

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Auswirkungen von Erythropoietin auf die
Ischämie/Reperfusionsschäden der Fettleber nach orthotoper
Lebertransplantation am Rattenmodell

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Rademacher

aus Hamm

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U.P. Neumann

2. Prof. Dr. med. J. Pratschke

3. PD. Dr. med. J.-C. Rückert

Datum der Promotion: 09.09.2011

Meiner Liebe Katharina

1 Einleitung und Grundlagen.....	6
1.1 Die Lebertransplantation	6
1.2 Die Fettleber und ihre Rolle in der Transplantationschirurgie	11
1.3 Ischämie/Reperfusionsschäden der Fettleber	12
1.4 Eigenschaften und Anwendungen von Erythropoietin.....	15
2 Fragestellung	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Experimenteller Plan	20
3.2 Tierwahl und Tierhaltung.....	23
3.3 Technik der Lebertransplantation.....	24
3.3.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung	24
3.3.2 Spenderoperation und Hepatektomie	24
3.3.3 Empfängeroperation	27
3.4 Histologische und molekularbiologische Untersuchungen	31
3.4.1 Probengewinnung.....	31
3.4.2 Isolierung von RNA.....	31
3.4.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
3.4.4 Paraffineinbettung	40
3.4.5 Hämatoxilin-Eosin (H.E.)-Färbung.....	40
3.4.6 Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung	40
3.4.7 Bestimmung der relativen Nekrosefläche	41
3.4.8 Immunhistochemische Verfahren (LSAB mit HRP/DAB Färbung).....	41
3.4.9 Laborchemische Untersuchung.....	43
3.4.10 Apoptose-Nachweis in Zellen mittels TUNEL-Reaktion.....	44
3.4.11 Statistik.....	45
4 Ergebnisse	46
4.1 Überleben	46
4.2 Nekrosebestimmung durch PAS-Färbung.....	47
4.3 Apoptosebestimmung durch TUNEL-Färbung	48
4.4 Hypoxiebestimmung durch immunhistochemische Färbung (Hypoxyprobe™)	50
4.4 Bestimmung der TNF- α Expression durch immunhistochemische Färbung ...	51

4.5 Bestimmung der IL-1 β mRNA-Expression durch PCR.....	53
4.6 Bestimmung der IL-6 mRNA-Expression durch PCR.....	54
4.7 Bestimmung der VEGF mRNA-Expression durch PCR.....	55
4.8 Bestimmung der HIF-1 α mRNA-Expression durch PCR.....	56
4.9 Bestimmung der HGF mRNA-Expression durch PCR.....	57
4.10 Bestimmung der ALT-Aktivität im Plasma.....	58
4.11 Bestimmung der AST-Aktivität im Plasma.....	59
4.12 Bestimmung der LDH-Aktivität im Plasma.....	60
4.13 Bestimmung der GLDH-Aktivität im Plasma.....	61
5 Diskussion.....	62
6 Zusammenfassung.....	71
7 Literatur.....	73
Abkürzungen.....	84
Danksagung.....	86
Lebenslauf.....	87
Erklärung an Eides Statt.....	88
Publikationsliste.....	89

1 Einleitung und Grundlagen

1.1 Die Lebertransplantation

Die orthotope Lebertransplantation (oLTX) stellt bis heute, die einzige kausale Therapieoption einer Lebererkrankung im Endstadium dar. Die terminale Leberinsuffizienz manifestiert sich in vielen Erkrankungsfällen als fortgeschrittene Leberzirrhose. Wobei Virushepatitiden, sowie Alkohol (nutritiv-toxisch) und primäre biliäre Cholangitiden als Hauptursachen einer Leberzirrhose zu betrachten sind. Als weitere Ursachen einer Leberzirrhose kommen nicht-alkoholische Fettleberhepatitiden (NASH), oder das Budd-Chiari-Syndrom, sowie angeborene Stoffwechselerkrankungen (z.B. M. Wilson) infrage. Andere Indikationen zur Lebertransplantation sind das durch Toxine, Medikamente sowie Viren bedingte akute Leberversagen und primäre maligne Lebertumore im frühen Stadium. Im Kindesalter führt die Agenesie der Gallenwege (Gallengangsatresie) in vielen Fällen zu einer LTX-Indikation (1, 2).

Die orthotope Lebertransplantation ist heutzutage ein standardisiertes operatives Verfahren, das seit seiner Einführung weitreichende Fortschritte gemacht hat. Als Thomas E. Starzl 1963 die erste Lebertransplantation durchführte, blieb dieser Erfolg aber aufgrund der postoperativ nicht länger als ein Jahr überlebenden Patienten begrenzt (3). Verschiedene Ursachen sollten diese dramatische Situation aber ab 1967 und den darauf folgenden Jahren drastisch umkehren. Zu den vorrangigen Gründen dieser hohen postoperativen Letalität gehörten die Abstoßungsreaktionen, die technischen Probleme und die mangelhaften Konservierungsmöglichkeiten der Transplantate.

Erst durch die Einführung von immunsuppressiven Medikamenten wurde das große Problem der Abstoßung vermindert. Durch den Einsatz des Anti-Metaboliten 6-Mercaptopurin, wurde 1959 der erste Schritt zur Unterdrückung der Immunantwort unternommen (4). Als Azathioprin als Folgeentwicklung entstand und zusammen mit Kortikosteroiden kombiniert wurde, gelang erstmals eine ausreichende immunsuppressive Therapie (5, 6). Mit der Zulassung von Cyclosporin A im Jahre 1981, reduzierte sich die Anzahl der immunologisch bedingten Transplantatverluste deutlich (7-10). Seit der Etablierung von Tacrolimus, MMF, Sirolimus und

spezifischen Antikörpertherapien (anti-IL-2-Rezeptor, anti-CD3-Antikörper), gegen Ende der achtziger Jahre, stehen weitere Immunsuppressiva zur Verfügung (11-13). Des Weiteren wurde das perioperative Management, sowie die operativen Techniken verbessert und standardisiert. Unter anderem konnte durch die Verwendung eines extrakorporalen Bypass-Systems in Form einer Biopumpe, sowie der Verbesserung der Gefäß- und Gallenganganastomosierung eine Senkung der Mortalität und Morbidität erreicht werden (14).

Durch die fortwährende Entwicklung und Optimierung der Konservierungslösungen konnte der Konservierungsschaden reduziert werden. In der Folge besserte sich die Transplantatfunktion und die mögliche Konservierungsdauer der Leber verlängerte sich auf bis zu 24 Stunden (15, 16). Dieses führte in den letzten Jahren zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens nach orthotoper Lebertransplantation. Derzeitig nehmen 27 europäische Staaten an der „European Liver Transplant Registry“ (ELTR) teil und veröffentlichen alljährlich die Jahresüberlebensraten nach Lebertransplantation im europäischen Raum. Laut ELTR werden 5-, und 10-Jahresüberlebensraten von 71 bzw. 61 Prozent nach Lebertransplantation erreicht (83). Hingegen werden im hiesigen Transplantationszentrum sogar 5-, und 10-Jahresüberlebensraten von 84 bzw. 76 Prozent nach Lebertransplantation erreicht.

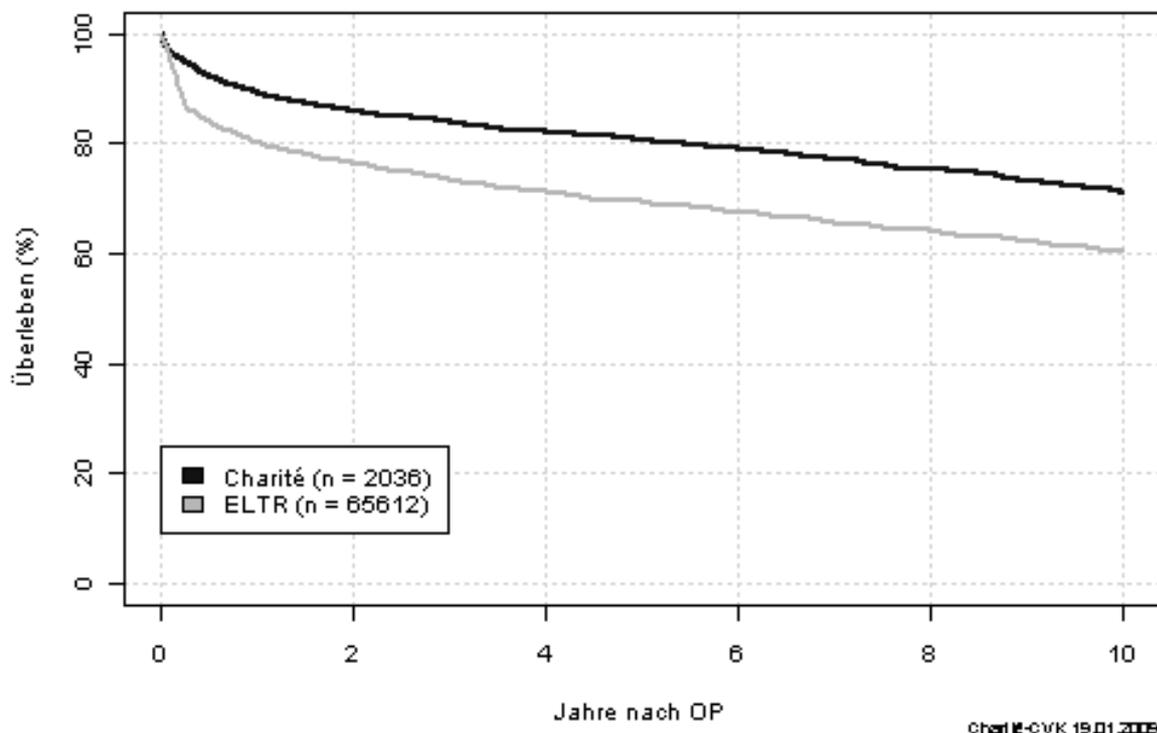


Abbildung 1: Patienten-Überleben am Transplantationszentrum der Chirurgischen Klinik, Campus Virchow Klinikum, Charité Berlin im Vergleich zum europäischen Durchschnitt.

Jede Leber wird im Verlauf der Transplantation zwangsläufig zu einem gewissen Grad geschädigt. Manche Lebern jedoch so schwer, dass sie versagen und eine sofortige Re-Transplantation erforderlich wird (primary nonfunction= PNF). Andere funktionieren so schlecht, dass eine längere Behandlung der Patienten auf der Intensivstation nötig wird (primary dysfunction= PDF).

Das primäre Transplantatversagen (PNF), sowie die primäre Transplantatdysfunktion (PDF) und die Transplantatabstoßung stellen immer noch große Probleme dar und sind die Hauptursachen für eine Mortalitätsrate von 15 bis 25 Prozent in den ersten beiden Jahren nach der Transplantation (17-21). Ein primäres Transplantatversagen konnte in 8,4 bzw. 7,8 Prozent der Fälle nach orthotoper Lebertransplantation beobachtet werden (22, 23) und ist somit eine Hauptursache für das Nichtüberleben des Empfängers (24-26). Zudem konnte klinisch nachgewiesen werden, dass es bei einer schweren Konservierungsschädigung zu verstärkten Transplantat-Abstoßungsreaktionen des Empfängers kommt (27, 28).

Die aktuelle weltweite Situation der Lebertransplantation wird von dem Dauerproblem des Organmangels geprägt, so dass Patienten auf der Warteliste sterben bevor ein geeignetes Spenderorgan zur Verfügung steht (3, 29). Diese Entwicklung hat dazu geführt, dass vermehrt Organe die nur bedingt zur Transplantation geeignet sind, akzeptiert werden. Diese qualitativ schlechteren Transplantate, auch „marginale“ Organe genannt, sind vermehrt mit primärem Transplantatversagen, primärer Transplantatdysfunktion und einem verringerten Empfängerüberleben assoziiert. Es wird angenommen, dass diese negativen Auswirkungen durch die Transplantateigenschaften der „marginalen“ Organe in Verbindung mit der Spenderorganentnahme, Konservierung und Reperfusion verursacht werden. Im klinischen Fokus stehen hierbei die Organkonservierung und der unmittelbare Zusammenhang mit auftretenden Ischämie/Reperfusionsschäden. Der Schweregrad dieser Schäden ist unter anderem von der vorbestehenden Leberschädigung, der kalten und warmen Ischämiezeit, sowie der Konservierungs- und Reperfusionsart abhängig (1, 30-32).

„Die Datenlage bezüglich „marginaler“ Organe ist dabei häufig widersprüchlich und schlecht vergleichbar, da für ein bestimmtes Marginalitätskriterium in verschiedenen Arbeiten oft unterschiedliche Ausprägungsgrade als Grenze der Marginalität verwendet und die Ergebnisse einzelner Studien meistens retrospektiv erhoben wurden (33)“.

Die in der Tabelle 1 aufgezeigten Angaben entsprechen den Konsensentscheidungen der großen Transplantationszentren bezüglich „marginaler“ Organe (34).

Tabelle 1: Faktoren die zur Marginalität von Spenderorganen beitragen

Faktor	Parameter
Spenderfaktoren	Alter, Verfettung, Länge des Aufenthalts auf der Intensivstation, Hyponatriämie, Hypotension, Reanimation, Katecholamine, Infektionen
Entnahmebedingte Faktoren	Manipulation, technische Probleme, kardiozirkulatorische Instabilität des Spenders
Faktoren im Rahmen von Konservierung/ Ischämie-Reperfusion	Perfusionsdruck, Konservierungslösung, Ischämiezeit, Reperfusionsschaden
Implantationsassoziierte Faktoren	Operationszeit, Transfusionen, technische Probleme
Empfängerbedingte Faktoren	präformierte Antikörper, ungenügende Leberzellmasse („small for size“), klinischer Zustand (Herz-Kreislauf-Versagen, Infektion/Sepsis)

Von Seiten der Bundesärztekammer wurde im Rahmen der Richtlinien zur Organtransplantation, eine Definition „marginaler“ Organe für Spenderlebern (Extended Donor Criteria, EDC) erstellt (35):

- HBV oder HCV positiv
- Sepsis mit positiver Blutkultur
- Meningitis
- extrahepatische Tumorerkrankung
- Drogenabusus
- Spenderalter >65 Jahre
- Fettleber >40 Prozent (histologisch gesichert)
- Na >165 mmol/l (letzter Wert vor der Spendermeldung)
- Intensivstation einschließlich Beatmung des Spenders >7 Tage
- Adipositas des Spenders mit BMI >30
- Kaltischämiezeit >13 Stunden
- AST oder ALT >3 × normal (letzter Wert vor der Spendermeldung)
- Bilirubin >3mg/dl (letzter Wert vor der Spendermeldung)

In diesem Zusammenhang beschäftigt sich diese Arbeit mit der Problematik der Fettleber in der Transplantationschirurgie.

1.2 Die Fettleber und ihre Rolle in der Transplantationschirurgie

Verfettete Lebern stellen in den westlichen Ländern ein allgemein verbreitetes Problem dar. So wiesen 6 bis 11 Prozent der Lebern, die im Rahmen von Autopsien untersucht wurden, Verfettungen auf (36, 37). Diese können unter anderem durch Fettleibigkeit, Alkoholmissbrauch oder verschiedene metabolische Störungen verursacht sein (38, 39). Wobei histologisch zwischen der großtropfigen (makrovesikulären) Form mit Verdrängung des Zellkerns an den Rand, sowie der kleintropfigen (mikrovesikulären) Leberzellverfettung und den verschiedenen Übergangsformen unterschieden werden muss.

Der Einsatz einer makrovesikulär verfetteten Leber im Rahmen einer Organtransplantation ist mit einem erhöhten Risiko des primären Transplantatversagens (PNF) oder einer schlechteren initialen Transplantatfunktion (PDF) verbunden. Im Kontrast dazu stellt ein Spenderorgan mit einer mikrovesikulären Steatosis hepatis, unabhängig vom Grad der Verfettung, keine Prognoseverschlechterung für den Empfänger dar (40). Erschwerend kommt ein zunehmender Mangel an Spenderorganen hinzu, so dass in der Folge erhöhte Mortalitätsraten der potentiellen Organempfänger auftreten. Daher wurde ein flexiblerer Umgang bezüglich der Akzeptanz von Spenderorganen nötig (41).

Die Prävalenz verfetteter Lebern beträgt bei Kadaverspenden zwischen 13 und 28 Prozent und steigt mit dem zunehmenden Alter des Spenders (1% <20 Jahre, 18% zwischen 20 und 40 Jahren, 39% >60 Jahre)(36, 42). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt herrscht ein allgemeiner Konsens, dass Lebern die eine milde (10-30%) bis moderate (30-60%) makrovesikuläre Verfettung aufweisen, zur Transplantation genutzt werden können. Studien demonstrierten, dass eine milde bis moderate makrovesikuläre Leberverfettung des Transplantates keine gesteigerte Mortalität nach einer Lebertransplantation aufweist (43). Eine makrovesikuläre Fettleber die einen Fettanteil von über 50 Prozent aufweist, findet in den meisten Zentren für Transplantationschirurgie keine Berücksichtigung. Diese Organe werden in den meisten Fällen abgelehnt, da viele Studien eine erhöhte Mortalität nach einer Lebertransplantation mit einem schwer verfetteten Organ (>60%) aufzeigten (24). Alle weiteren Angaben innerhalb dieser Arbeit zur verfetteten Leber beziehen sich, aufgrund der oben genannten Gründe, auf makrovesikuläre Verfettungsmuster.

1.3 Ischämie/Reperfusionsschäden der Fettleber

Der Pathomechanismus des Ischämie/Reperfusionsschadens einer verfetteten Leber unterscheidet sich deutlich von dem einer normal gesunden Leber (44). Viele dieser Mechanismen sind nach wie vor ungeklärt, allerdings gibt es vermehrte Hinweise darauf, dass die Fettleber eine verringerte Toleranz gegenüber ischämischen Insulten aufweist (45, 46). Während in einer normal gesunden Leber vermehrt apoptotische Prozesse im Rahmen eines Ischämie/Reperfusionsschadens zu beobachten sind, ist in der Fettleber eine höhere Anzahl von Nekrosen anzutreffen (40).

Der Prozess der Nekrose tritt in der Zelle als Folge starker Zellschädigung auf. Dabei setzt die nekrotische Zelle toxische Zellinhalte in die Umgebung frei, wodurch es zu einer entzündlichen Reaktion kommt. Die Apoptose (programmierter Zelltod) hingegen beginnt mit der Schrumpfung der Zelle. Danach stülpt sich die Zellmembran aus (blebbing) und die genomische DNA sowie das Zytoskelett werden fragmentiert. Die Zelle gibt nun ihren Inhalt ohne Entzündung in Vesikel (apoptotische Körperchen) ab, die von Phagozyten aufgenommen werden.

