Ratte demonstrieren jedoch sehr deutlich, daß die Exploration von Daten aus Tierversuchen auf die Situation beim Menschen nur bedingt möglich ist.

Des weiteren wurde bei allen AGH-behandelten ET bis zum 8. postoperativen Tag mittels laborchemischer und (immun)histologischer Untersuchungen eine signifikant bessere Transplantatfunktion/Struktur im Vergleich zu unbehandelten allogenen Transplantierten (Gr. II) festgestellt. Bei den AGH-behandelten ET (Gr. IV und V) zeigte sich am 5. und 8. Tag zum Teil keine Abstoßungsreaktion (2 von 13 ET, 15%) (*Abb. 23-d*). Andere Fälle wiesen

jedoch eine akute Abstoßungsreaktion entsprechend Grad 1 bis 2 auf. Die Abstoßung der Transplantate trat im Vergleich zu Gr. II später auf und war teilweise schwächer ausgeprägt. Desweiteren wurden in einzelnen Gewebsschnitten ab dem 8. postoperativen Tag fokale Nekrosen, Hämorrhagien und intravasale Thromben bei insgesamt einer mäßigen, entzündlichen Zellaktivität beobachtet. Am 10. postoperativen Tag war die Abstoßungsreaktion der AGH-behandelten ET immer noch deutlich schwächer ausgeprägt als die der unbehandelten allogenen Transplantierten (Gr. II). Während die ET in der Gr. II praktisch kein vitales Leberparenchym, sondern nur noch Nekrosen in Abräumung und Organisation zeigten (*Abb. 24-b*), waren in der AGH-behandelten Lebern noch größere erhaltene Leberparenchymreste erkennbar (*Abb. 24-d*).

Die immunhistochemischen lichtmikroskopischen Untersuchungen unter Verwendung von monoklonalen Anti-CD11,- -CD8- und -ED1-Antikörpern zeigten in allen Gruppen qualitativ sowie semiquantitativ eine Korrelation mit den in HE-Färbung festgestellten Transplantatveränderungen. Dabei war die Infiltration der Gewebsschnitte mit immunkompetenten Effektorzellen bei den AGH-behandelten ET (Gr. IV und V) deutlich weniger ausgeprägt als bei den unbehandelten allogenen ET (Gr. II).

Darüberhinaus wies die später aufgetretene und teilweise schwächer ausgeprägte akute Transplantatabstoßung (Gr. V vs. II) mit einer konsekutiven hepatischen Dysfunktion eine positive Korrelation mit dem im Serum festgestellten NO-Anstieg auf (92). Der nach Lebertransplantation im Serum meßbare Konzentrationsanstieg der stabilen Endprodukte der iNOS-Synthase ($\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$) korrelierte mit dem Ausmaß der akuten Abstoßungsreaktion (Gr. II, IV und V). In der Gr. II mit zeitgerechter akuten Abstoßung ($11,2 \pm 1,8$ Tage) und damit größerer hepatozellulärer Schädigung war die $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ -Konzentration im Serum in stärkerem Ausmaß angestiegen als bei ET in den Gr. IV und V, die mit AGH behandelt wurden (41). Diese Tatsache läßt schlußfolgern, das iNOS unterschiedlich auf hepatozelluläre Schädigung reagiert. Bei geringeren Schäden, wie in den Gr. IV und V, zeigte sich bis zum 8. postoperativen Tag kein wesentlicher Konzentrationsanstieg von $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ (Gr. V: $57,2 \pm 8,3$ μM vs. Gr. II: $505,6 \pm 126,2$ μM). Somit stellt die Serumkonzentration von $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$ offensichtlich einen wichtigen Indikator für deutlicher ausgeprägte hepatozelluläre Schäden dar, da sie nur in der Gr. II, in der die größte hepatozelluläre Schädigung entstand, über den ganzen Beobachtungszeitraum ($11,4 \pm 1,3$ Tage) signifikant angestiegen war (41). Anhand der Aktivitätsverlaufs von anderen klinisch etablierten Leberfunktionsparameter ließ sich der momentane Zustand der hepatozellulären Membranintegrität nur zeitverzögert beurteilen. Für

das intensivmedizinische Monitoring nach Lebertransplantation ist dies aber weniger geeignet, wenn kurzfristig neue Schädigungen der Leber nicht so genau quantitativ erfaßt werden können.

Daher kann sich die Serumkonzentration von $\text{NO}^{2-}/\text{NO}^{3-}$ zur Kontrolle des aktuellen Zustandes der transplantierten Leber eignen und sich als Indikator bei der prospektiven Beurteilung der Leberschädigung bewähren, wenngleich sie es nicht erlaubt zwischen Abstoßung, Infektion oder Ischämieschäden zu differenzieren

Trotz der gezeigten initial transplantatprotektiven Auswirkungen der iNOS-Inhibition am 5. und 8. postoperativen Tag wurde kein signifikant längeres Überleben bei den mit AGH-behandelten ET (Gr.V) erreicht (205, 206). Die ET der Gr. IV und V verstarben nach $11,7 \pm 1,7$ bzw. $11,4 \pm 1,3$ Tagen infolge eines vermutlich akuten Ereignisses. Die histologischen Untersuchungen zeigten massive hämorrhagische und anämische Leberareale, vereinbar mit multifokalen frischen hämorrhagischen bzw. anämischen Infarktzone sowie Thrombozytenaggregate sowohl in den Arteriolen, als auch in den prä- und postsinusoidalen Venolen (57). Dieser Tatsache kommt offensichtlich in Zusammenhang mit iNOS-Hemmung eine erhebliche pathophysiologische Bedeutung zu: die klinischen Auswirkungen in der vorliegenden Arbeit werden in folgendem diskutiert.

Bekannterweise ist das gesamte Gefäßsystem mit einer geschlossenen, einschichtigen Lage flacher Endothelzellen ausgekleidet. Bis in die Mitte der 60-er Jahre betrachtete man das Endothel lediglich als mechanische Barriere zum Schutz der Gefäßwand, die weitgehend stoffwechselaktiv ist. Als dann jedoch die Kultivierung isolierter Endothelzellen gelang, konnte man in zahlreichen Studien nachweisen, daß das Endothel eine hochaktive Zellschicht mit einer Vielzahl von Stoffwechselfunktionen ist (22). Das erklärt auch, daß die Gesamtheit aller Endothelzellen in bezug auf Menge und Gewicht praktisch einem Körperorgan gleichkommt. Vorwiegend bestehen die Aufgaben des Endothels in der Regulation des Gefäßtonus sowie in einer Hemmung der Plättchenaggregation und Verhinderung von Thromben. Eine besondere Bedeutung kommt der NO-Synthese zu. Experimentell konnte festgestellt werden, daß NO auch für die Vasodilatation verantwortlich ist (51, 55, 139). Vom Endothel freigesetztes NO diffundiert in die glatten Muskelzellen der Gefäße oder in die Thrombozyten, die Endothelkontakt haben, und stimuliert dort das gelöst vorliegende Enzym Guanylatzyklase. Dies führt zu einer Erhöhung des cGMP-Spiegels in der glatten Muskelzellen und in den Thrombozyten. Der unmittelbare Zusammenhang zwischen einer

cGMP-Spiegelerhöhung und einer Muskelrelaxation bzw. Plättchenaggregationshemmung konnte mehrfach belegt werden (131).