Durch eine Ischämie kann das Apoptose-Programm der Zelle initiiert werden. Mit der Ligandenbindung an Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptor) und der Ausschüttung von pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien stehen verschiedene Mechanismen zur Aktivierung der Apoptose zur Verfügung. Die Ligandenbindung führt zur Bildung des multimeren Komplexes DISC (death inducing signaling complex). Dieser führt schließlich zur Aktivierung von Proteasen so genannten Caspasen (cystein-specific aspartate proteases). Durch proteolytische Spaltung von Effektorcaspasen und durch Apoptose-induzierende Stimuli wird der zentrale pro-apoptotische Faktor Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma ausgeschüttet. Nachdem Cytochrom C ins Zytoplasma freigesetzt ist, bindet es an das Adaptermolekül apoptosis protease activating factor-1 (Apaf-1) und aktiviert zusammen mit desoxy-ATP eine weitere Caspase. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet. Hierdurch werden weitere Caspasen aktiviert und diese führen schließlich zur DNA-Fragmentierung und Apoptose (Abb. 2) (117).

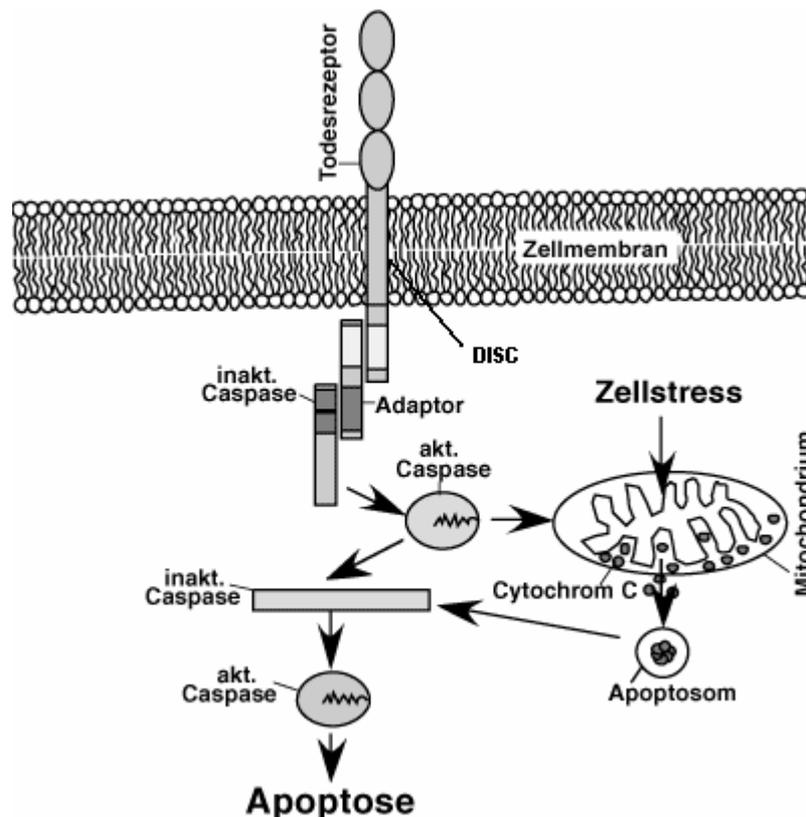


Abbildung 2: Vereinfachte, schematische Darstellung der Signaltransduktionswege, die zur Apoptose führen, modifiziert von T. Brunner (47)

Diese Mechanismen des programmierten Zelltodes gelten aber nach derzeitigen Erkenntnissen nur bedingt für die Fettleber. Die Fettanreicherungen führen durch ein vermindertes sinusoidales Blutvolumen und eine herabgesetzte Mikrozirkulation zu einer veränderten Anatomie der Fettleber. Durch intrazelluläre Fettanreicherungen ergeben sich Veränderungen der Hepatozytenmorphologie, so dass es zu vermehrten neutrophilen Adhäsionen, sowie einer verminderten Mitochondrienfunktion und zu einer verringerten ATP-Synthese kommt (44, 48). In einem Modell mit homozygoten Zucker-Ratten (Genetisches Rattenmodell mit defektem Leptin-Rezeptor und konsekutiver Verfettung der Leber) konnte beispielsweise ein verminderter Gallefluß in der Fettleber nachgewiesen werden (49).

Die Ischämie/Reperfusionsschäden im Rahmen einer Transplantation führen in der Fettleber vorrangig zu Nekrosen. Der programmierte Zelltod im Sinne einer Apoptose spielt nur eine untergeordnete Rolle. Vermutlich ist die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies einer erhöhten Konzentration von Triglyceriden, Phospholipiden und Fettsäuren in der Fettleber geschuldet. Folglich tritt durch die vermehrte Fettanreicherung eine Kompression der Lebersinusoide auf (50, 51). Das

resultierende reduzierte Sauerstoffangebot und die vermehrte Anzahl von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bewirken eine verminderte ATP-Synthese (44). Hierdurch wird die Synthese von Apoptose vermittelnden Proteinen eingeschränkt und in die Funktionen der Kupferzellen verändert (40).

Die Ursache des erhöhten Ischämie/Reperfusionsschadens in der Fettleber wird von Koneru und Dikdan als dichotomer Prozess betrachtet. Laut dieser „Doppelhit-Hypothese“ sind die Verfettung und die vermehrte Bildung von radikalen Sauerstoffspezies während der Reperfusion die Bestandteile dieses Prozesses. Schließlich wird die bereits erläuterte Zellkaskade mit einer konsekutiven Zellschädigung und einem finalen Zelltod initiiert (48).

Die kalte Ischämie und die anschließende Reperfusion, erzeugen lysosomale Schäden in der verfetteten Transplantatleber. Diese führen vermutlich zu einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembran und schränken die mitochondriale Funktion ein. Als Folge davon kommt es durch die verminderte Ausschleusung von Proteasen und Wasserstoffionen zu Nekrosen und Apoptosen der Hepatozyten (52). In der Fettleber setzt zudem die Proliferation der Hepatozyten nach einer Leberresektion verzögert ein (40).

1.4 Eigenschaften und Anwendungen von Erythropoietin

Das Glykoprotein Erythropoietin (EPO) gehört zur Gruppe der hämatologischen Wachstumsfaktoren und wird hauptsächlich in den peritubulären Interstitiumzellen der Niere produziert. Allerdings sind auch Organe wie die Leber, der Uterus und das Gehirn zu einer EPO-Synthese befähigt. In der Leber findet die zweithöchste Produktion und Sekretion von EPO durch die Hepatozyten, Hepatom- und Kupfferzellen statt (53). Im Zielorgan Knochenmark stimuliert es die Vorläuferzellen der erythroiden Reihe und führt zu einem Anstieg von Retikulozyten und Erythrozyten (54). Die Halbwertszeit von Erythropoietin beträgt circa 6 bis 8 Stunden (55). Bei exogen zugeführtem rekombinantem humanen Erythropoietin (rhEPO) ist sie von der Applikationsform abhängig. Erythropoietin verteilt sich nach der Injektion innerhalb einer halben Stunde in einem Plasmaraum von circa 75 ml/kg Körpergewicht, entsprechend einem Volumen von 5 bis 6 Litern (56).

In den letzten 15 Jahren ist rhEPO vielfach in den Kliniken zum Einsatz gekommen, vor allem bei Blutarmut infolge von Nierenversagen, bei Tumoranämie oder bei der Gewinnung von Blutkonserven aus Eigenblut. Dabei hat es sich bei Millionen von Menschen als ausgesprochen gut verträglich und sicher in der Anwendung erwiesen (57, 58).

Die EPO-Synthese wird nicht etwa durch eine verminderte Menge der Erythrozyten, sondern durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck im Blut induziert. Sobald ein hypoxischer Zustand im Organismus entsteht, wird EPO in das periphere Blut freigesetzt. Diese hypoxieabhängige EPO Expression wird primär durch das heterodimere Protein HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1) reguliert (59). Die Gentranskription wird über einen Enhancer vermittelt, welcher sich am 3'-Ende des EPO Gens befindet und eine spezielle Bindungsstelle für HIF-1 darstellt (60). HIF-1 ist ein aus zwei Untereinheiten bestehender Transkriptionsfaktor, wovon eine sauerstoffunabhängig ist (61). Die andere größere Untereinheit ist sauerstofflabil, daher wird sie unter normoxischen Bedingungen abgebaut. Bei einer Hypoxämie wird das Hippel-Lindau Protein blockiert und es kommt in der Folge zu einer Hemmung des katalytischen Abbaus der HIF-1 Untereinheit (HIF-1 α) (62). Die HIF-1 Untereinheit dringt in den Zellkern ein, wird zum Heterodimer und verbindet sich dort

mit einer hypoxieresponsiven Region des EPO Gens, wodurch die EPO-Transkription gesteigert wird (63).

Nicht nur die Hypoxie, sondern auch andere Störungen im Stoffwechsel wie eine Hypoglykämie oder erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel führen möglicherweise zu einer verstärkten Expression von EPO über die Aktivierung von HIF-1. Außerdem können eine Reihe von Zytokinen wie der Insulin-ähnliche-Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor-1, IGF-1), Tumornekrosefaktor- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) die Produktion und Sekretion von EPO regulieren (64).

EPO ist auf die Bindung mit dem EPO-Rezeptor (EPO-R) angewiesen, ohne ihn könnte EPO keine Wirkung ausüben. Der EPO-Rezeptor befindet sich auf der Oberfläche von erythroiden und nicht-erythroiden Blutzelllinien, wie den colony-forming unit (CFU) Erythrozyten und Pronormoblasten (65, 66), sowie den myeloiden Zellen, Lymphozyten und Megakaryozyten (67). EPO fördert die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben erythrozytärer Vorläuferzellen im Knochenmark, indem es an deren Rezeptoren bindet. Durch die Bindung von EPO an seinen Rezeptor und der daraus resultierenden Konformationsänderung, wird eine an die transmembrane Domäne des Rezeptors assoziierte tyrosinspezifische Proteinkinase, die Januskinase 2 (JAK2), durch Autophosphorylierung aktiviert (68-70). Die JAKs phosphorylieren unter anderem acht Tyrosinreste der zytoplasmatischen Rezeptordomäne. Über diese binden als STATs (signal transducers and activators of transcription) bezeichnete Transkriptionsfaktoren an die Tyrosylphosphate. Die Tyrosinphosphorylierung der STATs, ermöglicht ihnen das Eindringen in den Zellkern und schließlich die Aktivierung der Transkription spezifischer Gene pleiotroper Zellen (71). Hierdurch kommt es unter anderem zu einer Proliferation von EPO und einer Reduktion der Apoptoseinduktion in der Zelle (72).

Die Überlebenskapazität der Zellen und die Hemmung der Apoptose kann auch durch die Protein-Kreatinin-Kinase (PKC) positiv beeinflusst werden. Einige Kinasen der PKC Familie sind der Lage, die durch EPO induzierte Proliferation und Differenzierung von erythroiden Zellen zu steuern (71).

Eine weitere Einflussmöglichkeit von EPO, sind die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPKs). Diese bestehen aus Serin- und Threoninkinasen, extrazellulären Signalkinasen (ERKs), c-Jun Aminoendekinasen (JNKs) sowie der p38 MAP Kinase und werden meist entweder über „Survival factors“ oder durch

„Death Promoting Receptors“ aktiviert. Durch die EPO vermittelte MAPK/ERK Signalkaskaden Aktivierung, translozieren diese in den Zellkern, um dort die Transkription verschiedener Gene zu aktivieren, die wiederum Zelldifferenzierung, Zellwachstum oder Zelltod vermitteln. Eine Zytoprotektion kann über die ERK1/2 Kaskade induziert werden, wobei die ERK Kaskade hauptsächlich die Apoptose reguliert (73).

Im Tiermodell bewies die Anwendung von rhEPO, dass es sowohl im Gehirn als auch im Herz einen Schutz gegenüber Ischämie/Reperfusionsschäden bietet. Dieser Schutz reicht von neurologischen und entzündlichen Erkrankungen, über Leberschäden bis hin zu Herzinfarkten. Es wurde zahlreich demonstriert, dass rhEPO beim Menschen Nervenzellen vor Apoptose schützt, zerstörerische reaktive Sauerstoffspezies im Blut abfängt und entzündungshemmend wirkt. Zudem fördert es das Wachstum und die Verzweigung von Nervenzellen sowie die Bildung und Verästelung von Blutgefäßen (74). Studien zeigten, dass rhEPO das Nervengewebe selbst vor den Wirkungen eines Schlaganfalls schützt. Wenn rhEPO rasch nach einem solchen Infarkt verabreicht wurde, war es gut verträglich und reduzierte deutlich die neurologischen Ausfälle sowie die Größe des vom Infarkt geschädigten Hirngewebes (75). Am Herz schützt rhEPO *in vitro* die kardialen Myoblasten und *in vivo* die Kardiomyozyten gegen ischämische Gewebeschäden und Apoptose, wenn es frühzeitig eingesetzt wird. Die myokardiale Funktion war in den Studien nach dem Infarkt signifikant verbessert. Diese kardiale Funktionsverbesserung ging mit einer herabgesetzten Myozytenapoptose, größeren intakten Myokardarealen und einer geringeren linksventrikulären Dysfunktion einher (76).

Zur Zytoprotektion nutzt rhEPO unter anderem intrazelluläre Signalwege über eine Hemmung der zwei Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Nuklearfaktor-kappa-B) und AP-1 (Aktivatorprotein-1). Diese beiden Transkriptionsfaktoren sind unter anderem für hochgradige inflammatorische Reaktionen verantwortlich und führen zur Expression von antiapoptotischen Genen, wie zum Beispiel den Apoptose-inhibierenden-Proteinen (IAPs). Diese inhibieren spezifisch die aktiven Formen der Kaspasen 3, 7 und 9 (77, 78).

Die durch den auftretenden Ischämie/Reperfusionsschaden aktivierten NF- κ B und AP-1 werden durch rhEPO reduziert. Es erfolgt eine konsekutiv herabgesetzte Expression von TNF- α , IL-6 und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) mit einer

Steigerung der IL-10 Expression (79) und schließlich eine verringerte Aktivierung der Caspasen 3 und 8 (76, 80-83).

Abseits der Verbesserung der zellulären Integrität, wirkt EPO auf die Zellhomöostase ein, indem es die Freisetzung direkter proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6 und TNF- α , hindert (84). TNF- α stellt vermutlich eines der Hauptzytokine dar, welches die Zytokinkaskade triggert und die Entzündungsreaktion initiiert (85). Der durch einen Ischämie/Reperfusionsschaden induzierte Zelluntergang wird durch eine komplexe Interaktion verschiedener Zytokine und Adhäsionsmoleküle verursacht. Diese Proteine werden während der Reperfusion aktiviert. Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 ermöglicht sowohl die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in reperfundiertes Gewebe, als auch deren adhäsionsvermitteltes zytotoxisches Verhalten, was den Zelltod von parenchymatösen Zellen zur Folge hat. Die Induktion von ICAM-1 im reperfundierten Gewebe wird von TNF- α und IL-6 reguliert. Möglicherweise werden hierdurch die Interaktionen zwischen transmigrierten neutrophilen Granulozyten und den betroffenen Zellen forciert. Die Interaktion der akkumulierten Neutrophilen und der proinflammatorischen Mediatoren bestimmt den Grad der Zerstörung der Zellen (86, 87). Ein stabiles mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) ist ein essentieller Faktor der Zellintegrität und dient dem Schutz vor Apoptose (88, 89). EPO verhindert die Schäden an den Mitochondrien, die durch reaktive Sauerstoffspezies und Anoxie verursacht werden. Dieses gelingt durch die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ und die folglich fehlende Freisetzung von Cytochrom C (90-92). Zusätzlich wirkt EPO vermutlich durch die Regulation der Kaspasen-vermittelten Signalwege, positiv auf den Erhalt des mitochondrialen Membranpotentials (92).

2 Fragestellung

Die zunehmenden Erfolge der Lebertransplantation in den vergangenen Jahrzehnten, haben zu einem deutlich verbesserten Überleben der Organempfänger geführt. Die mangelnde Verfügbarkeit von Spenderorganen steht dem diametral entgegen. Der rasante medizinische Fortschritt lässt zudem immer breiter gefächerte Indikationsstellungen zur Lebertransplantation zu. In der Folge werden die Wartelisten für potentielle Empfänger kontinuierlich länger. Daher wird die Kluft zwischen Organangebot und Organnachfrage immer größer. Wie bereits erläutert, ist ein möglicher Weg diesem Problem adäquat entgegenzustehen, der Einsatz von „marginalen“ Organen. Es findet also eine Adaptation der Allokation für diese Organe statt. Hieraus ergeben sich hinsichtlich dieser Arbeit folgende Fragen.

- 2.1 Ist rhEPO zur Prävention von Ischämie/Reperfusionsschäden nach orthotoper Lebertransplantation im Rattenmodell mit Fettleber und sechs Stunden Ischämie geeignet?
- 2.2 Ist das Versuchsmodell dieser tierexperimentellen Arbeit auf den Menschen übertragbar und lassen sich Rückschlüsse bezüglich einer möglichen humanen Anwendung ziehen?
- 2.3 Durch die Verwendung von „marginalen“ Organen treten vermehrt Fälle von primärer Transplantatdysfunktion und primärem Transplantatversagen auf. Könnten diese Probleme durch den Einsatz von rhEPO im Rahmen der Lebertransplantation verringert werden?

3 Material und Methoden

3.1 Experimenteller Plan

Es wurden insgesamt 70 Lebertransplantationen mit Fettleber und 6 Stunden Kaltischämiezeit am Rattenmodell durchgeführt. Daher ergibt sich durch die Anzahl der Spender- und Empfängertiere eine gesamte Tieranzahl von 140 Lewis Ratten, die in dieser Arbeit randomisiert Verwendung fanden.

Sämtliche Spendertiere erhielten zur Bildung einer Fettleber, 5 Tage eine Methionin-Cholin-Defizit-Diät (MCDD) (Dyets Inc., Bethlem, PA, USA), die als gängiges Modell zur Induktion einer Fettleber häufig beschrieben wird (93). Wie bereits aus zuvor durchgeführten Versuchen bekannt war, konnte in dieser Zeit eine Verfettung von mindestens 50 Prozent erreicht werden. Die Tiere wurden in diesen fünf Tagen täglich hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes beobachtet. Sie wurden immer zu zweit in einem Käfig gehalten und erhielten täglich jeweils circa 80 Gramm der MCDD Nahrung.

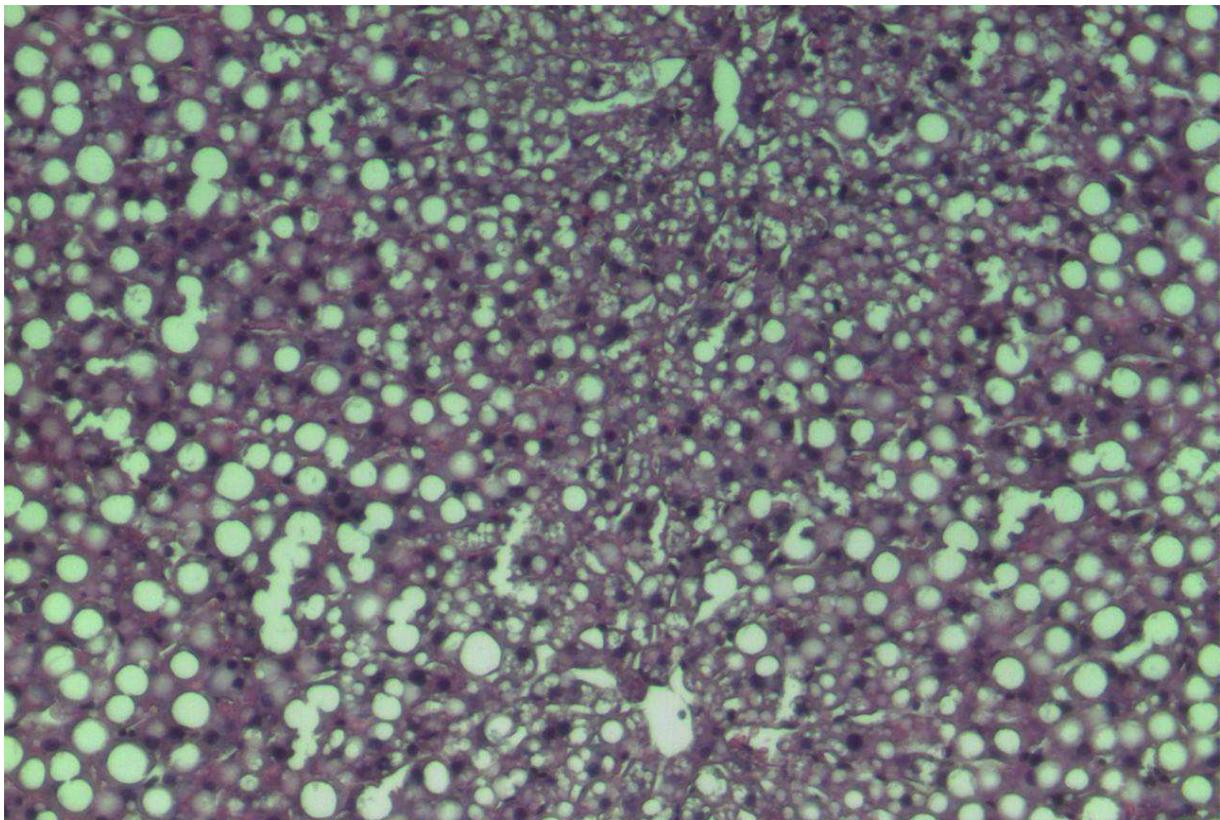


Abbildung 3: Repräsentative histologische Abbildung der Fettleber eines Spenderorganes (Verfettung $\geq 50\%$). Verfettung durch Methionin-Cholin-Defizit-Diät induziert. H.E.-Färbung, 20-fache Vergrößerung;

In der Behandlungsgruppe erhielten sämtliche Spendertiere eine halbe Stunde vor dem Abklemmen der Pfortader und alle Empfängertiere direkt nach der Reperfusion, 4000 Einheiten rhEPO pro Kilogramm Körpergewicht (0,1 mL NeoRecormon [RhEPOetin beta, Roche Pharma, Welwyn Garden City, Großbritannien] in Kochsalz gelöst) portalvenös injiziert (EPO-Gruppe). Der Applikationsform und dem Zeitpunkt liegt die Pharmakokinetik des Erythropoietins zu Grunde.

Sämtlichen Tieren der Kontrollgruppe wurde anstatt rhEPO, 0,9-prozentige Kochsalzlösung in äquivalenter Menge appliziert (Kontrollgruppe). Bis auf die fehlende EPO-Applikation glich das Procedere exakt dem der oben genannten Behandlungsgruppe.

Entsprechend den verschiedenen Tötungszeitpunkten in den Behandlungs- und Kontrollgruppen, wurden jeweils vier Untergruppen gebildet. Aufgrund des Zeitablaufes der Ischämie/Reperfusionsschäden in der Ratte wurden die Tiere 4,5, 24 und 48 Stunden, sowie 7 Tage nach der Reperfusion des Transplantates getötet.

Tabelle 2: Versuchsplan (Verstorbene Tiere hierbei nicht aufgeführt)

Gruppen	Untersuchungszeitpunkt	Tieranzahl	rhEPO	n
I/1	2 Stunden	7 Empfänger/ 7 Spender	nein	7
I/2		7 Empfänger/ 7 Spender	ja	7
II/1	4,5 Stunden	7 Empfänger/ 7 Spender	nein	7
II/2		7 Empfänger/ 7 Spender	ja	7
III/1	24 Stunden	7 Empfänger/ 7 Spender	nein	7
III/2		7 Empfänger/ 7 Spender	ja	7
IV/1	48 Stunden	7 Empfänger/ 7 Spender	nein	7
IV/2		7 Empfänger/ 7 Spender	ja	7
V/1	7 Tage	5 Empfänger/ 5 Spender	nein	5
V/2		5 Empfänger/ 5 Spender	ja	5

Die Tierzuordnungen der zehn Versuchsgruppen und die vorherige Einteilung der Spender- beziehungsweise Empfängergruppen erfolgten jeweils randomisiert.

Ergänzend wurde zwei Stunden nach der Reperfusion an den Tieren die 4,5 Stunden nach Reperfusion getötet wurden, eine Resektion des Lobus triangulatus zur histologischen und molekularbiologischen Aufbereitung durchgeführt. Eine halbe Stunde vor der Tötung erhielten diese Tiere den Hypoxie-Marker (Hypoxyprobe™, NPI Inc., Burlington, USA) in die Vena dorsalis penis appliziert. Von sämtlichen Tieren wurde zum Tötungszeitpunkt Blut und Lebergewebe asserviert.

Die verstorbenen Tiere verendeten alle innerhalb der ersten vier Stunden nach der Reperfusion des Transplantates, ohne Hinweise auf einen operativen oder technischen Fehler.

Nachdem die Leber explantiert war, wurde sie bei vier Grad Celsius in einer Konservierungslösung (University of Wisconsin-Lösung) gekühlt und aufbewahrt. Es wurde eine Kaltischämiezeit von 6 Stunden eingehalten.

Tabelle 3: Perfusions- und Konservierungslösung, Inhaltsstoffe von 1000 ml University of Wisconsin Lösung (Viaspan™, DuPont Pharma, Wilmington, USA)

Hydroxyäthylstärke 50g/l (Pentafraktion)	500 ml
Laktobionsäure 100 mM	35,83 g
KH ₂ PO ₄ 25mM	3,4 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O 5mM	1,23 g
Raffinose x 5H ₂ O 30 mM	17,83 g
Adenosin 5mM	1,34 g
Allopurinol 1mM	0,136 g
Gluthathion 3mM	0,922 g
KOH 10N	11,5 ml
NaOH zur pH-Einstellung (7,4)	
ad ddH ₂ O	

Tabelle 4: Perfusions- und Reperfusionslösung, Inhaltstoffe von 1000 ml NaCl 0,9% (Isotonische Kochsalzlösung Fresenius, Fresenius Kabi, Bad Homburg)

NaCl 145 mM	9,00 g
ad ddH ₂ O	

3.2 Tierwahl und Tierhaltung

Sämtliche Tierversuche waren von der zuständigen Behörde ordnungsgemäß genehmigt und die vom Gesetz geforderten Voraussetzungen zur Haltung und Überwachung der Versuchstiere waren gegeben. Die ordnungsgemäße Entsorgung der Tiere nach der Beendigung der Versuche, wurde durch den zuständigen Veterinär und die ausgebildeten Tierpfleger der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums des Virchow-Klinikums Berlin gewährleistet. Für die Untersuchungen wurde die kommerziell erhältliche, rückgezüchtete Lewis-Rattenrasse verwendet. Diese Tiere wurden frei von spezifischen Pathogenen von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) geliefert und in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum, gehalten. Nach einer Akklimatisierungsphase von mindestens einer Woche mit einer Tag/Nacht-Zeitschaltung von jeweils 12 Stunden, wurden die Tiere für die Versuche verwendet und nach den Operationen wieder in den gleichen Raum gebracht. Alle verwendeten Tiere hatten zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser und Standardnagerfutter beziehungsweise einer Methionin-Cholin-Defizit-Diät. Die Versuche wurden mit männlichen Ratten im Alter von 8-14 Wochen und mit einem Gewicht von 250-300 g durchgeführt. Es handelte sich um Tiere aus Inzuchtstämmen, für deren Aufbau 10 bis 50 Jahre kontrollierter Zuchtarbeit erforderlich waren. Über mindestens 20 Generationen musste ein Zuchtkern in engster Verwandtschaftspaarung fortgeführt werden, bei dem die Weiterführung zur nächsten Generation für die ganze Population jeweils auf einem einzigen Bruder-Schwester-Paar beruhte. Durch regelmäßige Kontrollen an vielen verschiedenen Genorten wurde gesichert, dass es sich tatsächlich um genetisch identische Tiere handelte. Die behördliche Genehmigung für die Tierversuche wurde am 08.06.2009 unter dem Aktenzeichen G0076/09 erteilt.

3.3 Technik der Lebertransplantation

3.3.1 Anästhesie und Operationsvorbereitung

Alle operativen Eingriffe wurden unter einer Inhalationsnarkose durchgeführt. Hierzu wurden die Narkosemittel Isofluran und Lachgas in eine Plexiglaskammer eingeleitet. Nach Erreichen einer erfahrungsgemäß ausreichend tiefen Narkose und guter Muskelrelaxation wurde das Tier aus der Kammer entnommen und anschließend über dem gesamten Abdomen geschoren und in Rückenlage auf einem Korkbrett fixiert.

3.3.2 Spenderoperation und Hepatektomie

Der gesamte operative Eingriff wurde in einer sauberen, nicht-sterilen, mikrochirurgischen Technik durchgeführt. Die Originalbeschreibung von Lee (94) mit einer Modifikation der Gallengangs-Anastomose (95) und Arterienpräparation fand hierbei hauptsächlich Berücksichtigung. Es wurde eine vom Xyphoid bis zur Blase reichende mediane, sowie eine bis zum Rippenbogenunterrand reichende laterale Laparotomie zur Eröffnung der Bauchhöhle durchgeführt. Zuerst wurde das Ligamentum falciforme bis zur suprahepatischen Vena cava inferior durchtrennt. Die linke subphrenische Vene wurde unterfahren, doppelt mit Seide 6-0 ligiert und durchtrennt. Diese Vene ist meist prall gefüllt und drainiert das linke Zwerchfell.

Der Lobus caudatus wurde nach Durchtrennung der linkslateralen Leberbänder mobilisiert, so dass der zwischen Ösophagus und Leberarterie verlaufende arterielle Plexus durchtrennt werden konnte. Die infrahepatische V. cava inferior und die rechte V. renalis wurden anschließend im Bereich der Einmündung mobilisiert. Die weitgehend mobilisierte Leber konnte danach auf die linke Seite des Tieres geschwenkt werden und es erfolgte die scharfe Lösung des retrocavalen Bindegewebes von Höhe der rechten Nebennierenvene bis zur Einmündung der Lebervenen. Die rechte Vena suprarenalis wurde mit Seide 6-0 einfach ligiert. Die Präparation des Leberhilus erfolgte durch die Darstellung, Unterführung und doppelte Ligatur der präpylorischen Vene.

Die Pfortader wurde in Höhe der Einmündung der präpylorischen Vene unterfahren und leberwärts über eine Strecke von circa 5 mm stumpf mobilisiert. Es erfolgte die Identifizierung der A. hepatica communis und die Separation der A. gastroduodenalis.

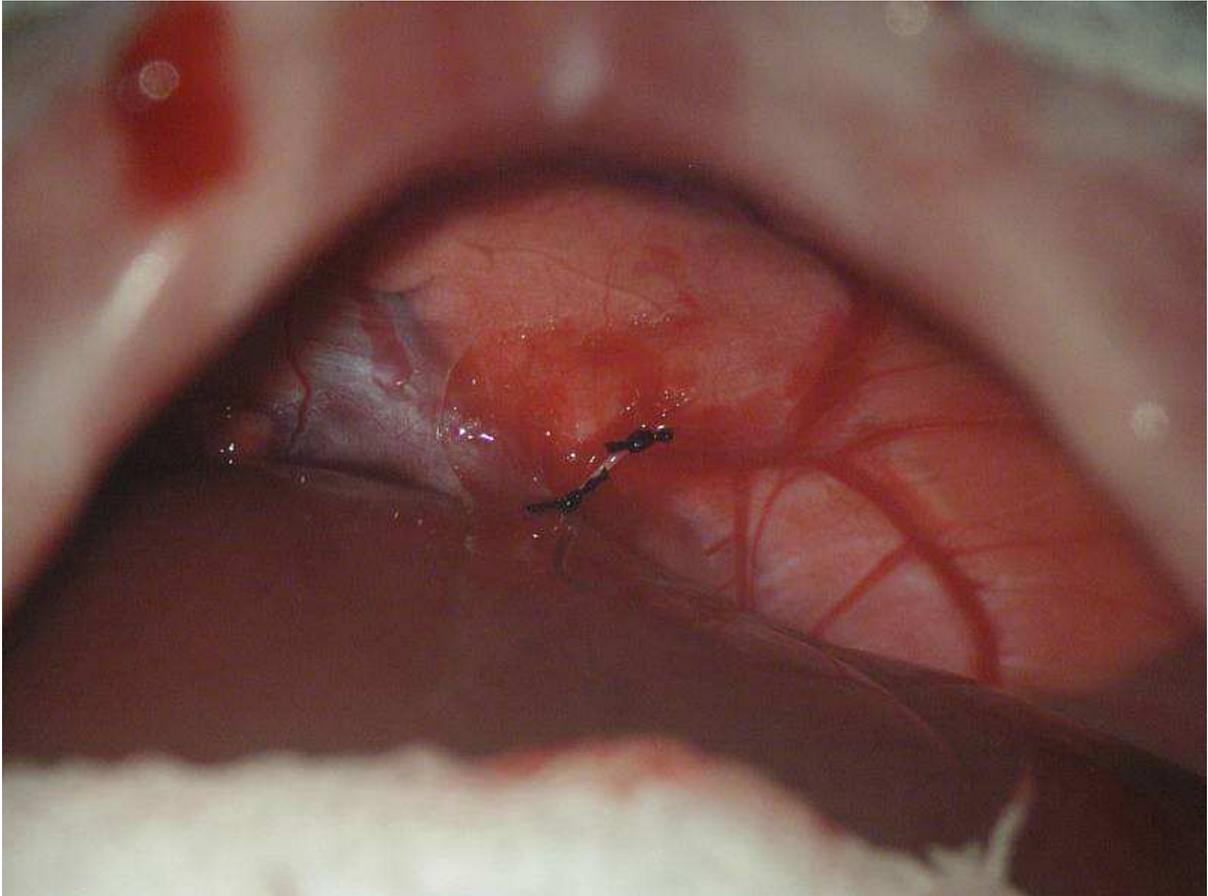


Abbildung 4: Ligatur der linken Zwerchfellvene.

Die A. gastrica sinistra und A. lienalis wurden ligiert und durchtrennt, danach konnte der Truncus coeliacus bis zum aortalen Ursprung freigelegt werden. Durch eine am Pankreasoberrand angelegte Ligatur wurde der Ductus choledochus angespannt. Der kontinuierliche Gallefluss führte zu einer leichten Dilatation des Gallenganges, so dass eine über die halbe Zirkumferenz des Ganges reichende Inzision, angelegt werden konnte. In diese Öffnung wurde ein an beiden Seiten schräg angeschnittener, circa 5 mm langer Polyäthylensplint auf halber Länge die Öffnung eingeführt und mit Seide 6-0 eingebunden. Die Grundlage des Splintes stellte eine dünne zurechtgeschnittene Dauerverweilkanüle (22G) dar. Hiernach erfolgte die Ablösung der verbliebenen dorsalen Bänder. Somit waren hiernach alle präparatorischen Vorbereitungen zur Leberperfusion getroffen.

Die Leber wurde zunächst portalvenös mit reduzierter Tropfgeschwindigkeit durch eine Schwerkraftperfusion von 25 cm Wassersäule über ein Standardinfusionsset und die eingelegte Kanüle mit vier Grad Celsius kalter Konservierungslösung perfundiert.

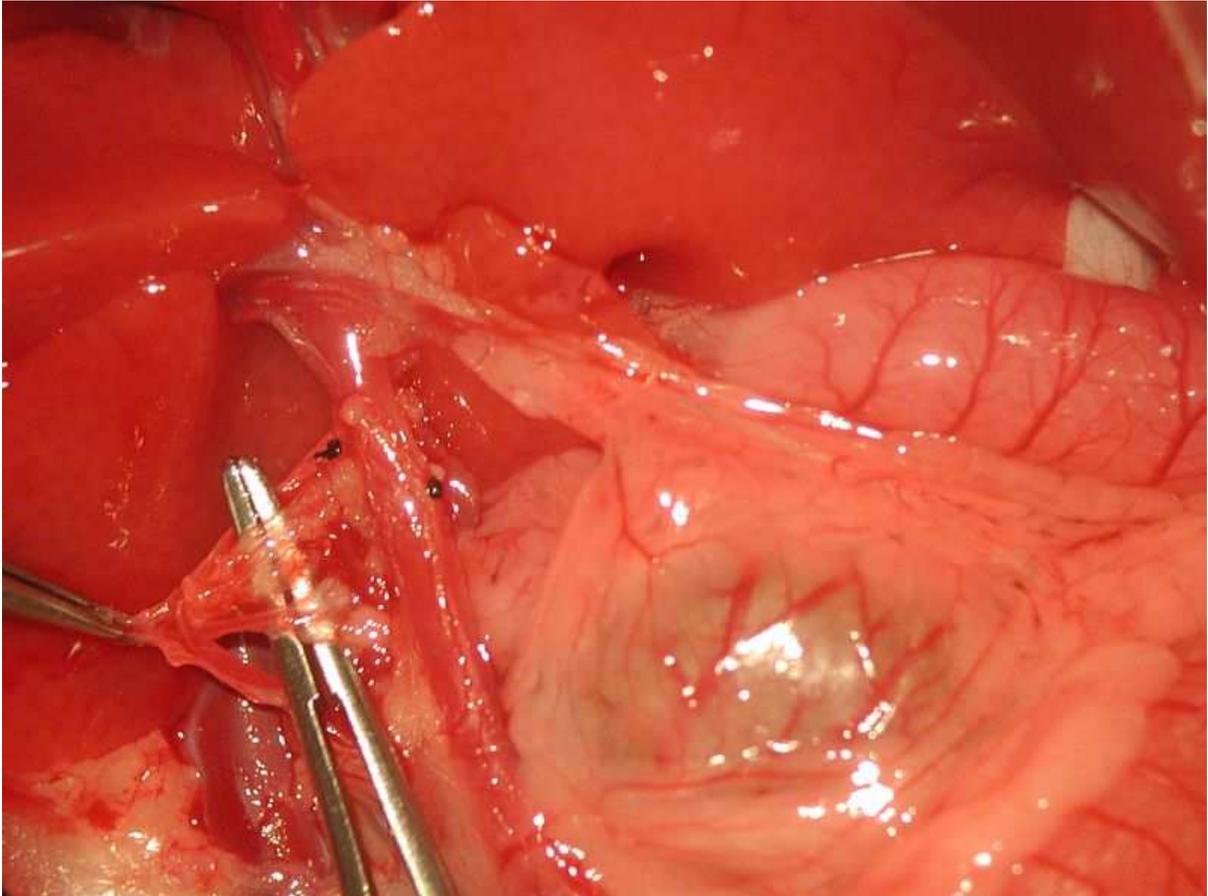


Abbildung 5: Truncus coeliacus mit Darstellung der Abgänge nach Durchtrennung der präpylorischen Vene, die in die Vena portae mündet. Rechts davon der Gallengang mit umgebendem Pankreasgewebe.