Diese regulativen Aufgaben können jedoch nur wahrgenommen werden, solange das Endothel unbeschädigt ist. Während des Wandkontakts der Thrombozyten an den Endothelzellen wird die Freisetzung von NO stimuliert; dieses kann dann in die Blutplättchen eindringen und die Neigung zur Aggregation unterdrücken. Ein bisher nicht ausführlich erwähnter, aber wichtiger Mechanismus der NO-Freisetzung besteht in der mechanischen Reizung der Endothelzellen durch die Blutströmung: Zum einen geschieht diese durch die pulsabhängige Dehnung der Arterienwand, zum anderen durch Scherkräfte, die das vorbeiströmende Blut auf die Endothelzellen ausübt. Somit wird NO durch die Blutströmung an den Endothelzellen ständig produziert und leistet einen wichtigen Beitrag zur Plättchenaggregationshemmung bereits unter physiologischen Bedingungen (131). *Busse* konnte experimentell nachweisen, daß EDRF (frühere Bezeichnung für NO) verstärkt in Richtung der glatten Gefäßmuskulatur und weniger zum Blutgefäßlumen hin freigesetzt wird (22). Das bedeutet, daß NO dort vermehrt vorhanden ist, wo er in erster Linie benötigt wird, nämlich in den Gefäßmuskulaturzellen und in geringem Maße im Gefäßlumen. Dort ist lediglich eine geringe Basalfreisetzung nachweisbar, die nur dann erhöht wird, wenn Blutplättchen mit dem Endothel in Kontakt treten (22). Vor allem die Blutplättchen, wenn sie aktiviert werden und zur Aggregation neigen, setzen Stoffe frei, die starke vasokonstriktive Eigenschaften zeigen, u.a. Adenosindiphosphat, Serotonin und Plättchen aktivierenden Faktor. Die Freisetzung von Thromboplastin setzt die Gerinnungskaskade in Gang und läßt vasokonstriktorisches Thrombin entstehen. Die erhöhte Konzentration dieser Substanzen führt zur Produktion, Freisetzung und Abgabe von NO in die glatten Muskelzellen der Gefäße. Die Folge ist dann jedoch keine Vasokonstriktion, sondern eine Vasodilatation, um den Blutfluß zu erhöhen und um Blutplättchenaggregate oder Thromben wegzuspülen.

Eine komplett fehlende oder unzureichende lokale NO-Bildung kann also nicht durch freizirkulierendes NO ausgeglichen werden. Mit einer verringerten Bildung von NO sind die antithrombotischen Endothel-eigenschaften vermindert, was die Neigung zur lokalen Plättchenaggregation weiter erhöht. Hinzu kommt, daß aufgrund fehlender NO-Gegenregulation die Plättchenfreisetzungserzeugnisse direkt gefäßkonstriktorisches wirken, während sie bei intaktem Endothel eine Vasodilatation zur Folge hätten. Der natürliche Kompensationsmechanismus wie angepaßte Weitstellung der Gefäße ist bei niedrigem basalem NO-Spiegel nicht mehr ausreichend möglich, so daß die Gefäße in einer Engstellung verharren: Folgen sind die Zunahme der Ischämie und Verstärkung der

Thrombozytenaggregation (56). Der NO-Mechanismus ist somit bei der Regulation der Gewebedurchblutung von Bedeutung. Diese Tatsache läßt schlußfolgern, daß ein NO-Mangel-Zustand offensichtlich eine Schlüsselrolle der in der vorliegenden Arbeit zu beobachteten histologischen Veränderungen einnimmt.

Somit konnte offensichtlich die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten infolge iNOS-Inhibierung in den transplantierten Lebern in kausalem Zusammenhang mit der Leberperfusionsstörung und konsekutiv mit frischen umschriebenen Leberinfarktarealen als Folge der Inhomogenisierung des mikrovaskulären Blutflusses stehen. Vor allem die für Thrombozyten charakteristische Adhäsion in den Arteriolen und Venolen führte offensichtlich über eine Gefäßstenosierung oder –okklusion zur einer Beeinträchtigung der hepatischen Perfusion. Durch die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren könnten Thrombozyten andererseits für die Rekrutierung von Leukozyten und für die Entstehung einer Entzündungsreaktion mitverantwortlich sein. Die genaue Bedeutung der in Thrombozyten konstitutiv exprimierten iNOS für die Plättchenadhäsion und –aggregation ist jedoch bislang nicht gänzlich geklärt. Prinzipiell könnten sowohl iNOS als auch eNOS für die thrombozytäre NO-Synthese ausschlaggebend sein. Im Vergleich zur eNOS ist jedoch die von iNOS produzierte NO Menge *pro Mol* Enzym um den Faktor 1000 größer.

Unsere Ergebnisse zeigen somit, daß die Inhibierung der iNOS einerseits zu einer histologisch gesicherten Verzögerung der akuten Abstoßungsreaktion, andererseits zur Modulierung der Thrombozytenaggregation führt. Wie bereits gezeigt wurde äußert sich die NO-abhängige Thrombozyten-Inaktivierung in einer verminderten Plättchenaktivierbarkeit (56, 131). Daneben verhindert NO die Expression von Adhäsionsmolekülen wie *P-Selektin* und blockiert die Thrombozytenaggregation und –adhäsion an Endothelzellen.

Daher scheint nicht nur in den Thrombozyten konstitutiv exprimierte iNOS an der Regulation der Plättchen-Endothelzell und Plättchen-Plättchen Interaktion beteiligt zu sein.

Um die Frage, ob eine selektive iNOS-Inhibierung das Transplantat vor der akuten Abstoßungsreaktion protektioniert definitiv beantworten zu können, sind weitere *in vivo* Untersuchungen im Model der oRLTx erforderlich. Dabei sollen die mikrozirkulatorische Störungen des Transplantaes bereits im Vorfeld ausgeschlossen werden (z.B. Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmer wie *Acetylsalizylsäure* oder *P-Selektin-Antagonisten*).