Während der anhaltenden Pfortaderperfusion wurde der Truncus coeliacus mit einem kleinen Patch von der Aorta abgesetzt. Dieser wurde anschließend mit einer vier Grad Celsius kalten Konservierungslösung manuell über einen 24 G Venenkatheter in Verbindung mit einer 20 ml Spritze perfundiert. Das Perfusionsvolumen betrug portal-venös 25 und arteriell 2 ml NaCl-Lösung. Die Pfortader konnte mit Abschluss der Perfusion direkt oberhalb der Klemme durchtrennt werden und die rechte Nebennierenvene wurde unter dem Verbleib der zuvor gelegten Ligatur, am Transplantat durchtrennt. Die suprahepatische Vena cava inferior wurde direkt am Übergang zum Zwerchfell abgesetzt. Unter Beendigung der Hepatektomie wurde das Transplantat in eine mit 4°C kalter UW-Lösung gefüllte, auf Eis stehende Schale gelegt. Zwei Prolene 7-0 Eckfäden wurden zuletzt an der suprahepatischen Vena cava, sowie ein Prolene 8-0 Eckfaden an der V. portae hepatis vorgelegt und mit einem Knoten fixiert, um die Anastomosierungszeit und damit die anhepatische Zeit vom Empfängertier möglichst kurz zu halten.

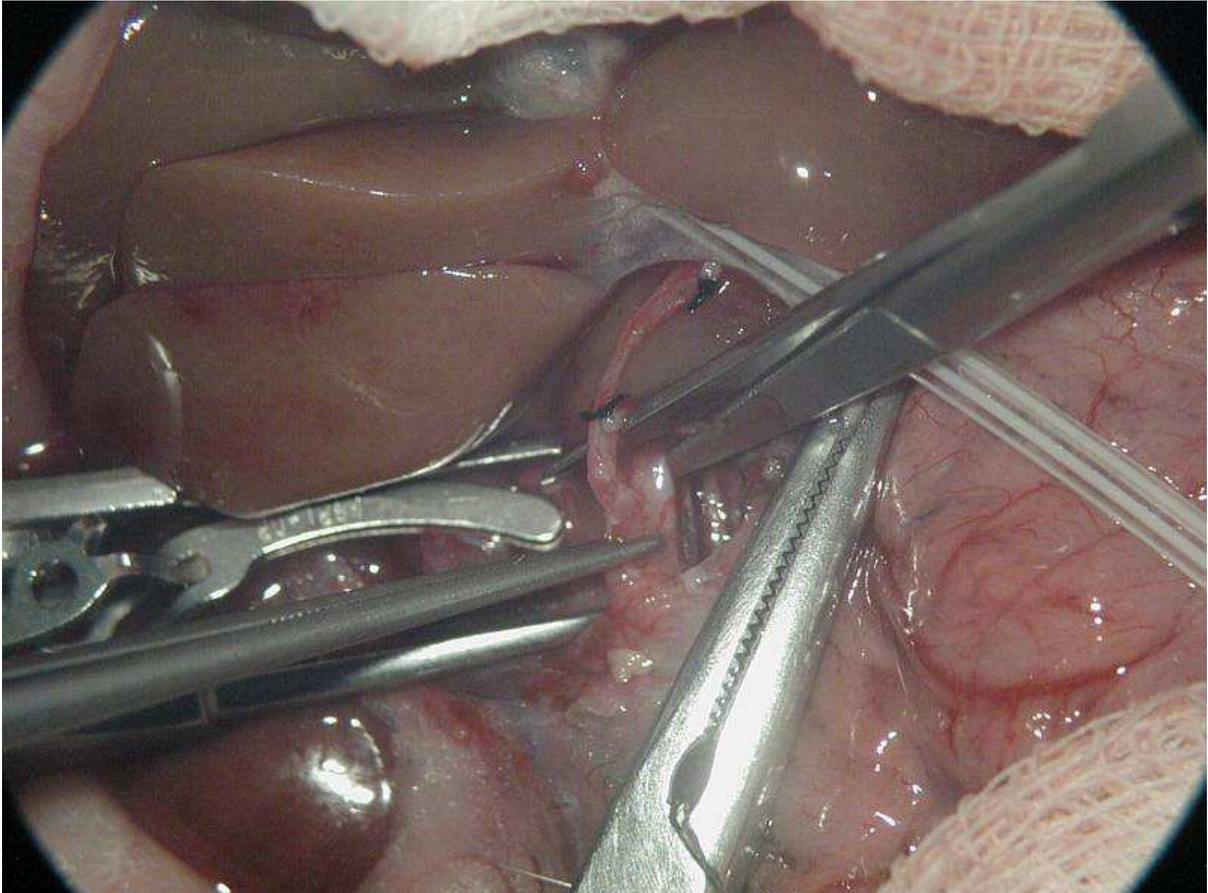


Abbildung 6: Perfusion mit vier Grad Celsius kalter Konservierungslösung und unmittelbar vor Ausschnitt des Aortenpatches. Die infrahepatische V. cava inferior ist mit einem Microclip verschlossen.

3.3.3 Empfängeroperation

Der operative Zugangsweg des Empfängertiers stellte eine mediane Laparotomie vom Xyphoid bis zur Blase dar. Die Lebermobilisation glich im Wesentlichen dem Vorgehen der Spenderoperation. Nach dem Absetzen der präpylorischen Vene wurde der Leberhilus über die Mobilisation der Pfortader bis zur Gabelung präpariert. Wenige Millimeter nach ihrem Abgang aus der A. hepatica communis wurde die A. hepatica propria und die A. gastroduodenalis ligiert und durchtrennt, so dass die A. hepatica communis als pulsierender Gefäßstumpf erhalten blieb. Unmittelbar an seiner Gabelung wurde der Gallengang abgesetzt. Somit war das Empfängertier zur Ausklemmung der nativen Empfängerleber und Implantation des Transplantates vorbereitet.

Durch das Setzen von Microclips auf die infrahepatische V. cava inferior und die V. portae hepatis wurde die Leber ausgeklemmt. Unter Mitnahme eines schmalen Zwerchfellsaums wurde auf die suprahepatische V. cava inferior eine Neonatal-

Klemme gesetzt. Die entsprechenden Gefäße wurden lebernah abgesetzt und die Leber konnte herausgetrennt werden. Das anhepatische Tier wurde um 180 Grad gedreht, so dass der Kopf des Tieres auf den Operateur zeigte. Während der anhepatischen Phase reagierte die Ratte bei stark reduziertem Herzminutenvolumen sehr empfindlich auf Narkosemittel, so dass die Anästhesie während dieser Operationsphase stark vermindert beziehungsweise ganz ausgesetzt werden musste. Das Spenderorgan durfte erst nachdem die UW-Lösung mit physiologischer Kochsalzlösung herausgespült worden war, implantiert werden. Entsprechend der Anatomie wurde das Transplantat im Situs platziert. Die Anastomisierung der suprahepatischen Vena cava inferior erfolgte zuerst.

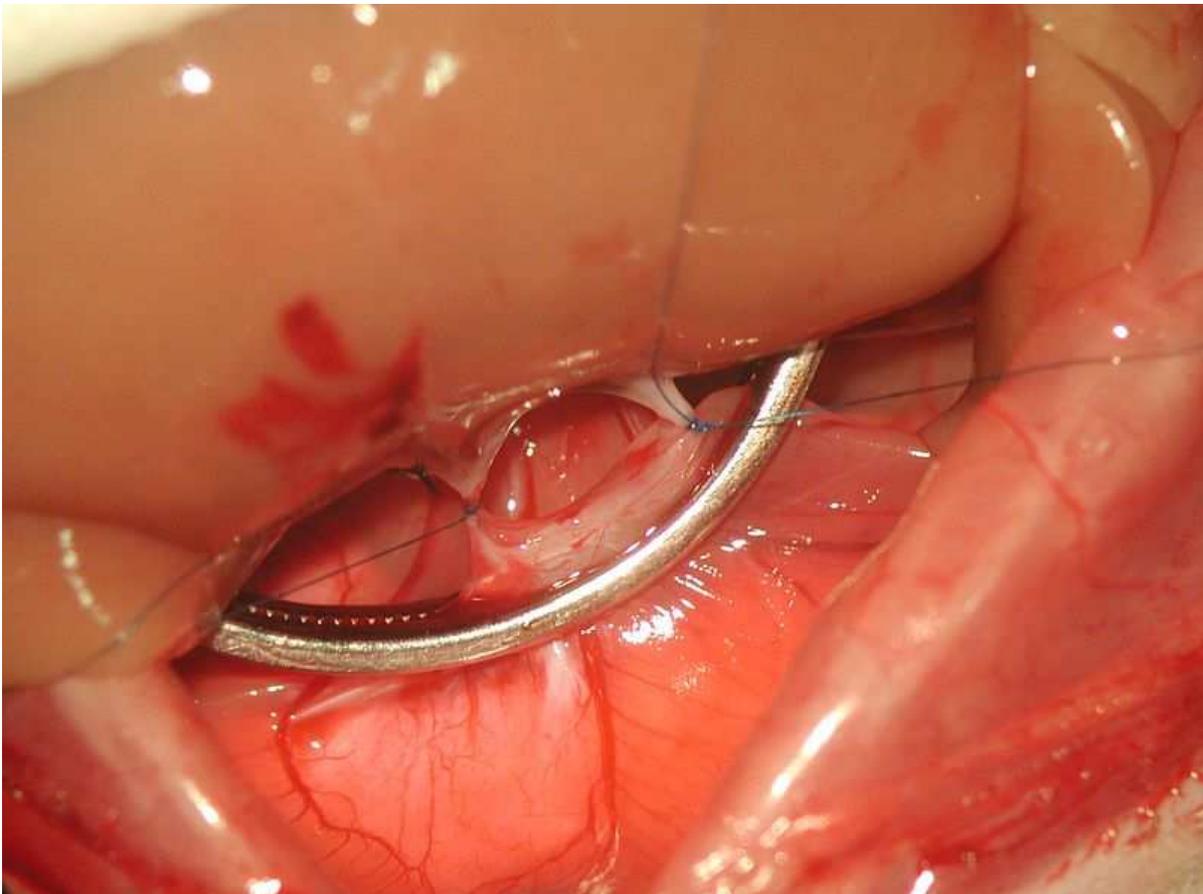


Abbildung 7: Gespannte Eckfäden mit Prolene 7-0 vor Beginn der Anastomosierung der suprahepatische Vena cava inferior.

Das Gefäßlumen wurde vor der Knotung des letzten Eckfadens mit physiologischer Kochsalzlösung über eine stumpfe Kanüle gefüllt, um den Verbleib von Luftblasen und eine potentiell letale Luftembolie nach Blutstromfreigabe auszuschließen. Das Tier wurde folglich wieder in die Ausgangslage gedreht und der Pfortaderstumpf am

Transplantat identifiziert und mit Prolene 8-0 anastomosiert. Vor der Freigabe des portalen Blutstroms wurde das obere Abdomen mit körperwarmer Kochsalzlösung gefüllt, um nach der Entfernung der Neonatal-Klemme von der suprahepatischen Vena cava inferior Luftembolien durch noch nicht geronnene Stichkanäle zu vermeiden. Dieser operative Vorgang bedingte eine anhepatische Zeit von circa 15 Minuten. In gleicher Weise wurde darauf folgend die infrahepatische Vena cava inferior identisch zur Pfortader fortlaufend mit Prolene 8-0 anastomosiert. Durch den Rückfluß des gestauten Blutes aus der unteren Körperhälfte, kam es zu einem Anstieg des Herzminutenvolumens. In der Folge wurde eine verbesserte Perfusion der Eingeweide sichtbar.

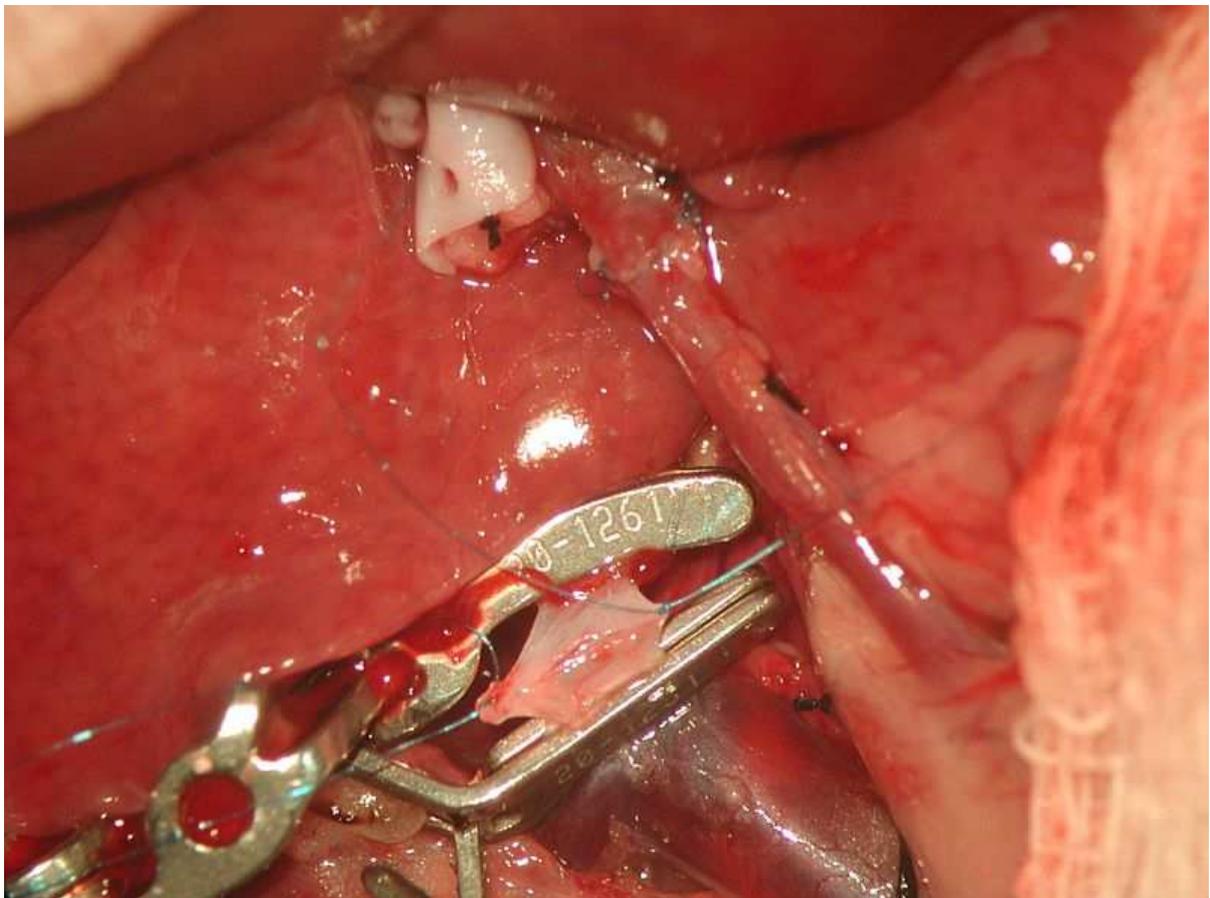


Abbildung 8: Anastomosierte Vena portae hepatis und bereits aufgespannte Eckfäden der infrahepatischen Vena cava inferior.

Über die zuvor freigelegte A. hepatica communis erfolgte der arterielle Wiederanschluß. Diese wurde an ihrer Basis mit einem Mikroclip geklemmt, in den Stumpf wurde eine 24G Dauerverweilkanüle eingebracht und mit einer Ligatur fixiert. In der Folge wurde der Truncus coeliacus des Spenders über den Stent gezogen und mit einer 6-0 Seidenligatur gegen ein Abrutschen gesichert. Es kam nach der

Entfernung des Mikroclips an der Arterienbasis zu einer sofortigen, deutlich sichtbaren Pulsation der supraanastomotischen Arterie und ihrer Aufzweigung im Leberhilus. Für die Gallengangsanastomose wurde eine 8-0 Prolene-Naht distal der Sicherungsligatur des Splints, durch den freien Rand des Spendergallenganges geführt. Der Splint wurde anschließend in den empfängerseitigen Ductus choledochus eingeführt und die beiden Ränder konnten mit drei Prolene 8-0 Einzelknopfnähten verbunden werden.

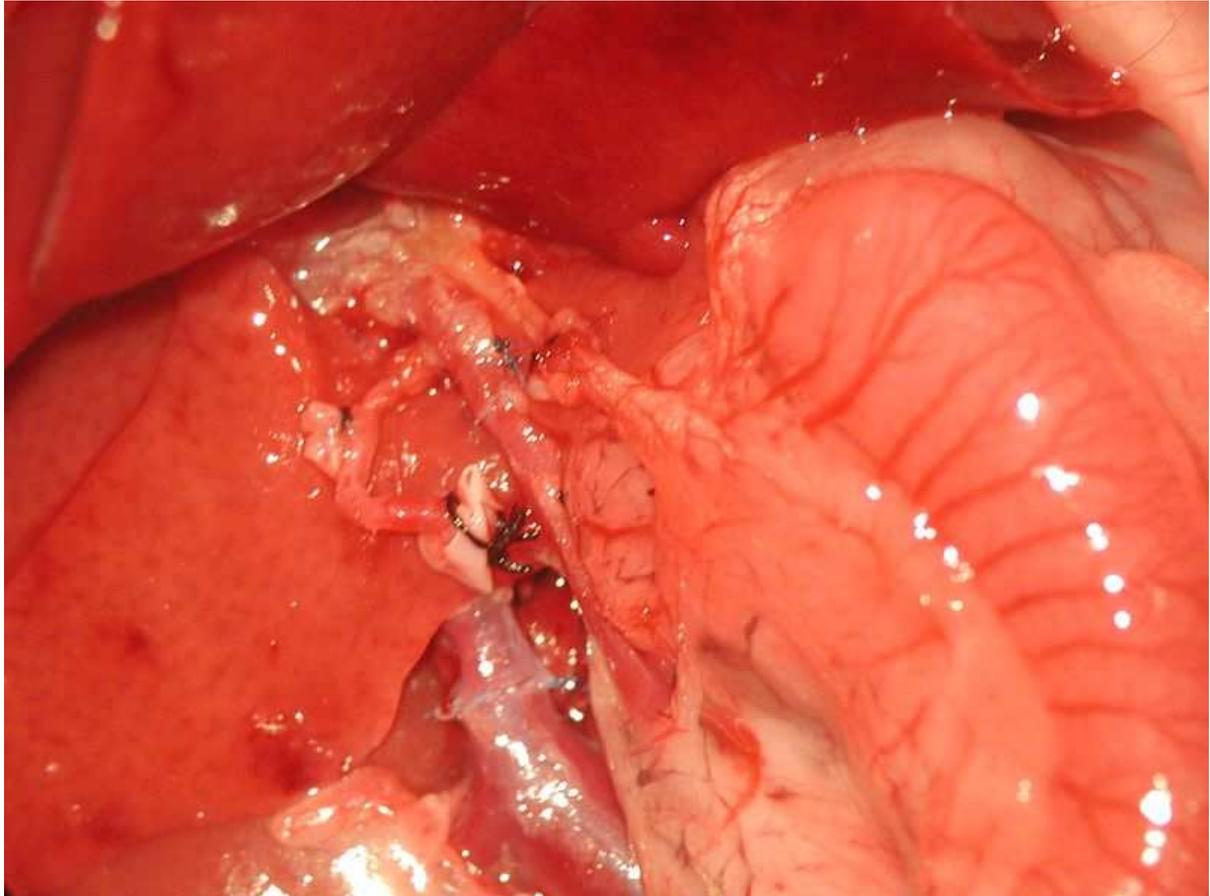


Abbildung 9: Abschließender Blick auf den Leberhilus und die infrahepatische Vena cava inferior nach kompletter Anastomosierung der Strukturen.