Um die Frage nach der klinischen Bedeutung dieser Ergebnisse in bezug auf die immunsuppressive Wirksamkeit der NO-Hemmung zu beantworten, müssen weitere Studien abgewartet werden. Die vorliegenden Daten zeigen jedoch, daß unter Betrachtung des gesamten Wirkspektrums, das NO-Antagonisten und prinzipiell FK aufweisen, therapierelevante Unterschiede bestehen könnten.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde die Rolle von Stickoxid (*NO*) nach orthotoper Lebertransplantation im Rattenmodell (*oRLTx*) untersucht. Wie bereits in Herz- und Lungentransplantationsmodellen gezeigt wurde, ist eine akute Transplantatabstoßung mit einem simultanen Anstieg von NO (reflektiert durch die stabilen Endprodukte im Serum $\text{NO}^{-2}/\text{NO}^{-3}$ in μM) assoziiert. Darüberhinaus wurde bei Rattenlebertransplantatabstoßung mittels *in situ*-Hybridisierung eine hochregulierte iNOS-Genexpression sowohl in den infiltrierenden Leukozyten als auch in den Hepatozyten beobachtet. Daher war das Ziel dieser tierexperimentellen Studie, die Rolle von NO-Antagonisten nach *oRLTx* zu charakterisieren. Es wurde postuliert, daß sich eine Reduzierung von NO bei Empfängertieren (*ET*) protektiv im Sinne einer signifikant längeren Transplantatüberlebenszeit auswirken könnte.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Behandlung der *ET* (Gr. V) mit dem iNOS-Inhibitor Aminoguanidinhydrochlorid (*AGH*) zu einer signifikanten Erniedrigung des $\text{NO}^{-2}/\text{NO}^{-3}$ -Spiegels im Serum führt.

Desweiteren wurde bei allen *AGH*-behandelten *ET* bis zum 8. postoperativen Tag mittels laborchemischer und (immun)histologischer Untersuchungen eine signifikant bessere Transplantatfunktion und -struktur im Vergleich zu unbehandelten *allogen* Transplantierten (Gr. II) festgestellt. Die später aufgetretene und teilweise schwächer ausgeprägte akute Transplantatabstoßung (Gr. V vs. II) mit einer konsekutiven hepatischen Dysfunktion korrelierte mit dem NO-Anstieg im Serum. Darüberhinaus war bei den *AGH*-behandelten *ET* (am 8. und 10. postoperativen Tag) die Expression von CD11,- CD8- und ED1-positivem Zellmaterial deutlich geringer ausgeprägt als bei den unbehandelten *allogenen* *ET* (Gr. II).

Trotz der gezeigten initial transplantatprotektiven Auswirkungen der iNOS-Inhibition am 5. und 8. postoperativen Tag wurde kein signifikant längeres Überleben bei den

mit AGH-behandelten ET (Gr. IV vs. Gr. II) erreicht. Desweiteren konnte kein Synergismus bezüglich der immunsuppressiver Wirksamkeit zwischen AGH und FK 506 nachgewiesen werden (Gr. IV vs. Gr. II).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen somit, daß eine selektive Inhibition von iNOS nach oRLTx nicht vor einem frühzeitigen Transplantatverlust protektioniert.

6. Danksagung

Zum Schluß bleibt mir nur noch die angenehme Pflicht, mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C-D. Heidecke für die Aufnahme und Integration in seiner Arbeitsgruppe sowie für die Unterstützung während der experimentellen Arbeit und der Abfassung des Manuskriptes zu bedanken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München für die aktive Teilnahme bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit. Insbesondere danke ich dem Direktor des Instituts, Herrn Univ. Prof. Dr. med. Gänsbacher, Herrn Prof. Dr. med. vet. Erhard, stellvertretend für die Veterinärmediziner des Instituts, Fr. Pichotka, Fr. Polheimer, Fr. Hartl, stellvertretend für OP-Pflegekräfte, sowie allen anderen, die dazu beitrugen, den mikrochirurgischen Arbeitsplatz bereitzustellen.

Ein weiterer Dank gilt den Hr. A. Pauli, Fr. R. Bergmair und allen Mitarbeitern der Tierhaltung für die überaus liebenswürdige Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Experimente.

Von entscheidender Bedeutung waren in der Anfangsphase der Experimente die wertvollen Hinweise zur Narkosedurchführung sowie postoperativer Therapie seitens Hr. Prof. Dr. med. R. Hipp, Hr. PD Dr. med. M. Hargasser und Fr. D. Dröse vom Institut für Anästhesiologie der TU München. Hierfür möchte ich mich bei ihnen besonders bedanken.

Meinen ehemaligen Mitdoktoranden Hr. Dr. med. N. Zantl, Hr. Dr. med. S. Maier, Fr. Dr. med. A. Westerholt, Fr. N. Chambron, Hr. M. Veit und Hr. K. Gerauer danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Versuche sowie bei der Auswertung der Ergebnisse.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Fr. S. Himpel, Fr. T. Fleischmann, Fr. F. Altmayr, Fr. S. Kaiser-Moor sowie Fr. C. Fizi für ihren Einsatz bei der Aufarbeitung der Organe, Hilfestellung bei der Durchführung der Immunhistologie und für die „computer-technische“

Hilfsbereitschaft während der gesamten Dauer meiner Dissertation bin ich zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. M. Werner vom Institut für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung von konventionellen Färbungen und Auswertung der Histologie.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meiner Ehefrau Dr. med Sinitsina Inga bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und über schwere Phasen dieser Arbeit hinweggeholfen hat.

Vielen Dank Allen, die dazu beigetragen haben, daß diese Arbeit vollendet werden konnte.

Literaturverzeichnis

1. Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS (1993): Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transpl* 55 (4):752-756; discussion 756-757
2. Anton LC, Yewdell JW, Bennink JR (1997): MHC class I-associated peptides produced from endogenous gene products with vastly different efficiencies. *J Immunol* 158 (6): 2535-2542
3. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977): Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3' 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparation. *Proc Natl Acad Sci USA* (74): 3203-3207
4. Bader A, Rinkes IH, Closs EI, Ryan CM, Toner M, Cunningham JM, Tompkins RG, Yarmush ML (1992): A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic processes: cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnol Prog* 8(3): 219-225
5. Barrett M, Milton AD, Barrett J, Taube D, Bewick M, Parsons VP, Fabre JW (1987): Needle biopsy evaluation of class II major histocompatibility complex antigen expression for the differential diagnosis of cyclosporine nephrotoxicity from kidney graft rejection. *Transpl* 44 (2): 223-227
6. Basham TY, Merigan TC (1983): Recombinant interferon-gamma increases HLA-DR synthesis and expression. *J Immunol* 130 (4): 1492-1494
7. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA (1990): Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(4): 1620-1624
8. Bijur S (1996): Current concepts in the immunology of allograft rejection. *Indian J Med Sci* 50 (1): 13-19
9. Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stadler J, Williams DL, Ochoa JB, Di Silvio M, Simmons RL, Murray SA (1992): Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes. *Am J Physiol* 262(4 Pt 1): 1077-1082
10. Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, West MA, Bentz BG, Simmons RL (1989): An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med* 169(4): 1467-1472
11. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987): The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329 (6139): 512-518

12. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987): Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329 (6139): 506-512
13. Böcker KHW, Manns MP (1993): Indikation und Ergebnisse-die Lebertransplantation aus internistischer Sicht. *Gastrologia-Report*: 3-16
14. Bogle RG, Moncada S, Pearson JD, Mann GE (1992): Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transporter. *Br J Pharmacol* 105(4):768-770
15. Brecht DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH (1991): Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351(6329): 714-718
16. Brecht DS, Snyder SH (1989): Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(22): 9030-9033
17. Brölsch ChE, Neuhaus P, Pichlmayr R (1982): Gegenwärtiger Stand der Lebertransplantation. *2 Gastroenter* 20, *Verh. Bd* 17, 117-122
18. Brölsch ChE, Neuhaus P, Wonigeit K, Pichlmayr R (1984): Lebertransplantation: Wunschdenken oder Realität. *Therapie* 34: 4033-4037
19. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364 (6432): 33-39
20. Buchmuller-Rouiller Y, Schneider P, Betz-Corradin S, Smith J, Muel J (1992): 3-amino-2,4-triazole inhibits macrophage NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 183(1): 150-155
21. Buer J, Aifantis I, DiSanto JP, Fehling HJ, von Boehmer H (1997): Role of different T cell receptors in the development of pre-T cells. *Exp Med* 185 (9): 1541-1547
22. Busse R, Trogisch G, Bassenge E (1985): The role of endothelium in the control of vascular tone. *Basic Res Cardiol* 80: 475-480
23. Cai B, Roy DK, Sciacca R, Michler RE, Cannon PJ (1995): Effects of immunosuppressive therapy on expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) during cardiac allograft rejection. *Int J Cardiol* 50(3): 243-251
24. Carlson TJ, Billings RE (1996): Role of nitric oxide in the cytokine-mediated regulation of cytochrome P450 (49): 796-801
25. Cassoly R, Gibson QA (1975): Conformation, co-operativity and ligand binding in human hemoglobin. *J Mol Biol* (91): 301-313

26. Castaing D, Houssin D, Bismuth H. (1980): Anatomy of the liver and portal system of the rat. In: hepatic and portal surgery in the rat. Masson, Paris, Kptl. III, 27-45
27. Cerra FB (1987): Hypermetabolism, organ failure and metabolic support. *Surg* 101(1): 1-14
28. Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster R Jr, Williamson JR, McDaniel ML (1992): Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 41(4): 552-556
29. Corbett JA, McDaniel ML (1996): Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Methods Enzymol* 268: 398-408
30. Cox RD (1980): Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence. *Analyt Chem* 52: 332-335
31. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL (1989): Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 170(5): 1769-1774
32. Curran RD, Ferrari FK, Kispert PH, Stadler J, Stuehr DJ, Simmons RL, Billiar TR (1991): Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J* 5(7): 2085-2092
33. Czitrom AA (1996): The immune response: the afferent arm. *Clin Orthop* (326): 11-24
34. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ (1984): The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transpl* 38 (3): 293-298
35. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW, Ting A, Morris PJ (1984): The detailed distribution of HLA-A, B, C antigens in normal human organs. *Transpl* 38 (3): 287-292
36. Dausset J(1981): The major histocompatibility complex in man. *Science* 213 (4515): 1469-1474
37. Decurtius M (1993): Lebertransplantation, *Sandorama* 3: 4-10
38. Demetriou AA, Whiting J, Levenson SM, Chowdhury NR, Schechner R, Michalski S, Feldman D, Chowdhury JR (1986): New method of hepatocyte transplantation and extracorporeal liver support. *Ann Surg* 204(3): 259-271
39. Demetris AJ, Lasky S, Van Thiel DH, Starzl TE, Dekker A (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
40. Deng Y, Yewdell JW, Eisenlohr LC, Bennink JR (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

41. Devlin J, Palmer RM, Gonde CE, O'Grady J, Heaton N, Tan KC, Martin JF, Moncada S, Williams R (1994): Nitric oxide generation. A predictive parameter of acute allograft rejection. *Transpl.* 58(5): 592-595
42. Ding A, Nathan C (1988): Analysis of the nonfunctional respiratory burst in murine Kupffer cells. *J Exp Med* 167(3): 1154-1170
43. Dippe BE, Broelsch CE, Krueger SB, Richter ON, Petrowsky H, Kreisel D, Von Heimburg DO, Schneider M, Hanisch EW, Wenisch HJ, et al (1992): An improved model for rat liver transplantation including arterial reconstruction and simplified microvascular suture techniques. *J Invest Surg* 5(4): 361-373
44. Drapier JC, Hibbs JB Jr (1988): Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 140(8): 2829-2838
45. Drapier JC, Pellat C, Henry Y (1991): Generation of EPR-detectable nitrosyl-iron complexes in tumor target cells cocultured with activated macrophages. *J Biol Chem* 266(16): 10162-10167
46. Emmerson JB, Trenio J (1983): Boxplots and batch comparison. In: Houglin DC, Morteller F, Tukey JW (Hrsg.) *Understanding robust and exploratory data analysis.* Verlag John Willy, New York: 58-96
47. Engemann R (1985) Technique for orthotopic rat liver transplantation. In: Thiede A et al (Hrsg) *Microsurgical models in rats for transplantation research.* Springer Verlag, Berlin: 69-75
48. European FK506 Multicentre Liver Study Group (1994): Reduced incidence of acute, refractory acute, and chronic rejection after liver transplantation with FK506-based immunosuppression. *Transplant Proc* 26(6): 3260-3263
49. Fabrega E, Casafont F, de la Pena J, Berrazueta JR, de las Heras G, Amado JA, Pons-Romero F (1997): Nitric oxide production in hepatic cell rejection of liver transplant patients. *Transplant Proc* 29(1-2): 505-506
50. Fiore M, Mitchell J, Doan T, Nelson R, Winter G, Grandone C, Zeng K, Haraden R, Smith J, Harris K, et al (1988): The Abbott IMx automated benchtop immunochemistry analyzer system. *Clin Chem* 34(9): 1726-1732
51. Forstermann U, Mulsch A, Bohme E, Busse R (1986): Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res* 58(4): 531-538