Abschließend wurde das Abdomen inspiziert und mit warmer Kochsalzlösung gespült. Zusätzlich erhielten die Tiere 1-2 ml Kochsalzlösung zur Volumenunterstützung intravenös appliziert. Das Fell und die Bauchwand wurden zweischichtig mit absorbierbarem Nahtmaterial (PDS 4-0) fortlaufend vernäht. Nach der Operation wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt. Dort verblieben sie bis zum Erwachen und konnten anschließend in Einzelhaltungskäfige gesetzt werden. Sämtliche Tiere hatten postoperativ freien Zugang zu Wasser und Futter ad libitum.

3.4 Histologische und molekularbiologische Untersuchungen

3.4.1 Probengewinnung

Mittels eines standardisierten Verfahrens wurde den Tieren für die feingewebliche Aufarbeitung von Gewebeproben und der Analyse des Blutes, zu den entsprechenden Zeitpunkten nach Reperfusion der Transplantatleber, Proben von Blut, Leber und Lunge entnommen. Diese wurden in Formalin (4%, wässrig, gepuffert) fixiert, beziehungsweise in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Entnahme erfolgte in Narkose, und der Tod des Tieres trat durch die Blutentnahme mit einem Katheter (Terumo 24 G) in der infrarenalen Aorta ein.

3.4.2 Isolierung von RNA

3.4.2.2 RNA-Präparation

Es wurde eine Lösung die Guanidinisothiocyanat und Phenol enthielt (RNAPure), für die Präparation der Gesamt-RNA aus Zellen genutzt. Durch die chaotropen Eigenschaften von Guanidinisothiocyanat werden Phenol-Proteine denaturiert. Es wurde ein Dreiphasen-Gemisch durch die Zugabe von Chloroform generiert. Mit Isopropanol wurde die in der oberen wässrigen Phase gelöst liegende RNA ausgefällt. Die Proteine und die DNA aus den Zellen waren in der Interphase und der unteren organischen Phase enthalten. Es wurden jeweils 5×10^4 Zellen mit 3,2 mL Standardmedium in die Vertiefungen einer 6-Lochplatte für die Echtzeit-PCR ausgesät. Die Zellen wurden bei 800 U/min 10 min zentrifugiert und danach 24 Stunden im Brutschrank zur Unterstützung der Zelladhäsion angezchtet. Das Medium wurde vorsichtig abgegossen und es erfolgte die Waschung der Zellenrasen zweimal mit je 3 mL Grundmedium. In jede Vertiefung wurde anschließend 3,2 mL Reduktionsmedium pipettiert. Das Reduktionsmedium wurde nach 24 Stunden abgenommen und komplett mit KVI-F oder mit TGF- β als Reduktionsmedium ersetzt. Für weitere 24 Stunden erfolgte nun die Inkubation der Zellen. Die freie RNA und DNA wurden ausschließlich mit DEPC behandeltem Wasser bearbeitet. Daher wurde 500 mL Aqua bidest. mit 250 μ L DEPC versetzt und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Durch Autoklavierung (25 min, 121°C, 1 atm) gelangte das DEPC zur Zerstörung. Die in den Vertiefungen einer 6-Loch-Platte befindlichen Zellen aus

der Kultur wurden direkt mit je 1 mL der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Lösung lysiert und mit 200 µL Chloroform versetzt. Nach der Überführung in ein Reaktionsgefäß, wurden die Lysate mit der Hand kräftig geschüttelt und 10 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert. Sämtliche weiteren Zentrifugationsschritte wurden entsprechend gleich durchgeführt. Nach der achtsamen Abpipettierung und Überführung der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, wurde diese mit 500 µL Isopropanol und 2 µL Glycogen versetzt. Die Ansätze wurden nach 1 Stunde bei -20 °C zentrifugiert und der Überstand konnte entfernt werden. Das entsprechende Präzipitat wurde zweimal mit 1 mL 75% Ethanol (unvergällt) gewaschen. Nach der erfolgten Lufttrocknung wurde das Pellet in 20 µL DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

3.4.2.3 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Absorptionen der RNA-Präparation wurden bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm, den Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren und Proteinen beziehungsweise Phenol, für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA ermittelt. Für die Konzentrationsbestimmung der RNA wurde ein Näherungswert verwendet, da die genauen Sequenzen der RNA unbekannt sind und eine große Vielfalt der Moleküle vorlag. Eine Konzentration von 40 µg/mL einzelsträngiger RNA entsprach hierbei einer Absorption von „1“ bei 260 nm. Eine Aussage über die Reinheit der RNA-Präparation kann über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm gemacht werden, dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. Sind die Verhältniswerte niedriger weist dieses auf eine Kontamination durch Proteine oder Phenol hin. Zur Verdünnung der 4 µL RNA-Lösung wurde 96 µL DEPC-behandeltes Wasser benutzt, anschließend wurde dieses Produkt für die photometrische Bestimmung in eine Quarzküvette überführt. Bei 260 nm und 280 nm wurden die Absorptionen im Vergleich zu DEPC-behandeltem Wasser gemessen.

3.4.2.4 Reverse Transkription

Die isolierte mRNA wurde mit Hilfe der reversen Transkription in die korrespondierende cDNA umgeschrieben. In einem Reaktionsgefäß wurden für die Erststrangsynthese 1 µg Gesamt-RNA mit 0,5 µL 500 µmol/L Oligo dT-Primer und 0,5 µL 200 µmol/L Random Hexamer Primer gemischt und daraufhin konnte das Volumen mit DEPC-behandeltem Wasser auf 9,6 µL aufgefüllt werden. Zur

Alle in Tabelle 5 aufgezeigten Oligonukleotide wurden durch die Firma Sigma synthetisiert und hatten eine für die PCR geeignete Reinheit. Alle Sonden waren am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit 6-Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) konjugiert.

3.4.3.2 Durchführung der Echtzeit-PCR

Zur Vervielfältigung (Amplifizierung) von DNA ist die PCR eine Methode bei der mit einer Polymerase eine Sequenz amplifiziert wird, die zwischen zwei Regionen bekannter Basensequenzen liegt. Spezifisch komplementäre Oligonucleotide auch Primer genannt binden an diese Regionen und dienen der DNA-Polymerase als Startsequenz. Die Bindung der Primer erfolgt an dem vorher aufgetrennten Doppelstrang, jeweils an dem Sense-Strang und an dem komplementären Antisense-Strang. Die DNA-Polymerase synthetisiert von den ausgehenden 3'-OH-Enden der Primer, den neuen Strang nur vom 5'-zum 3'-Ende. Die Denaturierung, also die wiederholte Abfolge des Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges, die Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen, Annealing genannt, und die Synthese des neuen komplementären Stranges, auch Elongation genannt, werden in ihrer Gesamtheit als Zyklus bezeichnet. Die synthetisierten neuen DNA-Stränge dienen als Matrize für den nächsten Schritt der Amplifikation. Von einem DNA-Molekül könnte man theoretisch nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen (n) eine Anzahl von 2^n Molekülen produzieren. Heutzutage wird eine DNA-Polymerase die ursprünglich aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) isoliert wurde, für die gebräuchliche PCR verwendet. Diese zeichnet sich durch ihre Thermostabilität aus und toleriert strenge Temperaturregime ohne Verlust ihrer enzymatischen Aktivität.

Zusätzlich wird für die Amplifikation zu den beiden endständigen Primern bei der LightCycler-Echtzeit-PCR nach der Taqman-Methode, ein drittes Oligonukleotid eingesetzt, das an eine Sequenz zwischen diesen beiden Primern bindet. Die Exonuklease der *Taq*-Polymerase baut die fluoreszenzmarkierte Sonde bei der Elongation ab, hierdurch gehen die Nukleotide in Lösung und eine typische Emission des Reporters kann gemessen werden. Der „Cycle Threshold“ (CT-Wert) dient der Analyse. Er beschreibt die Zyklanzahl, bei der sich zum ersten Mal das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes über der Basislinie der Fluoreszenz darstellt.

Es wurde für jeden Reaktionsansatz jeweils 1 µL der cDNA aus dem Ansatz der reversen Transkription und 9 µL eines Gemisches aus 6,5 µL DEPC-behandeltem Wasser, 1,2 µL MgCl₂-Lösung und 1 µL Primer-Sonden-Mix (0,5 µmol/L Primer, 0,125 µmol/L Sonde) in spezielle Glaskapillaren für die Echtzeit-PCR pipettiert. Nach dem Verschluss der Kapillaren wurden diese 1 Sekunde bei 3000 U/min anzentrifugiert. Mit den folgenden Parametern wurde die quantitative PCR durchgeführt (Tab.6).

Neben dem mRNA-Spiegel der zu untersuchenden Gene wurde auch die Expression des Haushaltgenes Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) bestimmt. In der Leber wird es in großen Mengen relativ konstant auf einem hohen Expressionsniveau und unabhängig von äußeren Einflüssen in der Zelle konstant exprimiert. Somit dient es als Bezugsgröße für die Zellmenge der verwendeten Probe.

Tabelle 6: Prozessparameter der Echtzeit-PCR. Die genannte Haltezeit ist der Zeitraum die bis zur nächsten Änderung der Temperatur beibehalten wurde. Sämtliche Temperaturen wurden mit einer Steilheit von 20°C/sec verändert.

Prozess	Temperatur (°C)	Haltezeit (sec)	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95	600	1
Denaturierung	95	0	30
Annealing	60	15	
Elongation	72	6	

Tabelle 7: Stoffe für die Laboruntersuchungen

Verbindung	Hersteller
5x Reaktionspuffer für reverse Transkription	Peqlab, Erlangen, BRD
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)-Lösung	Biorad, München, BRD
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen, BRD
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, BRD
Chloroform	Merck

Coomassie-Lösung; G-250, Bio-Soft™	Biorad
Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Lösungen: 100 mmol/L	Promega, Mannheim, BRD
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, BRD
Dinatriumphosphat, Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Promega
Dulbeccos Modified Eagle Medium mit 862 mg/L L-Alanyl-Glutamin und 110 mg/L Na-Pyruvat (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Essigsäure (HOAc); Eisessig	Merck
Ethanol; 70%, vergällt	Merck
Ethanol; absolut	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen
Gentamycin	Ratiopharm, Ulm, BRD
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
Glycogen	Peqlab
Isopropanol	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
L-Ascorbinsäure	Sigma
Light Cycler Hybridisation-Probe Fast Start-Kit	Roche, Mannheim, BRD
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Promega
Methyl- ^3H -Thymidindesoxyribonukleotid (Thymidin)	(^3H -Amersham, Little Chalfont, UK

Molekulargewichts(M _r)-Standard für Proteine; Tricom	Pierce, Bonn, BRD
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma
Pepsin	Sigma
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , pH 7,2 (PBS)	Biochrom, Berlin, BRD
Reverse Transkriptase; ImProm-II TM	Promega
RNA-Extraktionsreagenz; RNAPure	Peqlab
RNase-Inhibitor; RNAsin	Promega
Salzsäure (HCl)	Merck
<i>Transforming Growth Factor</i> (TGF)-β1; recombinant, human	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Trishydroxyethylaminomethan (Tris)	Sigma
Triton-X100	Sigma
Trypanblau (0,05%)-Lösung	Biochrom
Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%), sterile Lösung in PBS	Biochrom

Tabelle 8: Materialien und Geräte für die Laboruntersuchungen

Bezeichnung	Hersteller
-------------	------------

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen, BRD
Anlage zur Herstellung von <i>Aqua bidest.</i>	Millipore, Bedford, USA
Autoklav Typ Varioclav	H+P Labortechnik, München, BRD
<i>Cell Harvester</i> , Typ 11900	Skatron, Lier, Norwegen
CO ₂ -Brutschrank; Typ BB16	Heraeus, Hanau, BRD
Multipette mit Combitips	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Dialyseschlauch; Ausschlussgröße ~ 30.000 Dalton	Serva
Einwegpipetten; steril	BD Biosciences, Heidelberg,
Gefriertrocknungsanlage; Typ Beta 1-8K	Christ, Osterode, BRD
Glasfaserfilter; Filtermat 102 x 258 mm	LKB Wallac, Turku, Finnland
Glaskapillaren für LightCycler	Roche
Heizblock	Brandt, Wertheim, BRD
Bezeichnung	Hersteller
Horizontalschüttler	GFL, Wunstorf, BRD
Inkubator, Typ 6120	Heraeus
Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast	Zeiss, Oberkochen, BRD
Kammer und Zubehör für die vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE); Mini-Protean II	Biorad
Kühlbox	Roche
Kühlschrank (4°C)	Bosch, Stuttgart, BRD
Kühlzentrifuge, Typ CH-J2	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Lagertank für flüssigen Stickstoff	Teclab, Königstein, BRD
LightCycler	Roche

Oberschalenwaage	Acculab, Göttingen, BRD
Objektträger und Deckgläschen	Menzel Gläser, Braunschweig,
pH-Meter mit Einstabmesskette; Typ 766 Calimatic	Knick, Berlin, BRD
Quarzglasküvetten	Hellma, Müllheim, BRD
Reaktionsgefäße (0,4 ml und 1,5 ml; Polypropylen)	Peqlab
Rührmotor mit Propellerrührer; Typ RW-15	IKA, Staufen, BRD
Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom	Flow Laboratories, Meckenheim, BRD
Spektrophotometer	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Stromversorger	Biorad
Szintillationswachs	LKB Wallac
Szintillationszähler 1450-Microbeta	LKB Wallac
Thermocycler	Biorad
Tiefkühlschrank (-20°C)	Bosch
Tiefkühlschrank (-80°C)	Forma Scientific, Karlsruhe , BRD
Ultraturrax	IKA
Vortex	IKA
Wasserbad; Typ 1002	GFL
Zählkammer nach Neubauer	Brandt
Zellkulturflaschen, 75 cm ² Bodenfläche	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten, 6-Loch, Flachboden	BD Biosciences
Zellkulturplatten, 96-Loch, Flachboden	BD Biosciences
Zentrifuge für Reaktionsgefäße, Typ Minifuge RF	Heraeus

3.4.4 Paraffineinbettung

Das Lebergewebe wurde am Tag der Entnahme für mindestens 24 Stunden in 4-prozentigem PBS-gepuffertem Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Die Einbettung erfolgte im Paraffin-Einbettautomaten Hypercenter-XP der Firma Shandon.

3.4.5 Hämatoxilin-Eosin (H.E.)-Färbung

Zur histologischen Bewertung der Präparate, insbesondere der Kontrolle der Verfettung, wurde eine Hämatoxilin-Eosin (H.E.)-Färbung durchgeführt. Vom eingebetteten Material wurden höchstens 5 µm starke Paraffinschnitte angefertigt. Anschließend wurden diese zur Aufbereitung und Glättung in einem Wasserbad bei 20 und nachfolgend 40 Grad Celsius schwimmend gelagert. Danach wurden die Schnitte auf einen Superfrost Plus Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumluft getrocknet. Danach erfolgte wie nachfolgend beschrieben die Entparaffinierung:

2x Paraclear-Lösung für je 15 min, 1x Alkohol 100 % für 2 min, 1x Alkohol 96 % für 2 min, 1x Alkohol 80 % für 2 min, 1x Alkohol 70% für 2min. Unmittelbar danach erfolgte das Abspülen mit Aqua dest. und Färbung der Kerne mit Harris-Hämatoxilin-Lösung für 20 Minuten. Danach erfolgte Spülung unter fließendem Wasser für 3 Minuten. Die Schnitte wurden für 2 Minuten in Eosin-Lösung getaucht. Die Eosin-Färbung führt zur Darstellung der Proteine und des Plasmas in den Zellen.

Abschließend wurden die Präparate in 80 % Ethanol gespült und über eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraclear-Lösung überführt. Die Schnitte wurden mit Roti-R-Histokit eingedeckt. Es wurden Eosin und Hämatoxilin von der Firma Sigma, Steinheim (HAT 110232 bzw. HH S32) verwendet, EtOH stammte von der Firma Herbeta, Berlin (200-578-5).

3.4.6 Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung

Die Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung wurde zur Bestimmung der Nekrosen durchgeführt. Hierzu wurden die in destilliertem Wasser gespülten Objektträger mit den Leberschnitten für 10 bis 15 Minuten in Periodsäure (0,7 % in 70 % Ethanol) gestellt, dann zweimal in Wasser gespült und mit Schiffs-Reagenz gefärbt. Dann wurden die Objektträger unter fließendem kaltem Leitungswasser gespült und nochmals 5 Minuten im Wasser stehen gelassen. Anschließend erfolgte eine

Gegenfärbung der Schnitte mit Hämalan (Kernfärbung) über einen Zeitraum von einer Minute. Die Präparate wurden kurz in HCl-Alkohol (1 % in ca. 70 % Ethanol) differenziert, in warmem Wasser gespült und über Nacht luftgetrocknet. Über eine aufsteigende Alkoholreihe erfolgte die Entwässerung der Schnitte, anschließend wurden die Präparate mit Entellan und einem Deckglas eingedeckt. Für die PAS-Färbung wurde das PAS-Färbekit der Firma Merck, Darmstadt verwendet (Art. 1.01646).

3.4.7 Bestimmung der relativen Nekrosefläche

Sämtliche Objektträger die mit der Standardfärbung PAS gefärbt waren, wurden zur Bestimmung der Nekrose herangezogen. Hierzu wurde die Gesamtfläche des auf dem Objektträger jeweils befindlichen Leberparenchyms an einem LaborluxS-Lichtmikroskops (Leitz, Wetzlar, Deutschland) und dem Programm Scan®Pro Version 2.0 (Jandel Sigma, Erkrath, Deutschland) bestimmt. Die Ausmessung der Nekrosefläche erfolgte an einem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) mit digitaler Kamera und einer digitalen Bildverarbeitungssoftware (Meta Imaging Series, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland). Den prozentualen Anteil der Nekrosefläche an der gesamten Leberparenchymfläche erhält man nach folgender Formel:

$$\text{Relative Nekrosefläche der Leber in \%} = \frac{\sum \text{Nekrosefläche} \times 100}{\sum \text{Gesamtleberfläche}}$$

3.4.8 Immunhistochemische Verfahren (LSAB mit HRP/DAB Färbung)

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden aus dem Formalin fixierten Gewebe Paraffinschnitte in der Stärke von 2 – 3 µm angefertigt. Die Einbettung und Entparaffinierung erfolgte wie unter 3.4.4 beschrieben. Nach der Entparaffinierung erfolgte die spezielle Vorbehandlung für die Immunhistochemie. Dieser Prozess ist wegen des erforderlichen Qualitätsmanagements durch die Firma DakoCytomation standardisiert. Hierfür wurde der Dakon K0679 LSAB-Kit benutzt. Die Blockierung der endogenen Phosphatase erfolgte durch entsprechendes Eintauchen in die Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach erfolgte das Abspülen der Schnitte mit Aqua dest und Einbringung in TBS-Puffer für 10 Minuten. Danach wurden die Schnitte für mindestens 20 min im Dampfgarer mit einem Citrat-Puffer bei

einem pH-Wert von 6,0 gekocht um eine Antigen-Demaskierung zu erzeugen. Hiernach erfolgte ein erneutes Abspülen unter fließendem Wasser.