52. Grenier FC, Luczkiw J, Bergmann M, Lunetta S, Morrison M, Blonski D, Shoemaker K, Kobayashi M (1991): A whole blood FK 506 assay for the Imx analyzer. *Transplant Proc* 23(6): 2748-2749
53. Frenzel H, Kremer B, Richter I-E und H Hücker (1976): Der Einfluß des Perfusionsdruckes bei der Perfusionsfixation auf die Feinstruktur der Lebersinusoide. Transmissions- und rasterelektronmikroskopische Untersuchung. *Res Exp Med* 168: 229-241
54. Fuggle SV, McWhinnie DL, Chapman JR, Taylor HM, Morris PJ (1986): Sequential analysis of HLA-class II antigen expression in human renal allografts. Induction of tubular class II antigens and correlation with clinical parameters. *Transpl* 42 (2):144-150
55. Furchgott RF (1983): Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 53(5): 557-573
56. Furlong B, Henderson AH, Lewis MJ, Smith JA (1987): Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 90(4): 687-692
57. Gao W, Lemasters JJ, Thurman RG (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. *Transpl.* 56(1): 19-24
58. Garfinkel D. (1958): Isolation and properties of the cytochrome b5 from pig liver. *Archs Biochem Biophys* 77: 737-744
59. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR (1993): Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(2): 522-526
60. Geneser CJ (1990): *Histologie*. Deutsche Ärzte-Verlag, Köln, 450-463
61. Gerlach J, Kloppel K, Schauwecker HH, Tauber R, Muller C, Bucherl ES (1989): Use of hepatocytes in adhesion and suspension cultures for liver support bioreactors. *Int J Artif Organs* 12: 788-792
62. Gordon RD and Bismuth H (1991): Liver transplant registry report. *Transplant Proc* 23: 58-60
63. Goto M, Yamaguchi Y, Ichiguchi O, Miyanari N, Akizuki E, Matsumura F, Matsuda T, Mori K, Ogawa M (1997): Phenotype and localization of macrophages expressing inducible nitric oxide synthase in rat hepatic allograft rejection. *Transplant* 64(2): 303-310
64. Granger DL, Lehninger AL (1982): Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol* 95(2 Pt 1): 527-535

65. Green CJ. (1982): Animal anaesthesia. Laboratory animal handbooks, London, pp: 154-160
66. Green LC, Tannenbaum SR, Goldman P (1981): Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 212 (4490): 56-58
67. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982): Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126(1): 131-138
68. Greim H, Deml E. (1996): Toxikologie. Eine Einf. F. Naturwiss. und Mediziner. Greim H, Deml E (Eds.) Weinheim: VCH
69. Grenier FC, Luczkiw J, Bergmann M, Lunetta S, Morrison M, Blonski D, Shoemaker K, Kobayashi M (1991): A whole blood FK 506 assay for the Imx analyzer. *Transplant Proc* 23(6): 2748-2749
70. Griess P (1879): Bemerkung zu der Abhandlung von HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Ber Dtsch Chem Ges* 1: 426-428
71. Griffiths MJ, Messent M, McAllister RJ, Evans TW (1993): Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 110(3): 963-968
72. Gross SS, Stuehr DJ, Aisaka K, Jaffe EA, Levi R, Griffith OW (1990): Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun* 170(1): 96-103
73. Gubernatis G, Kemnitz J, Bornscheuer A, Kuse ER, Pichlmayr R (1989): Potential various appearances of hyperacute rejection in human liver transplantation. *Langenbecks Arch Chir* 374 (4): 240-244
74. Hare JM, Colucci WS (1995): Role of nitric oxide in the regulation of myocardial function. *Prog Cardiovasc Dis* 38(2): 155-166
75. Harris HW, Gill TJ 3d (1986): Expression of class I transplantation antigens. *Transpl* 42 (2): 109-117
76. Hasuike Y, Monden M, Valdivia LA, Kubota N, Gotoh M, Nakano Y, Okamura J, Mori T (1988): A simple method for orthotopic liver transplantation with arterial reconstruction in rats. *Transpl.* 45(4): 830-832
77. Hauschildt S, Luckhoff A, Mulsch A, Kohler J, Bessler W, Busse R (1990). Induction and activity of NO synthase in bone-marrow-derived macrophages are independent of Ca^{2+} *Biochem J* 270(2): 351-356
78. Hayry P, Isoniemi H, Yilmaz S, Mennander A, Lemstrom K, Raisanen-Sokolowski A, Koskinen P, Ustinov J, Lautenschlager I, Taskinen E, et al (1993): Chronic allograft

- rejection. *Immunol Rev* 134: 33-81
79. Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A (1993): EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 7(12): 1124-1134
 80. Heublein B, Haverich A, Borst HG (1990): Long-term follow-up after orthotopic heart transplantation. *Thorac Cardiovasc Surg* 38 (5): 285-290
 81. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z (1987): Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235(4787): 473-476
 82. Hibbs JB Jr, Vavrin Z, Taintor RR (1987): L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138(2): 550-565
 83. Hoffman RA, Langrehr JM, Billiar TR, Curran RD, Simmons RL (1990): Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *J Immunol* 145(7): 2220-2226
 84. Hoelscher M, Groenewoud AF (1991): Current status of the HTK solution of Bretschneider in organ preservation. *Transplant Proc* 23(5): 2334-2337
 85. Hood L, Steinmetz M, Goodenow R (1982): Genes of the major histocompatibility complex. *Cell* 28 (4): 685-687
 86. Hood L, Steinmetz M, Goodenow R, Eakle K, Fisher D, Kobori J, Malissen B, Malissen M, McMillan M, McNicholas J, Orn A, Pecht M, Sher BT, Smith L, Stroynowski I, Sun H, Winoto A, Zuniga M (1983): Genes of the major histocompatibility complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 47 Pt 2: 1051-1065
 87. Hood L, Steinmetz M, Malissen B (1983): Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. *Annu Rev Immunol* 1: 529-568
 88. Hori M (1988): Will artificial liver therapy ever become a reality? Historical aspects and future prospects of the artificial liver. *Artif Organs* 12(4): 293-295
 89. Howard TK, Klintmalm GB, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA (1990): The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplant* 49(1): 103-107
 90. Hunton DE (1990): Erosion und Leuchterscheinungen am Space Shuttle. *Spectrum der Wissenschaften* Jan: 100-107
 91. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987): Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(24): 9265-9269

92. Ioannidis I, Hellinger A, Dehmlow C, Rauhen U, Erhard J, Eigler FW, De Groot H (1995). Evidence for increased nitric oxide production after liver transplantation in humans. *Transpl* 59(9): 1293-1297
93. Janssens SP, Simouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD (1992): Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267(31): 226-294
94. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Chi YI, Stauffacher C, Strominger JL, Wiley DC (1994): Three-dimensional structure of a human class II histocompatibility molecule complexed with superantigen. *Nature* 368 (6473): 711-718
95. Joly GA, Ayres M, Chelly F, Kilbourn RG (1994): Effects of NG-methyl-L-arginine, NG-nitro-L-arginine, and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 199(1): 147-154
96. Junqueira LC, Carneiro J. (1991): *Histologie*. Springer Verlag, Berlin, Kptl 21: 231-246
97. Kamada N (1987): Technique in the rat. In: Calne RY(ed.), *Liver transplantation*, Grune&Stratton, Orlando, Kptl 4, pp. 25-34
98. Kamada N, Calne RY (1979): Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transpl*. 28(1): 47-50
99. Kamada N, Calne RY (1983): A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat *Surg*. 93: 64-69
100. Kanner J, Harel S, Granit R (1991): Nitric oxide as an antioxidant. *Arch Biochem Biophys* 289(1): 130-136
101. Katsuki S, Arnold WP, Murad F (1977): Effects of sodium nitroprusside, nitroglycerin, and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues. *J Cyclic Nucleotide Res* 3(4): 239-247
102. Kennedy EM, Wood RP, Shaw BW Jr (1990): Primary nonfunction. Is there a contribution from the back table bath? *Transpl* 49(4): 739-743
103. Khatsenko OG, Boobis AR, Gross SS (1997): Evidence for nitric oxide participation in down-regulation of CYP2B1/2 gene expression at the pretranslational level. *Tex Let* (90): 207-216
104. Kilbourn RG, Belloni P (1990): Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J Natl Cancer Inst* 82(9): 772-776
105. Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP, Fjeldborg O (1966): Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 2 (7465): 662-665