Hinzu kam eine Lösung zur Blockade der Proteine. Hiernach erfolgte eine Inkubation über mindestens 30 Minuten mit primären Antikörpern, deren Angaben sind in der Tabelle 9 zu ersehen. Das LSAB+ System HRP/ DAB Färbung Kit basiert auf einer indirekten Streptavidin-Biotin-Methode. Hierbei reagiert das biotinylierte Antikörperreagenz mit Kaninchen-, Ratten- und Mausimmunglobulin. Diese Methode erfordert nur die Anwesenheit eines sekundären Reagenz für primäre Kaninchen- und Mausantikörper. Das sekundäre Antikörperreagenz wurde unter Verwendung eines mit 7 Atomen besetzten Spacer-Arms mit Biotin markiert. Diese sekundären Antikörper wurden für circa 15 Minuten inkubiert und es erfolgte die obligatorische Spülung mit TBS-Lösung. So war es möglich, dass jedes biotinylierte Antikörpermolekül mit eigenen an alkalische Phosphatase konjugierten Streptavidinmolekülen reagieren konnte. Diese Lösung wurde ebenfalls für 15 Minuten inkubiert. Die Färbung war nach der Inkubation mit der Substrat-Chromogen-Lösung (DAB-Färbung) durchgeführt worden. Die angefärbten Gewebeschnitte wurden danach mit Hämatoxilin gegengefärbt, dann erfolgte das Bläuen unter Leitungswasser. Die Schnitte wurden abschließend mit Glyceringelatine eingedeckt. Die Diagnosestellung erfolgte jeweils am H.E.-gefärbten Paraffinschnitt. Die unmittelbar anschließenden Schnitte des paraffinfixierten Gewebeblockes wurden für die immunhistochemischen Färbungen verwendet. Es wurden bei allen jeweiligen Objektträgern, neun „high power fields“ analysiert, sowie entsprechende markierte Zellen gezählt und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte randomisiert und ohne Wissen um die experimentelle Gruppe.

Tabelle 9: Antikörper der LSAB-Methode

Antigen	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
Hypoxyprobe™-1 Mab1	IgG 4.3.11.3	1:50	Chemicon
TNF- α	Polyklonal	1:250	Biomol

3.4.8.1 Hypoxyprobe™

Das Hypoxyprobe™-1-Kit dient der Detektion von Gewebehypoxie (Pimonidazol von Chemicon, USA und Kanada). Der Marker besitzt eine heterozyklische Nitroverbindung (Nitroimidazol). Es handelt sich dabei um eine Substanz, die durch

intrazelluläre Nitroreduktasen zu einem Nitroradikal-Anion reduziert wird (96), das anschließend an ein Makromolekül (in erster Linie RNA) der Zelle bindet. Hierbei ist das reduzierte Anion für diesen Bindungsvorgang nur in Abwesenheit von Sauerstoff ausreichend stabil, so dass die Bindung dieser aromatischen Nitroverbindung nur in hypoxischen bzw. anoxischen Zellen möglich ist (97).

Den Tieren der Gruppen II/1 und II/2 wurden 30 Minuten vor der Tötung, 60 mg pro Kilogramm Körpergewicht Hypoxyprobe™ verabreicht.

3.4.9 Laborchemische Untersuchung

Zur Bestimmung der AST, ALT, LDH und GLDH wurden den Tieren zum Tötungszeitpunkt Blutproben entnommen.

Aspartat-Amino-Transferase, abgekürzt AST, auch Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) genannt, ist ein Enzym mit höchsten Konzentrationen im Herzmuskel, im Skelettmuskel und in der Leberzelle. Erhöhte Werte finden sich bei Erkrankungen der Leber- und Gallenwege, beim frischen Infarkt und Erkrankungen der Muskulatur. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:

Ketoglutarat + Aspartat $\xrightarrow{\text{GOT}}$ Glutamat + Oxalacetat
 Oxalacetat + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Pyruvat + NAD⁺

Die NADH-Abnahme ist photometrisch bestimmbar und proportional zur Enzymaktivität.

Alanin-Aminotransferase, abgekürzt ALT, auch Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) genannt, kommt in höchster Konzentration in der Leberzelle vor, aber auch in Skelett- und Herzmuskulatur. Schon geringe Zellschädigungen können zu erhöhten Blutwerten führen. Erhöhte Werte finden sich bei Erkrankungen der Leber- und Gallenwege, insbesondere Virushepatitis, Mononukleose und toxischen Leberschädigungen in Kombination mit erhöhten GGT- und GOT (AST)-Werten.

Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:

Ketoglutarat + Alanin $\xrightarrow{\text{GPT}}$ Glutamat + Pyruvat
 Pyruvat + NADH + H⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Lactat + NAD⁺

Die NADH-Abnahme ist photometrisch bestimmbar und ist proportional zur Enzymaktivität.

Die Glutamatdehydrogenase (GLDH) ist in den Hepatozyten ausschließlich intramitochondrial lokalisiert. Ihre Zunahme im Blut wird durch eine Schädigung dieser Zellen hervorgerufen und deutet also auf einen besonders schweren

Leberschaden hin. Sie erlaubt somit eine Beurteilung von Schwere und Ausmaß einer akuten Leberparenchymschädigung. Die Messung erfolgte durch enzymatische Tests mit Messung der Indikatorreaktion (Absorptionsabnahme des NADH).

Die Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität im Blut wird in Wirklichkeit nicht von einem Enzym, sondern von fünf zwar ähnlichen, aber doch verschiedenen Enzymen, den LDH-Isoenzyme 1 bis 5 verursacht. Im Herzmuskel und den roten Blutkörperchen vorwiegend LDH 1 und LDH 2, in Milz, Lunge und Lymphknoten LDH 3 und in Leber und Muskel LDH 4 und LDH 5. Stärker erhöhte Werte finden sich dementsprechend bei Hämolyse, Herzinfarkt, Lebererkrankungen, malignen Erkrankungen, letztlich bei allen Erkrankungen, bei denen es zu einer Zellschädigung kommen kann, ohne jedoch spezifisch zu sein. Auch Leistungssport und körperliche Arbeit können zu Erhöhungen führen. Das Enzym katalysiert eine Reaktion bei der NAD zu NADH reduziert wird. Die NADH-Zunahme ist photometrisch bestimmbar und ist proportional zur Enzymaktivität.

$L - \text{Lactat} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Die Blutbestimmungen wurden mit einem Analyseautomaten der Firma Roche/Hitachi (Modular P800) durchgeführt. Die genutzten in vitro Tests zur quantitativen Bestimmung von ALT und AST waren von der Firma Roche und Tests für die Bestimmung von LDH und GLDH stammten von der Firma Boehringer Mannheim Systems.

3.4.10 Apoptose-Nachweis in Zellen mittels TUNEL-Reaktion

Durch die Detektion und Markierung von freien 3'-OH-Enden wurde der Nachweis von Strangbrüchen in der genomischen DNA durch die „TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling-Reaktion“ (TUNEL) erbracht. Diese Strangbrüche sind typisch für apoptotische Zellen. Hierzu wurde das „In Situ Apoptosis Detection Kit TACS TdT DAB“ (R&D Systems, TA 4625, MN, USA) genutzt. 5 µm dicke Kryostatschnitte der Leber wurden 2 Stunden bei 37° Celsius getrocknet und dann mit Formaldehydlösung fixiert. Durch die 15-minütige Proteinase K-Verdau wurden die DNA-Fragmente für Reaktionsenzyme sensibilisiert und es erfolgte die Permeabilisation. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch die 5-minütige Anwendung einer hydrogenperoxidhaltigen Quencher-Solution blockiert. Die Schritte der eigentlichen Labeling-Reaktion wurden dann noch 5 Minuten mit TdT-Labeling-Puffer vorbereitet. Biotinilierte Nukleotide werden beim Labeling an die freien 3'-OH

Enden der DNA-Strangbrüche mittels terminaler Desoxynukleotidtransferase (TdT-dNTP) gebunden. Die Schnitte wurden hierzu mit dem Labeling Reaction Mix bei 37°C eine Stunde lang im Brutschrank aufbewahrt. Das 5-minütige Eintauchen der Schnitte in den TdT Stopp-Puffer diente der Unterbindung der Reaktion. Über eine Zeit von 10 Minuten wurden die biotinierten Nukleotide mit Streptavidin-Peroxidase Konjugaten identifiziert, hieran konnte dann in der anschließenden Färbereaktion der Farbstoff Diaminobenzidin (DAB) andocken. Die DAB-Working-Solution wirkte 2 Minuten ein und die Gegenfärbung erfolgte danach durch 12-sekündiges Eintauchen der Schnitte in Methylgrün Lösung. Es wurden bei allen Objektträgern, neun „high power fields“ analysiert, sowie entsprechende apoptotische Zellen gezählt und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung erfolgte randomisiert und ohne Wissen um die experimentelle Gruppe.

3.4.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das SPSS Software-Paket Version 16.0 (SPSS Corp., Birmingham, AL, USA) verwendet. Die graphische Darstellung erfolgte mit SPSS und Sigma-Plot (Sigma-Plot Version 8.0). Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Nach Varianzanalyse mit dem Levene`s Test wurden die Gruppenunterschiede mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben überprüft. Die Differenzen der Überlebenszeiten wurden mit Kaplan-Meier Kurven dargestellt und Unterschiede mit dem log-rank Test bestimmt (generalisierter Savage/Mantel Cox Test). Statistische Signifikanz wurde bei allen Untersuchungen bei einem p-Wert kleiner 0,05 akzeptiert.

4 Ergebnisse

4.1 Überleben

Die kumulative Überlebensrate der Tiere die mit rhEPO behandelt worden sind, war signifikant höher, als die der Tiere die nur mit Kochsalzlösung behandelt wurden. RhEPO vs. NaCl: 86,6% (n=30; 26 überlebt/4 gestorben) vs. 65% (n=40; 26 überlebt/14 gestorben) ($p=0,031$). Sämtliche verstorbenen Tiere kamen circa innerhalb der ersten 4 Stunden nach der Operation zu Tode und wiesen in der Obduktion alle Zeichen eines hyperakuten Transplantatversagens auf (Abb. 10).

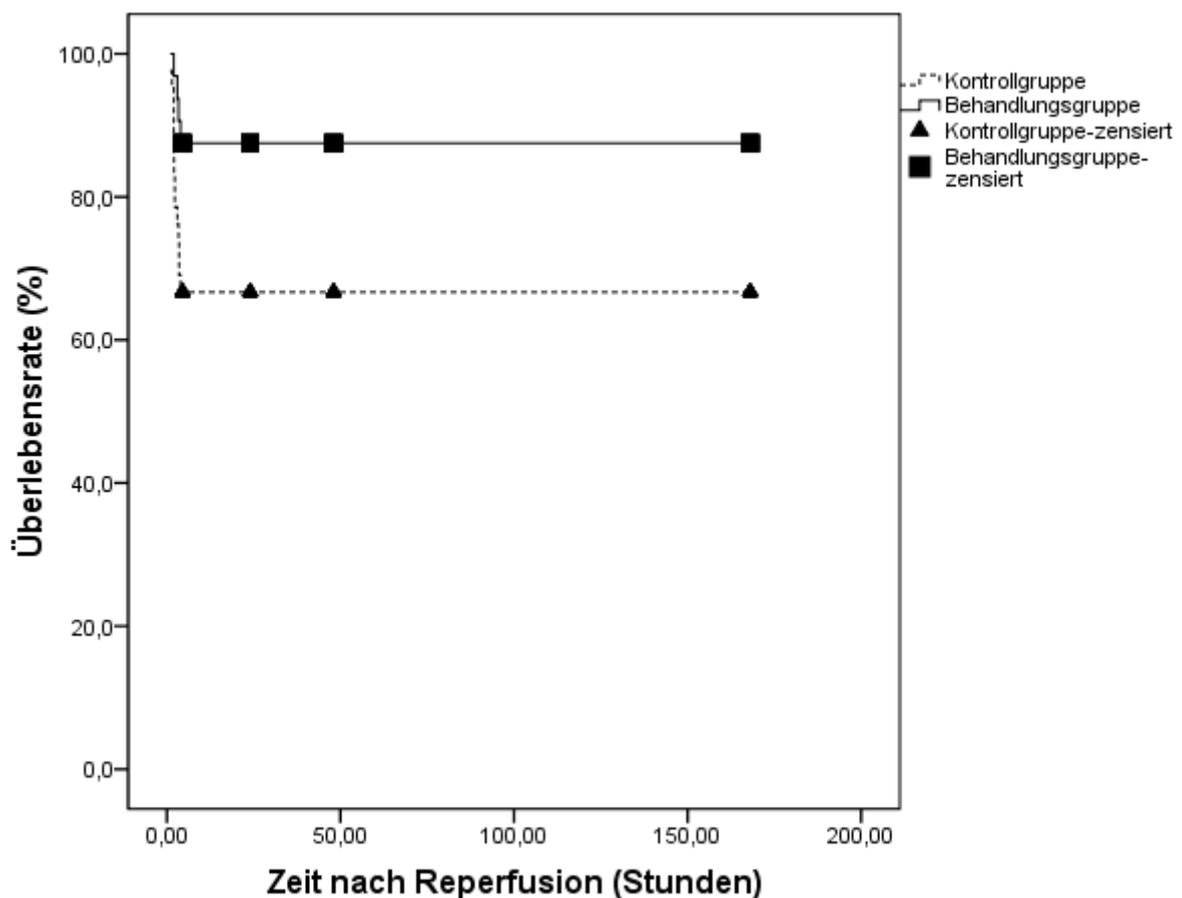


Abbildung 10: Darstellung des kumulativen Überlebens mit Zensur zu den jeweiligen elektiven Tötungszeitpunkten. Daten angegeben in Prozent und Stunden; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion;

4.2 Nekrosebestimmung durch PAS-Färbung

In der Gruppe die mit rekombinanten humanen Erythropoietin behandelt wurde, zeigten sich nach 2 Stunden deutlichere Nekrosen als in der Kontrollgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung): $0,0107 \pm 0,0284$ (Gruppe I/1, n=7) vs. $0,436 \pm 0,954$ (Gruppe I/2, n=7). Die Nekrosen waren nach 4,5 Stunden immer noch deutlich ausgeprägter in der Behandlungsgruppe anzutreffen, allerdings nahm der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe ab (Mittelwert \pm Standardabweichung): $0,0374 \pm 0,0536$ (Gruppe II/1, n=7) vs. $0,146 \pm 0,338$ (Gruppe II/2, n=7). So stellte sich nach 24 Stunden eine geringere Nekroserate in der Behandlungsgruppe dar (Mittelwert \pm Standardabweichung): $0,7510 \pm 1,1380$ (Gruppe III/1, n=7) vs. $0,677 \pm 0,77$ (Gruppe III/2, n=7). Diese verhältnismäßige Verringerung der Nekroserate zu Gunsten der Behandlungsgruppe nahm in den nachfolgenden Untersuchungszeitpunkten zu (Mittelwert \pm Standardabweichung): $0,1320 \pm 0,2680$ (Gruppe V/1, n=5) vs. $0,0014 \pm 0,0033$ (Gruppe V/2, n=5) (Abb. 11, 12, 13). Die ermittelten Werte wiesen keine Signifikanz auf.

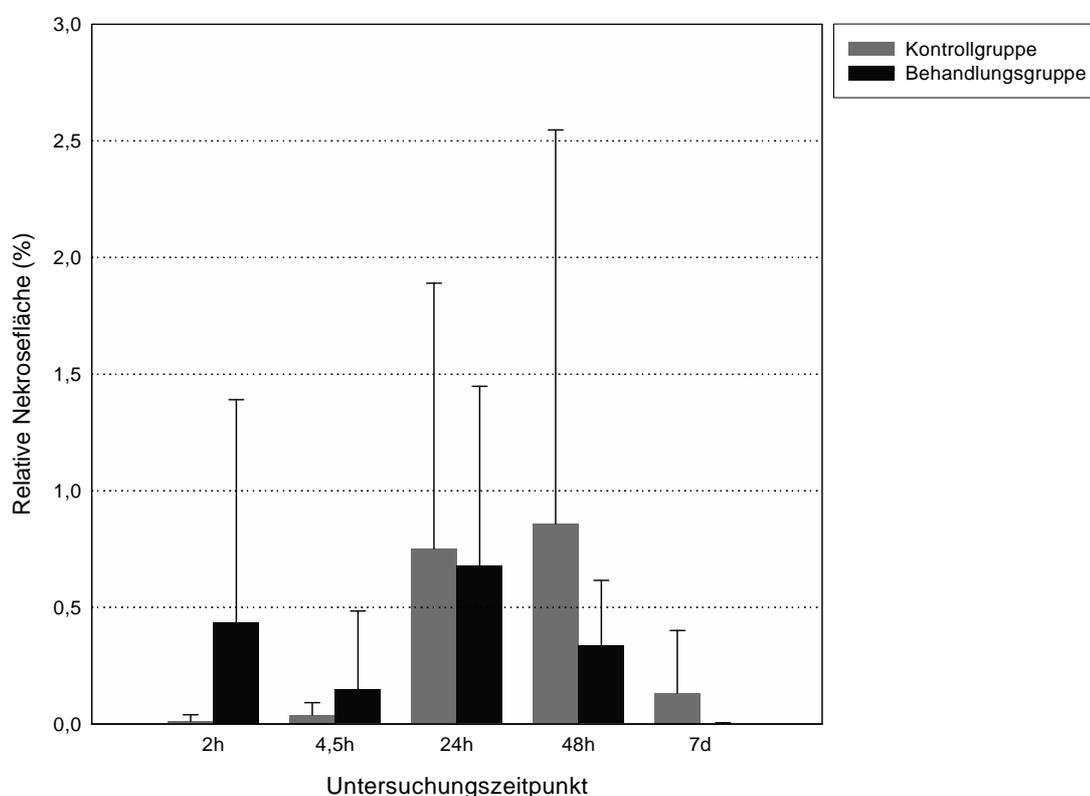


Abbildung 11: Vergleich der relativen Nekrosefläche zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind in Prozent (Mittelwert \pm Standardabweichung), Stunden und Tagen angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion;

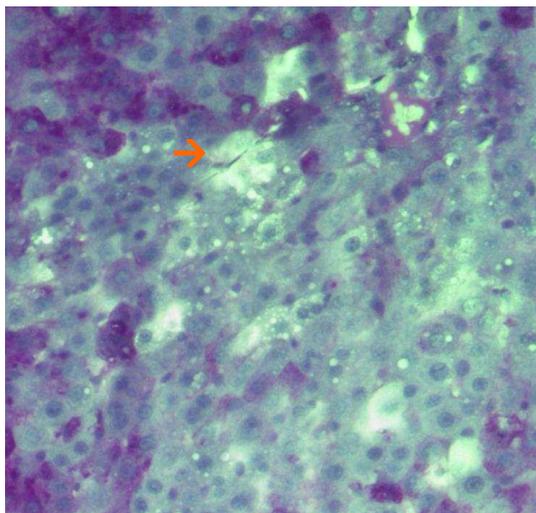


Abb. 12: PAS-Färbung eines Leberschnittes.
Kontrollgruppe 48 h nach Reperfusion.
Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion.
Nekrose mit Pfeil markiert.
20-fache Vergrößerung;

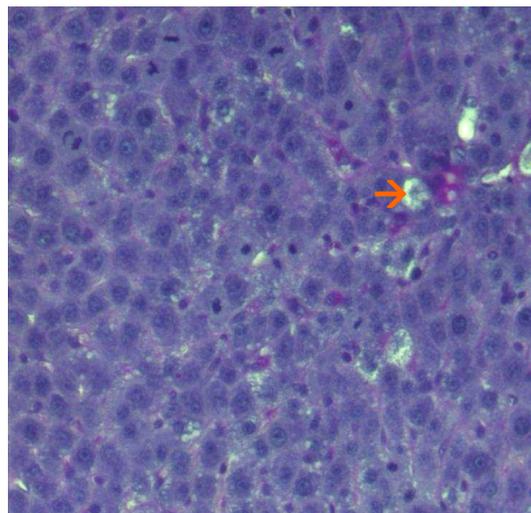


Abb. 13: PAS-Färbung eines Leberschnittes.
Behandlungsgruppe 48 h nach Reperfusion.
Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion.
Nekrose mit Pfeil markiert.
20-fache Vergrößerung;

4.3 Apoptosebestimmung durch TUNEL-Färbung

In Ergänzung dazu zeigte sich, dass der Apoptosegrad der mittels TUNEL-Test bestimmt wurde, zu fast allen Zeitpunkten, in den Gruppen die mit rhEPO behandelt wurden im Vergleich mit den Kontrollgruppen geringer ausfiel. Der Apoptosegrad war nach zwei Stunden in der Behandlungsgruppe niedriger (Mittelwert \pm Standardabweichung): $37,5 \pm 27,5$ (Gruppe I/1, n=7) vs. $29 \pm 14,5$ (Gruppe I/2, n=7). Es fand sich nach 4,5 Stunden ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung): $26,4 \pm 18,3$ (Gruppe II/1, n=7) vs. $13,2 \pm 9$ (Gruppe II/2, n=7) (p: 0.048). Allerdings war nach 24 Stunden eine geringere Apoptoserate in der Kontrollgruppe zu sehen (Mittelwert \pm Standardabweichung): $1 \pm 0,8$ (Gruppe III/1, n=7) vs. $4,5 \pm 8,6$ (Gruppe III/2, n=7). Diese Veränderungen setzten sich aber nicht fort, da nach 48 Stunden eine signifikante niedrigere Apoptoserate in der Behandlungsgruppe anzutreffen war (Mittelwert \pm Standardabweichung): $37,5 \pm 4$ (Gruppe IV/1, n=7) vs. $29,5 \pm 3,8$ (Gruppe IV/2, n=7) (p: 0,009) (Abb. 14, 15, 16).

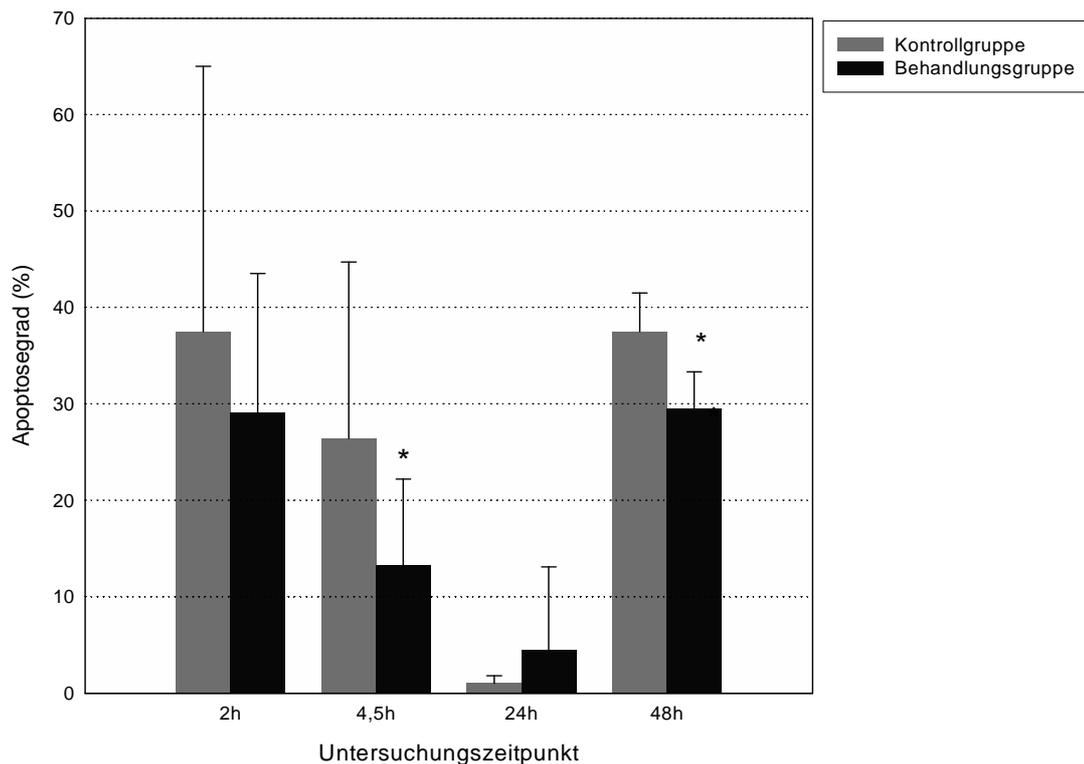


Abbildung 14: Vergleich der Apoptoserate zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind in Prozent (Mittelwert \pm Standardabweichung) und Stunden angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. (* $p < 0,05$);

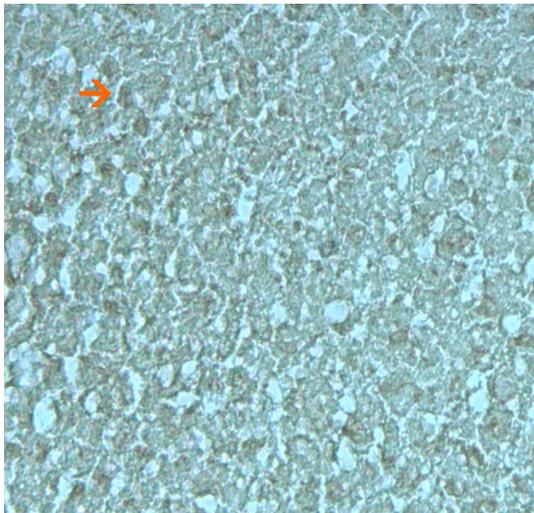


Abb. 15: TUNEL-Färbung eines Leberschnittes. Kontrollgruppe 4,5 h nach Reperfusion. Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. TUNEL positiv mit Pfeil markiert. 20-fache Vergrößerung;

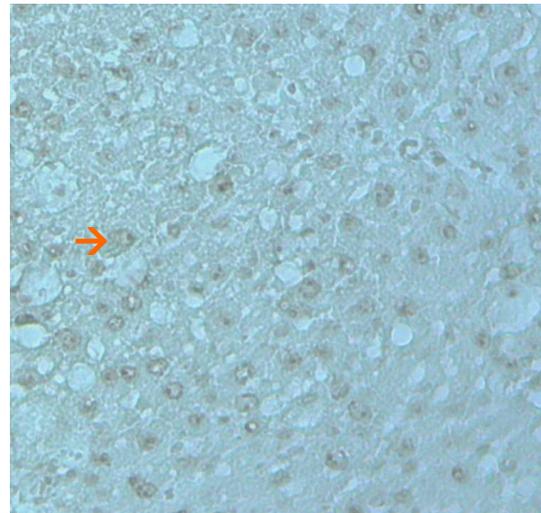


Abb. 16: TUNEL-Färbung eines Leberschnittes. Behandlungsgruppe 4,5 h nach Reperfusion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. TUNEL positiv mit Pfeil markiert. 20-fache Vergrößerung;

4.4 Hypoxiebestimmung durch immunhistochemische Färbung (Hypoxyprobe™)

Außerdem ließ sich in der Behandlungsgruppe nach 4,5 Stunden ein signifikanter geringerer Nachweis von hypoxischen Zellen erbringen, so dass von einer geringeren Ischämie auszugehen ist (Mittelwert± Standardabweichung): $27,4 \pm 7,41$ (Gruppe II/1, n=7) vs. $13,64 \pm 2,77$ (Gruppe II/2, n=7) ($p: 0,014$) (Abb. 17, 18, 19).

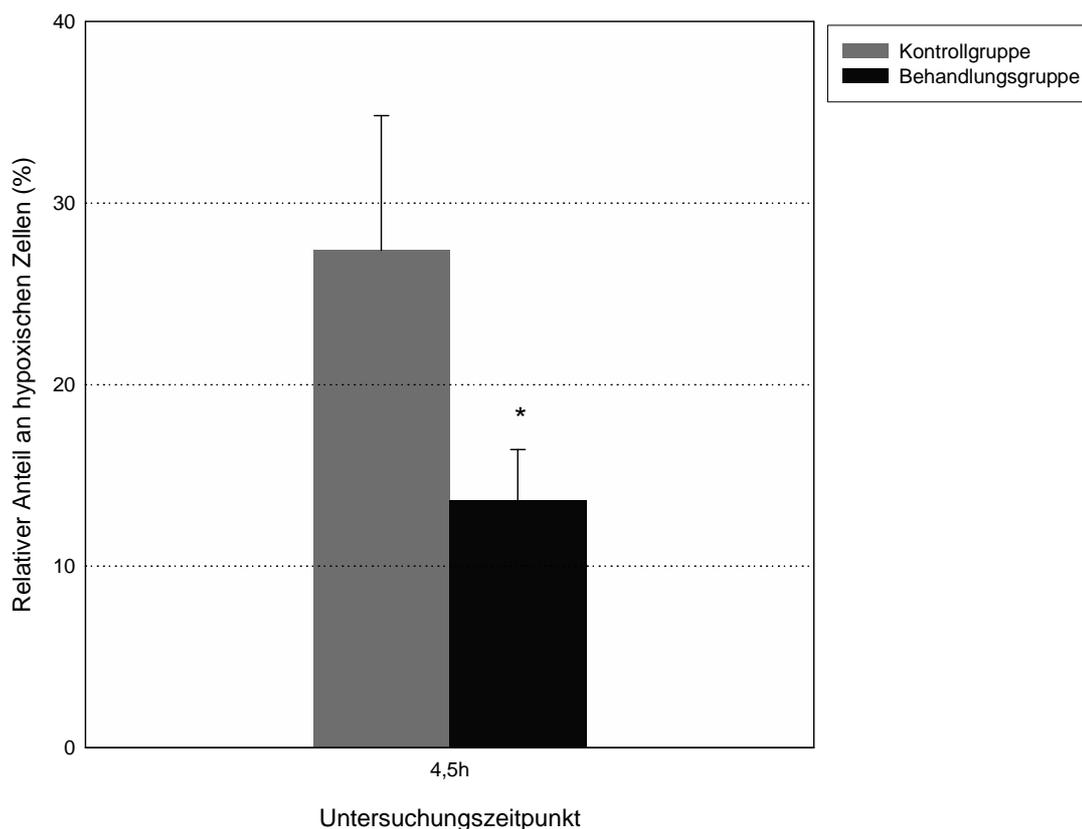


Abbildung 17: Vergleich der prozentualen Hypoxie-Färbung mittels Hypoxyprobe™ zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind in Prozent (Mittelwert± Standardabweichung) und Stunden angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. (* $p < 0,05$);

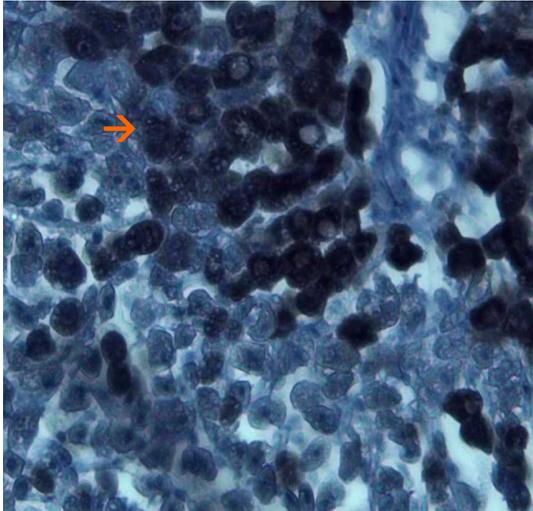


Abb. 18: Hypoxyprobe™-Färbung.
Kontrollgruppe nach 4,5 h.
Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion.
Hypoxie positiv mit Pfeil markiert.
40-fache Vergrößerung;

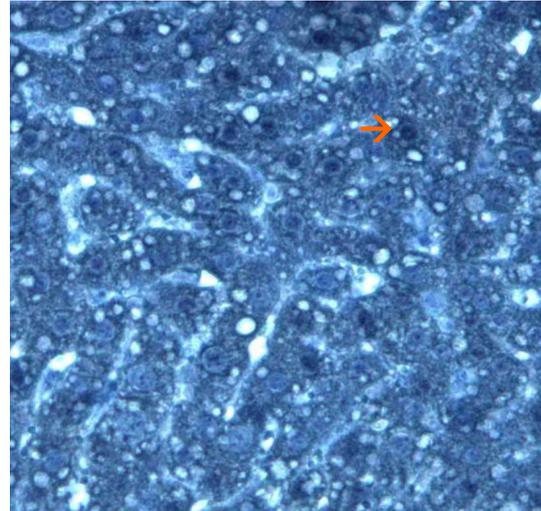


Abb. 19: Hypoxyprobe™-Färbung.
Behandlungsgruppe nach 4,5 h.
Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion.
Hypoxie positiv mit Pfeil markiert.
40-fache Vergrößerung;

4.4 Bestimmung der TNF- α Expression durch immunhistochemische Färbung

In der Abbildung 20 ist eine verringerte TNF- α Expression nach 2 Stunden in der Behandlungsgruppe zu erkennen (Mittelwert \pm Standardabweichung): $1 \pm 0,61$ (Gruppe III/1, n=7) vs. $0,75 \pm 0,76$ (Gruppe III/2, n=7). Dieser Unterschied war nach 48 Stunden signifikant (Mittelwert \pm Standardabweichung): $0,86 \pm 0,63$ (Gruppe IV/1, n=7) vs. $0,14 \pm 0,24$ (Gruppe IV/2, n=7) (p: 0,015) (Abb. 20, 21, 22).

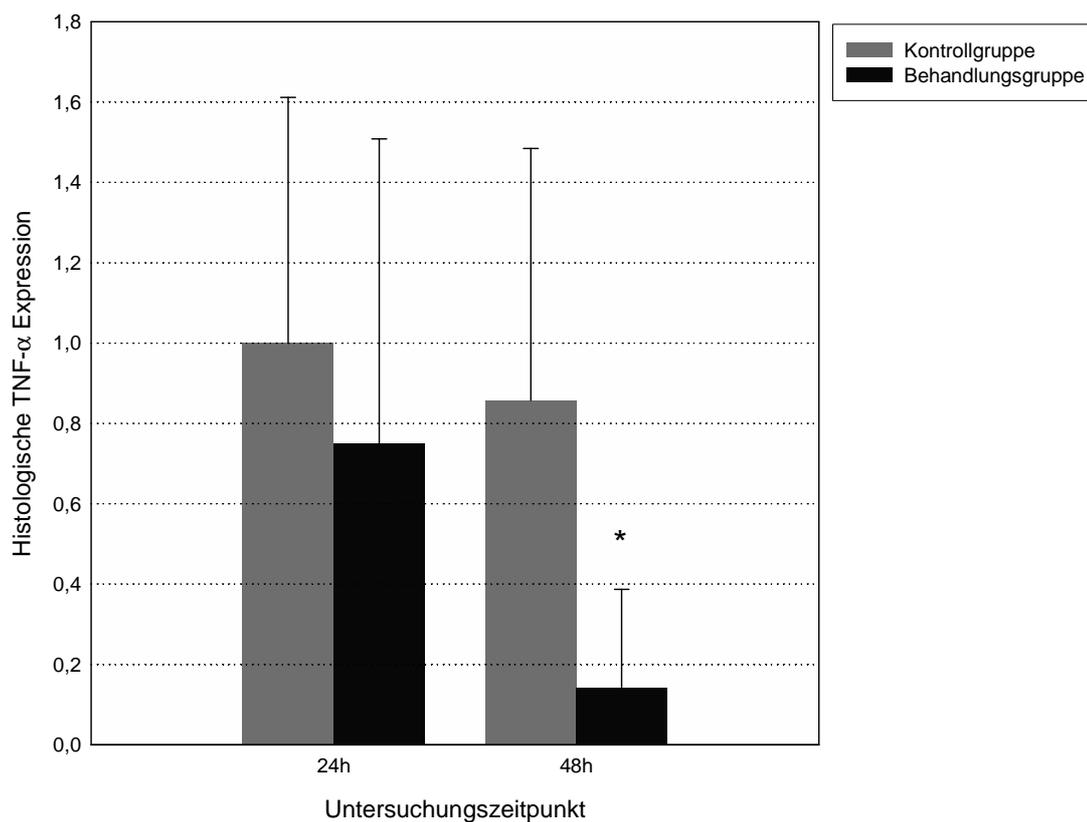


Abbildung 20: Vergleich der histologischen TNF- α Expression zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind in Prozent (Mittelwert \pm Standardabweichung) und Stunden angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. (* $p < 0,05$);

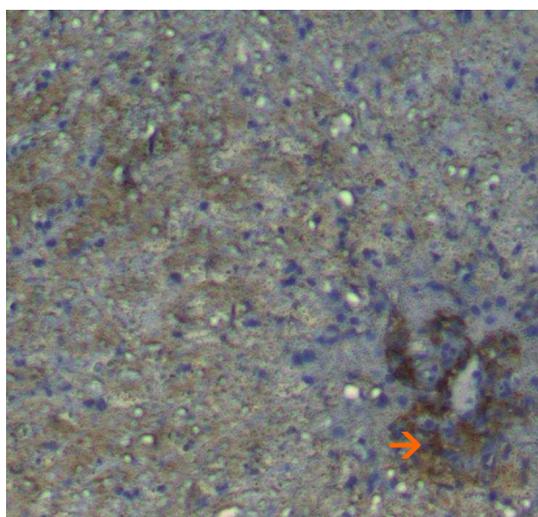


Abb. 21: TNF- α Färbung eines Leberschnittes. Kontrollgruppe 48 h nach Reperfusion. Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. TNF- α Anfärbung mit Pfeil markiert. 20-fache Vergrößerung;

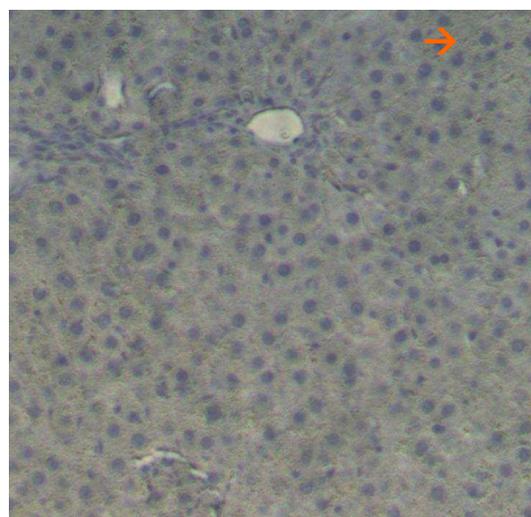


Abb. 22: TNF- α Färbung eines Leberschnittes. Behandlungsgruppe 48 h nach Reperfusion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. TNF- α Anfärbung mit Pfeil markiert. 20-fache Vergrößerung;

4.5 Bestimmung der IL-1 β mRNA-Expression durch PCR

Die mRNA-Expression war nach 2 Stunden in der Behandlungsgruppe ausgeprägter (Mittelwert \pm Standardabweichung): 516 \pm 131 (Gruppe I/1, n=7) vs. 1559 \pm 2867 (Gruppe I/2, n=7). Diese vermehrte IL-1 β mRNA-Expression in der Behandlungsgruppe setzte sich fort (Mittelwert \pm Standardabweichung): 261 \pm 182 (Gruppe II/1, n=7) vs. 681 \pm 749 (Gruppe II/2, n=7), 250 \pm 205 (Gruppe III/1, n=7) vs. 449 \pm 661 (Gruppe III/2, n=7) und 552 \pm 501 (Gruppe IV/1, n=7) vs. 832 \pm 1305 (Gruppe IV/2, n=7). Nach 7 Tagen fand sich eine deutlich höhere IL-1 β mRNA-Expression in der Kontrollgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung): 7946 \pm 7007 (Gruppe V/1, n=5) vs. 1712 \pm 1142 (Gruppe V/2, n=5) (Abb. 23). Die ermittelten Werte wiesen keine Signifikanz auf.