106. Klingenberg M (1958): Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75: 376-386
107. Knoche H. (1979): *Lehrbuch der Histologie*, Springer-Verlag, Berlin: 256-263
108. Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S (1989): Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(13): 5159-5162
109. Kruisbeek AM (1993): Development of alpha beta T cells. *Curr Opin Immunol* 5(2): 227-234
110. Kuo PC, Alfrey EJ, Abe KY, Huie P, Sibley RK, Dafoe DC (1996): Cellular localization and effect of nitric oxide synthesis in a rat model of orthotopic liver transplantation. *Transpl* 61: 305-312.
111. Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ (1989): Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem* 264(34): 20496-20501
112. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T (1992): Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(14): 6348-6352
113. Lambert LE, French JF, Whitten JP, Baron BM, Mc Donald IA (1992). Characterization of cell selectivity of two novel inhibitors of nitric oxide synthesis. *Eur J Pharmacol* 216(1): 131-134
114. Lambert LE, Whitten JP, Baron BM, Cheng HC, Doherty NS, Mc Donald IA (1991): Nitric oxide synthesis in the CNS endothelium and macrophages differs in its sensitivity to inhibition by arginine analogues. *Life Sci* 48(1): 69-75
115. Lancaster JR Jr, Langrehr JM, Bergonia HA, Murase N, Simmons RL, Hoffman RA (1992): EPR detection of heme and nonheme iron-containing protein nitrosylation by nitric oxide during rejection of rat heart allograft. *J Biol Chem* 267(16): 10994-10998
116. Lancaster JR Jr (1992): Nitric oxide in cells. *Am Scientist* 80: 248-259
117. Langrehr JM, White DA, Hoffman RA, Simmons RL (1993): Macrophages produce nitric oxide at allograft sites. *Ann Surg* 218(2): 159-166
118. Lee S, Charters AC, Orloff MJ (1975): Simplified technic for orthotopic liver transplantation in the rat. *Am J Surg* 130(1): 38-40
119. Lee S, Charters AC, Chandler JG, Orloff MJ (1973): A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transpl* 16(6): 664-669
120. Leff JA, Repine JE (1990): Blood cells and ischemia-reperfusion injury. *Blood Cells* 16:

183-192

121. Lie TS, Albrecht F, Lee S, Orloff MJ (1974): Rat organ transplantation. Surgical technic. *Chirurg* 45(8): 365-370
122. Lowenstein CJ, Glatt CS, Bredt DS, Snyder SH (1992): Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(15): 6711-6715
123. Ludwig J, Wiesner RH, Batts KP, Perkins JD, Krom RA (1987): The acute vanishing bile duct syndrome (acute irreversible rejection) after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 7(3): 476-483
124. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM (1992): Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267(9): 6370-6374
125. Macatonia SE, Taylor PM, Knight SC, Askonas BA (1989): Primary stimulation by dendritic cells induces antiviral proliferative and cytotoxic T cell responses in vitro. *J Exp Med* 169 (4): 1255-1264
126. Makowka L, Gordon RD, Todo S, Ohkohchi N, Marsh JW, Tzakis AG, Yokoi H, Ligush J, Esquivel CO, Satake M, et al (1987): Analysis of donor criteria for the prediction of outcome in clinical liver transplantation. *Transplant Proc* 19: 2378-2382
127. Makowka L, Rotstein LE, Falk RE, Falk JA, Langer B, Nossal NA, Blendis LM, Phillips MJ (1980): Reversal of toxic and anoxic induced hepatic failure by syngeneic, allogeneic, and xenogeneic hepatocyte transplantation. *Surg* 88(2): 244-253
128. Markin RS (1996): Hepatic allograft pathology. In: *Pathology of liver, kidney, pancreas and small bowel transplantation*. Nakhleh RE and Markin RS (eds). United States and Canadian Academy of Pathology: pp 27-55
129. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T (1992): Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 307(3): 287-293
130. McLemore TL, Adelberg S, Liu MC, McMahon NA, Yu SJ, Hubbard WC, Czerwinski M, Wood TG, Storeng R, Lubet RA, et al (1990): Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 82(16): 1333-1339
131. Mellion BT, Ignarro LJ, Ohlstein EH, Pontecorvo EG, Hyman AL, Kadowitz PJ (1981): Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* 57(5): 946-955

132. Meuer SC, Cooper DA, Hodgdon JC, Hussey RE, Fitzgerald KA, Schlossman SF, Reinherz EL (1983): Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes. *Science* 222 (4629): 1239-1242
133. Milton AD, Spencer SC, Fabre JW (1986): The effects of cyclosporine on the induction of donor class I and class II MHC antigens in heart and kidney allografts in the rat. *Transpl* 42 (4): 337-347
134. Misko TP, Moore WM, Kasten TP, Nickols GA, Corbett JA, Tilton RG, Mc Daniel ML, Williamson JR, Currie MG (1993): Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 233(1): 119-125
135. Mitchell HH, Shonle HA, Grindley HS (1916): The origin of nitrate in the urine. *J Biol Chem* 24: 461-465
136. Miyata M, Fischer JH, Fuhs M, Isselhard W, Kasai Y (1980): A simple method for orthotopic liver transplantation in the rat. Cuff technique for three vascular anastomoses. *Transpl* 30(5): 335-338
137. Monier S, Van Luc P, Kreibich G, Sabatini DD, Adesnik M (1988): Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 07(2): 457-470
138. Mori K, Ogawa M (1997): Phenotype and localization of macrophages expressing inducible nitric oxide synthase in rat hepatic allograft rejection. *Transpl.* 64(2): 303-310
139. Nakayama DK, Geller DA, Lowenstein CJ, Chern HD, Davies P, Pitt BR, Simmons RL, Billiar TR (1992): Cytokines and lipopolysaccharide induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7(5): 471-476
140. Nathan C (1992): Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6(12): 3051-3064
141. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996): P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6(1): 1-42
142. Neuberger J (1999): Incidence, timing and risk factors for acute and chronic rejection. *Liver Transpl Surg* 5(4 Suppl 1): 30-36
143. Neuhaus P, Blumhardt G, Bechstein WO, Keck H (1992): Progress in the field of liver transplantation in the last 10 years. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*: 209-216

144. Neuhaus P, Bechstein WO, Hopf U, Blumhardt G, Steffen R (1989): Indikation und aktuelle Entwicklung der Lebertransplantation. Chirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Rudolf Virchow Berlin: 1-42
145. Neuhaus P, Hopf U, Slama H, Blumhardt G, Bechstein WO, Steffen R (1990): Entwicklung im Bereich der Lebertransplantation und aktuelle Ergebnisse des Berliner Transplantationsprogramms. 39 Ärtzl. Seminar in Fohrenkamp, Die Lebertransplantation, Falk Foundation e. V., 25-45
146. Nose Y (1989): Artificial liver for a bridge to liver transplantation. *Artif Organs* 13(5): 15-416
147. Nussler AK, Heeckt PF, Stadler J (1994): Metabolism and function of nitric oxide in the liver. *Gastroenterol* 32(1): 24-30
148. Nussler AK, Di Silvio M, Billiar TR, Hoffman RA, Geller DA, Selby R, Madariaga J, Simmons RL (1992): Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *J Exp Med* 176(1): 261-264
149. O'Grady JG, Gimson AE, O'Brien CJ, Pucknell A, Hughes RD, Williams R (1988): Controlled trials of charcoal hemoperfusion and prognostic factors in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 94: 1186-1192
150. Ohara K, Billington R, James RW, Dean GA, Nishiyama M, Noguchi H (1990): Toxicologic evaluation of FK 506. *Transplant Proc* 22(1): 83-86
151. Olken NM, Marletta MA (1992): NG-allyl- and NG-cyclopropyl-L-arginine: two novel inhibitors of macrophage nitric oxide synthase *J Med Chem* 35(6): 1137-1144
152. Omura T, Sato R. (1964a): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2379
153. Omura T, Sato R. (1964b): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilisation, purification and properties. *J Biol Chem* 239: 2379-2385
154. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 (6122): 524-526
155. Patel R, Terasaki PI (1969): Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 280 (14): 735-739
156. Paulsen AW, Brajtbord D, Klintmalm GB, Ramsay MA, Valek TR, Swygert TH (1989): Intraoperative measurements related to subsequent hepatic graft failure. *Transplant Proc* 21(1 Pt 2): 2337-2338
157. Pichler WJ. (1997): Regulation of the immune response: the TH1/TH2-concept. *Schweiz Med Wochenschr* 127: 341-348

158. Pichlmayr R, Brölsch ch, Neuhaus P, Lauchart W, Grosse H, Creutzig H, Schneidt U, Vonnahme F, Schmidt B, Burdelski M, Wonigeit K (1983): Reports of 68 human orthotopic liver transplantation with special reference to rejection phenomena. *Transpl Proc* 15 (1): 1279-1283
159. Pober JS, Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Reiss CS, Burakoff SJ, Fiers W, Ault KA (1983): Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human gamma interferon. *J Exp Med* 157 (4): 1339-1353
160. Portmann B, Neuberger JM, Williams R. (1983): Intrahepatic bile duct lesions. In: Calne RV(ed) *Liver transplantation*. London: Grune and Stratton: pp 279-287
161. Portmann B, Slapak GI, Gane E, Williams R (1995): Pathology and biopsy diagnosis of the transplanted liver. *Verh Dtsch Ges Pathol* 79: 277-290
162. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991): Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266(7): 4244-4250
163. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990): Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(24): 10043-10047
164. Reinherz EL, Meuer S, Fitzgerald KA, Hussey RE, Levine H, Schlossman SF (1982): Antigen recognition by human T lymphocytes is linked to surface expression of the T3 molecular complex. *Cell* 30 (3): 735-743
165. Rubanyi GM, Ho EH, Cantor EH, Lumma WC, Botelho LH (1991): Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 181(3): 1392-1397
166. Rubarth S. (1958): Leber- und Gallenwege. In: Cohrs P, Jaffe R, Meessen H (eds). *Pathologie der Laboratoriumstiere*, Springer Verlag, Berlin, 155-166
167. Rückert RI (1992): Zur Geschichte der klinischen Lebertransplantation in Deutschland. *Zentralblatt für Chirurgie* 117: 299-306
168. Sanfilippo F (1990): Renal Transplantation. In: Sale G.E. (Eds), *The pathology of organ transplantation*. Stoneham MA: Butterworth; pp 51-101
169. Schiff L, Schiff RR(1993): Diseases of the liver. Schiff L., Schiff RR (eds). Vol. 1, J.B. Lippincott Company, Philadelphia: pp 1-41
170. Schmidt E, Schmidt FW. (1986): Funktionelle Morphologie der Leber. *Ergebn. Gastroenter. Verh. Bd. 22*: 16-38
171. Schon MR, Akkoc N, Heil W, Wolf St, Matthes M, Schrem H, Kollmar O, P Neuhaus (1999): Determination of alpha-Glutathione-S-transferase Concentration for Assessment

- of Hepatocellular Ischemic damage Compared to GOT, GPT and LDH in a Liver Transplantation Model. *J Lab Med* 23(4): 218-226
172. Settaf A, Gugenheim J, Houssin D, Bismuth H (1986): Cuff technique for orthotopic liver transplantation in the rat. A simplified method for the suprahepatic vena cava anastomosis. *Transpl* 42(3): 330-331
173. Shaw BW Jr, Gordon RD, Iwatsuki S, Starzl TE (1985): Retransplantation of the liver. *Semin Liver Dis* 5(4): 394-401
174. Snover DC, Freese DK, Sharp HL (1987): Liver allograft rejection. An analysis of the use of biopsy in determining outcome of rejection. *Am J Surg Pathol* 11: 18-24.
175. Snover DC (1991): The Liver Biopsy in Transplantation. In: *Biopsy Diagnosis of the Liver Disease* Baltimore, Williams & Wilkins: pp 217-227
176. Snover DC (1990): The Pathology of liver transplantation. In: Sale GE (ed.) *The Pathology of Transplantation*, Butterworth Publishers, Boston: pp 103-132
177. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, Croker BP, Droz D, Dunnill MS, Halloran PF, 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
178. Stadler J, Barton D, Beil-Moeller H, Diekmann S, Hierholzer C, Erhard W, Heidecke CD (1995): Hepatocyte nitric oxide biosynthesis inhibits glucose output and competes with urea synthesis for L-arginine. *Am J Physiol* 268: G183-188
179. Stadler J, Bergonia HA, Di Silvio M, Sweetland MA, Billiar TR, Simmons RL, Lancaster JR Jr (1993): Nonheme iron-nitrosyl complex formation in rat hepatocytes: detection by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 302(1): 4-11
180. Stadler J, Harbrecht BG, Di Silvio M, Curran RD, Jordan ML, Simmons RL, Billiar TR (1993): Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by rat Kupffer cells. *J Leukoc Biol* 53(2): 165-172
181. Stadler J, Stefanovic-Racic M, Billiar TR, Curran RD, McIntyre LA, Georgescu HI, Simmons RL, Evans CH (1991). Articular chondrocytes synthesize nitric oxide in response to cytokines and lipopolysaccharide. *J Immunol* 147(11): 3915-3920
182. Stadler J, Trockfeld J, Schmalix WA, Brill T, Siewert JR, Greim H, Doehmer J (1994): Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(9): 3559-3563
183. Starzl TE, Demetris AJ (1990): Liver transplantation in 31-year perspective. *Year Book Medical Publishers*, Chicago: pp 140-194

184. Starzl TE, Marchioro TL, von Kaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddel WR (1963): Homotransplantation of the liver in humans. *Surg Gyn Obstetr* 117 (6): 659-676
185. Starzl TE, Putnam CW (1969): Experience in hepatic transplantation. W. B. Saunders Company, Philadelphia 1
186. Steffen R, Ferguson DM, Krom RA (1989): A new method for orthotopic rat liver transplantation with arterial cuff anastomosis to the recipient common hepatic artery. *Transpl* 48(1): 166-168
187. Steinmetz M, Winoto A, Minard K, Hood L (1982): Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens. *Cell* 28 (3): 489-498
188. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF (1990) FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 168(2): 558-565
189. Stuehr DJ, Marletta MA (1987): Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res* 47(21): 5590-5594
190. Stuehr DJ, Marletta MA (1987): Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. *J Immunol* 139(2): 518-525
191. Stuehr DJ, Marletta MA (1985): Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(22): 7738-7742
192. Stuehr DJ, Nathan CF (1989): Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169(5): 1543-1555
193. Tamaki T, Kamada N, Pegg DE (1986): Hypothermic preservation of the rat liver assessed by orthotopic transplantation. A comparison of flush solutions. *Transpl* 41(3): 396-397
194. Tamaki T, Kamada N, Wight DG, Pegg DE (1987): Hypothermic preservation of the rat liver assessed by orthotopic transplantation. II. Evaluation of citrate solutions. *Transpl* 43(3): 357-361
195. Tayeh MA, Marletta MA (1989): Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem* 264(33): 19654-19658
196. Tesi RJ, Elkhmmas EA, Henry ML, Davies EA, Salazar A, Ferguson RM (1993): Acute rejection episodes: best predictor of long-term primary cadaveric renal transplant survival. *Transplant Proc* 25: 901-902
197. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group (1994): A comparison of tacrolimus (FK

- 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. *N Engl J Med* 331(17): 1110-1115
198. Tilney NL, Kupiec-Weglinski JW (1991): The biology of acute transplant rejection. *Ann Surg* 214 (2): 98-106
199. Tsuchimoto S, Kusumoto K, Nakajima Y, Kakita A, Uchino J, Natori T, Aizawa M (1988): Orthotopic liver transplantation in the rat. A simplified technique using the cuff method for suprahepatic vena cava anastomosis. *Transpl* 45(6): 1153-1155
200. van Ewijk W (1991): T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 9: 591-615
201. Watson J D (1992): *Recombinant DNA*, 2. ed. Verlagsort: New York Verlag, Freeman
202. Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H (1990): Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. *J Exp Med* 172(6): 1599-607
203. Williams GM, Haar A, Parks LC, Krajewski CA (1973): Endothelial changes associated with hyperacute, acute and chronic renal allograft rejection in man. *Transplant Proc* 5 (1): 819-822
204. Williamson JR, Ferguson TB Jr (1995): Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition from inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 181(1): 3-70
205. Worrall NK, Boasquevisque CH, Botney M, Misko TP, Sullivan PM, Ritter JH, Ferguson TB, Patterson CA and Jr (1997) Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates functional and histological changes of acute lung allograft rejection. *Transpl* 63: 1095-1101
206. Worrall NK, Chang K, Suau GM, Allison WS, Misko TP, Sullivan PM, Tilton RG, Williamson JR, Ferguson TB (1996) Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Prevents Myocardial and Systemic Vascular Barrier Dysfunction During Early Cardiac Allograft Rejection. *Circ-Res* 78: 769-779
207. Worrall NK, Lazenby WD, Misko TP, Lin TS, Rodi CP, Manning PT, Tilton RG, Williamson JR, Ferguson TB Jr (1995): Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 181(1): 63-70
208. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C (1992): Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256(5054): 225-228
209. Zhong G, Reis E, Sousa C, Germain RN (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 USA 1997 94(25): 13856-13861

210. Zimmermann FA, Butcher GW, Davies HS, Brons G, Kamada N, Turel O (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

6. Danksagung

Zum Schluß bleibt mir nur noch die angenehme Pflicht, mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C-D. Heidecke für die Aufnahme und Integration in seiner Arbeitsgruppe sowie für die Unterstützung während der experimentellen Arbeit und der Abfassung des Manuskriptes zu bedanken.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der Technischen Universität München für die aktive Teilnahme bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit. Insbesondere danke ich dem Direktor des Instituts, Herrn Univ. Prof. Dr. med. Gänsbacher, Herrn Prof. Dr. med. vet. Erhard, stellvertretend für die Veterinärmediziner des Instituts, Fr. Pichotka, Fr. Polheimer, Fr. Hartl, stellvertretend für OP-Pflegekräfte, sowie allen anderen, die dazu beitrugen, den mikrochirurgischen Arbeitsplatz bereitzustellen.

Ein weiterer Dank gilt den Hr. A. Pauli, Fr. R. Bergmair und allen Mitarbeitern der Tierhaltung für die überaus liebenswürdige Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Experimente.

Von entscheidender Bedeutung waren in der Anfangsphase der Experimente die wertvollen Hinweise zur Narkosedurchführung sowie postoperativer Therapie seitens Hr. Prof. Dr. med. R. Hipp, Hr. PD Dr. med. M. Hargasser und Fr. D. Dröse vom Institut für Anästhesiologie der TU München. Hierfür möchte ich mich bei ihnen besonders bedanken.

Meinen ehemaligen Mitdoktoranden Hr. Dr. med. N. Zantl, Hr. Dr. med. S. Maier, Fr. Dr. med. A. Westerholt, Fr. N. Chambron, Hr. M. Veit und Hr. K. Gerauer danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft während der Durchführung der Versuche sowie bei der Auswertung der Ergebnisse.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Fr. S. Himpel, Fr. T. Fleischmann, Fr. F. Altmayr, Fr. S. Kaiser-Moor sowie Fr. C. Fizi für ihren Einsatz bei der Aufarbeitung der Organe, Hilfestellung bei der Durchführung der Immunhistologie und für die „computer-technische“

Hilfsbereitschaft während der gesamten Dauer meiner Dissertation bin ich zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. M. Werner vom Institut für Allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie der Technischen Universität München danke ich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung von konventionellen Färbungen und Auswertung der Histologie.

Schließlich möchte ich mich besonders bei meiner Ehefrau Dr. med Sinitsina Inga bedanken, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und über schwere Phasen dieser Arbeit hinweggeholfen hat.

Vielen Dank Allen, die dazu beigetragen haben, daß diese Arbeit vollendet werden konnte.