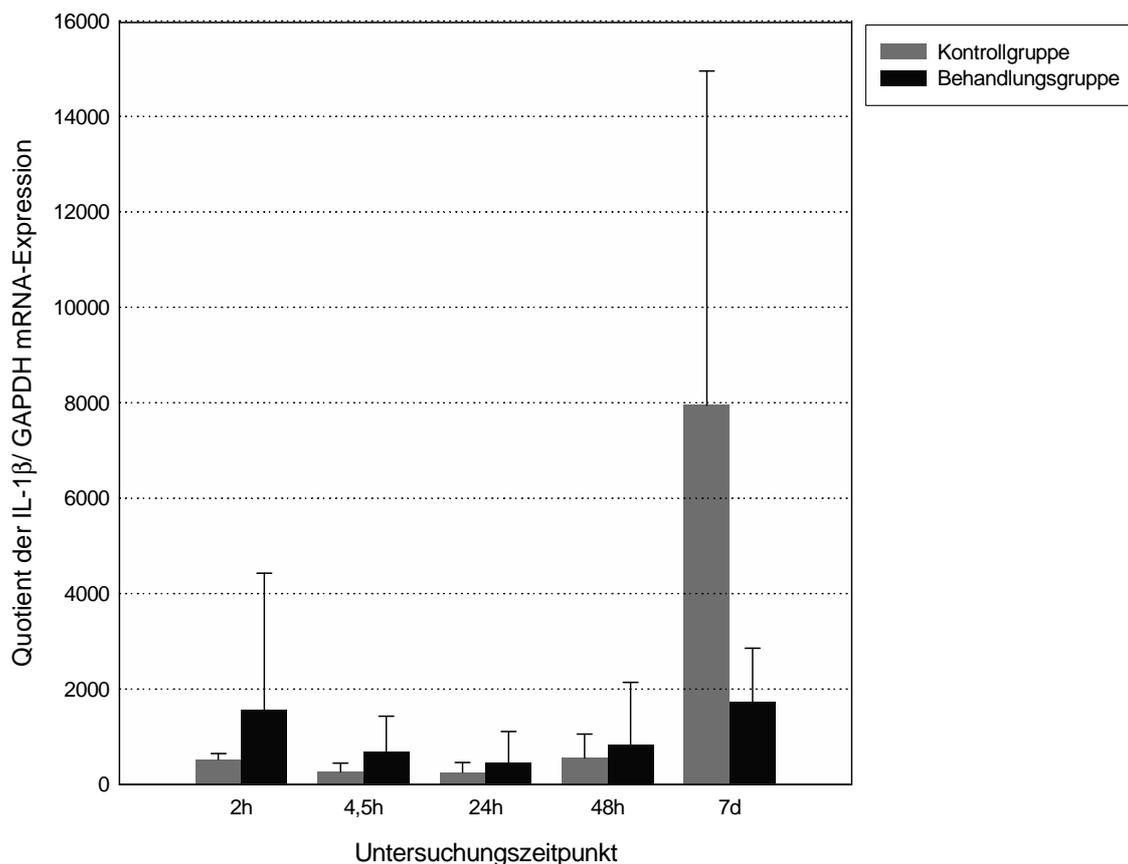


Abbildung 23: Vergleich der IL-1 β mRNA-Expression zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert \pm Standardabweichung), Stunden und Tagen angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion;

4.6 Bestimmung der IL-6 mRNA-Expression durch PCR

Die mittels PCR ermittelte IL-6 mRNA-Expression war zu allen Zeitpunkten erhöht (Mittelwert \pm Standardabweichung): 124,5 \pm 63,3 (Gruppe I/1, n=7) vs. 152,9 \pm 216,5 (Gruppe I/2, n=7). Diese vermehrte IL-6 mRNA-Expression in der Behandlungsgruppe setzte sich fort (Mittelwert \pm Standardabweichung): 48,7 \pm 57,9 (Gruppe II/1, n=7) vs. 118,4 \pm 199,2 (Gruppe II/2, n=7) und 4,7 \pm 2,7 (Gruppe III/1, n=7) vs. 23,4 \pm 34,1 (Gruppe III/2, n=7) (Abb. 24). Die ermittelten Werte wiesen keine Signifikanz auf.

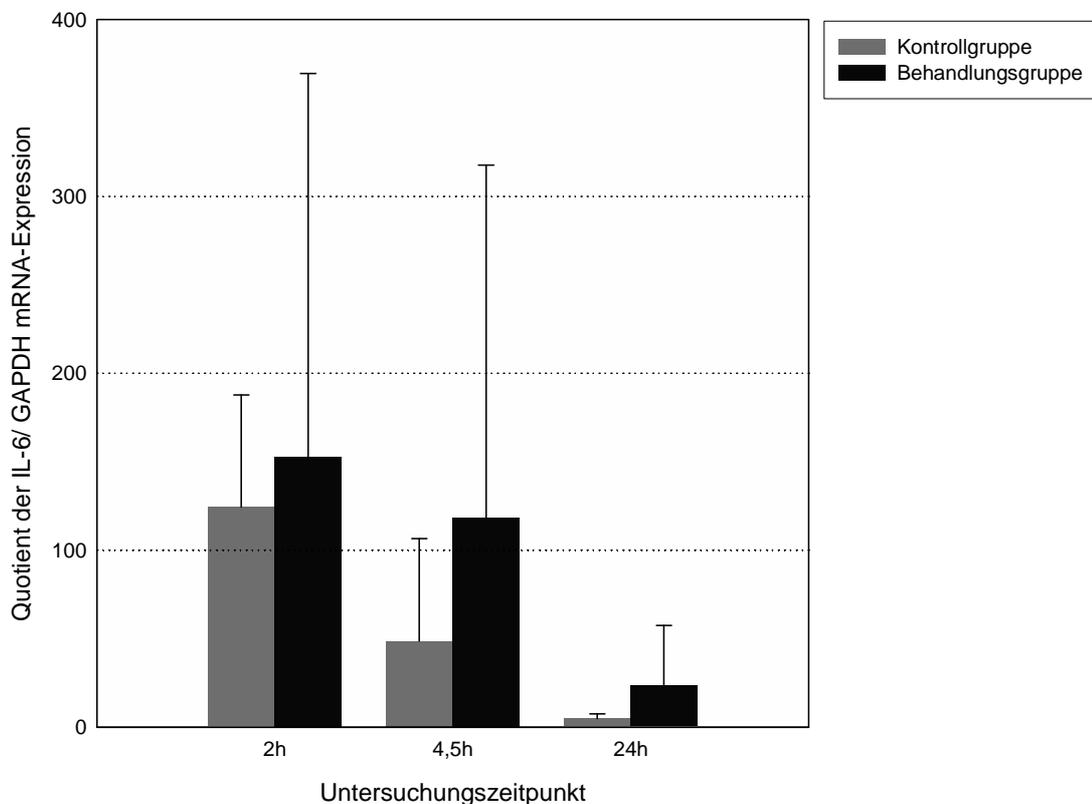


Abbildung 24: Vergleich der IL-6 mRNA-Expression zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert \pm Standardabweichung) und in Stunden angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion;

4.7 Bestimmung der VEGF mRNA-Expression durch PCR

Wie in der Abbildung 26 zu erkennen ist, zeigte sich dass die VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) mRNA-Expression in den ersten 24 Stunden innerhalb der Behandlungsgruppen ausgeprägter war, zudem war das Ergebnis nach 4,5 Stunden signifikant (Mittelwert \pm Standardabweichung): $52,8\pm 31,3$ (Gruppe I/1, n=7) vs. $74,5\pm 85$ (Gruppe I/2, n=7), $17,6\pm 13,8$ (Gruppe II/1, n=7) vs. $65,3\pm 62,5$ (Gruppe II/2, n=7) (p: 0,009) und $19,8\pm 15,7$ (Gruppe III/1, n=7) vs. 46 ± 82 (Gruppe III/2, n=7). Nach 48 Stunden und 7 Tagen fand sich eine erhöhte VEGF mRNA-Expression in der Kontrollgruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung): $47,9\pm 39,1$ (Gruppe IV/1, n=7) vs. $31,6\pm 17,5$ (Gruppe IV/2, n=7) und $42,1\pm 29,7$ (Gruppe V/1, n=5) vs. $11,1\pm 12,9$ (Gruppe V/2, n=5) (Abb. 26).

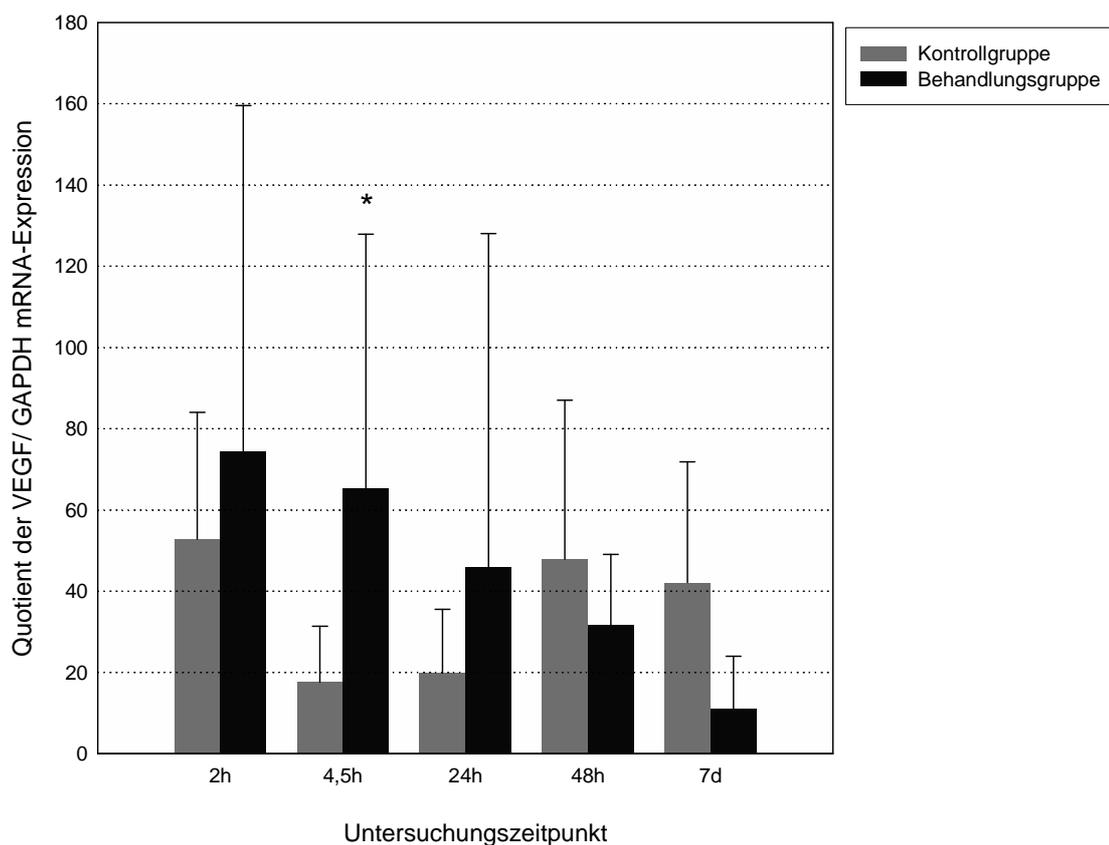


Abbildung 26: Vergleich der VEGF mRNA-Expression zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert \pm Standardabweichung), Stunden und Tagen angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. (* p < 0,05);

4.8 Bestimmung der HIF-1 α mRNA-Expression durch PCR

Die mittels PCR detektierte HIF-1 α mRNA-Expression war zu allen bestimmten Zeitpunkten in der Behandlungsgruppe höher anzutreffen (Mittelwert \pm Standardabweichung): 8,3 \pm 3,4 (Gruppe I/1, n=7) vs. 17,3 \pm 9,6 (Gruppe I/2, n=7), 7,4 \pm 6,5 (Gruppe II/1, n=7) vs. 15,7 \pm 13,2 (Gruppe II/2, n=7), 118,9 \pm 130,4 (Gruppe III/1, n=7) vs. 220,2 \pm 256,3 (Gruppe III/2, n=7) und 191,3 \pm 141,5 (Gruppe IV/1, n=7) vs. 220,9 \pm 221 (Gruppe IV/2, n=7) (Abb. 27). Die ermittelten Werte wiesen keine Signifikanz auf.

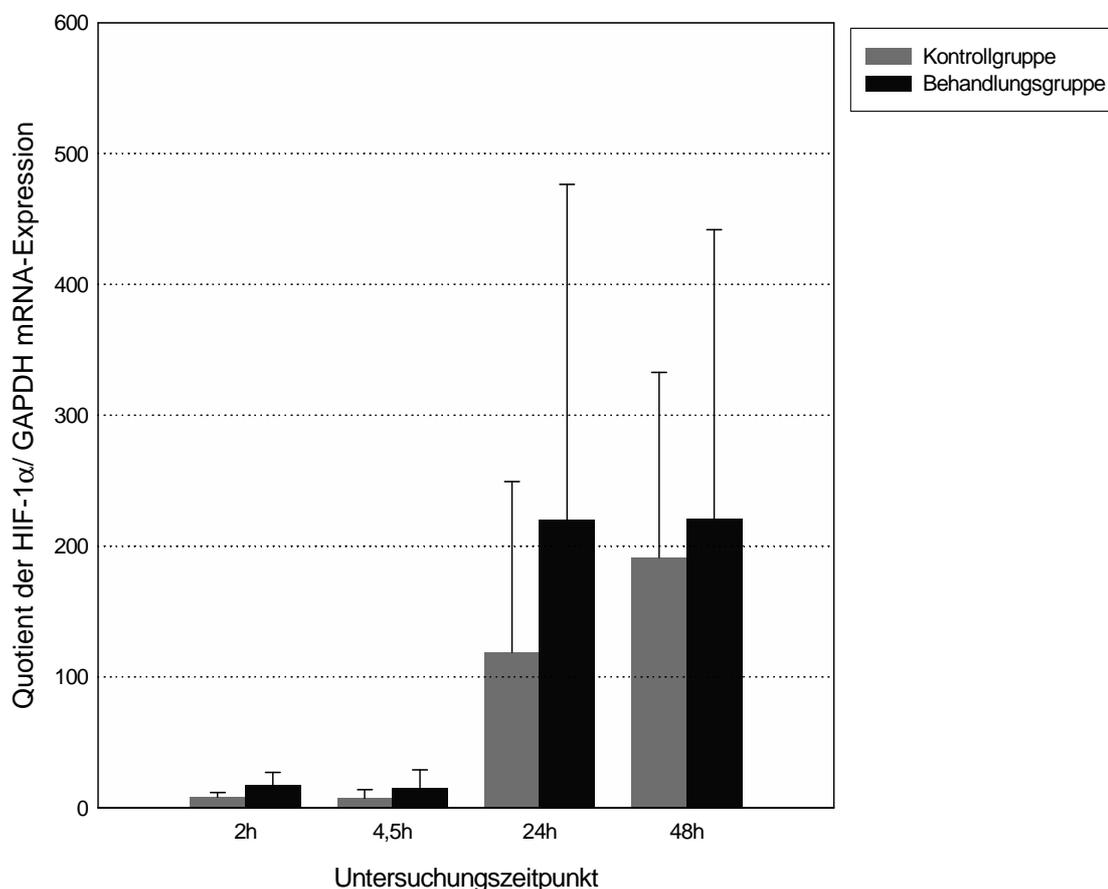


Abbildung 27: Vergleich der HIF-1 α mRNA-Expression zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert \pm Standardabweichung) und in Stunden angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion;

4.9 Bestimmung der HGF mRNA-Expression durch PCR

Die Hepatozyten-Wachstumsfaktor („Hepatocyte Growth Factor“, HGF) mRNA-Expression war in den ersten 24 Stunden in der Behandlungsgruppe erhöht (Mittelwert± Standardabweichung): 482 ± 329 (Gruppe I/1, n=7) vs. 504 ± 727 (Gruppe I/2, n=7), 80 ± 70 (Gruppe II/1, n=7) vs. $176 \pm 232,4$ (Gruppe II/2, n=7) und 126 ± 81 (Gruppe III/1, n=7) vs. 260 ± 443 (Gruppe III/2, n=7). Nach 48 Stunden und 7 Tagen war eine leichte Erhöhung der HGF mRNA-Expression in der Kontrollgruppe zu sehen (Mittelwert± Standardabweichung): 130 ± 95 (Gruppe IV/1, n=7) vs. 127 ± 89 (Gruppe IV/2, n=7) und 432 ± 162 (Gruppe V/1, n=5) vs. 409 ± 202 (Gruppe V/2, n=5) (Abb. 28). Die ermittelten Werte wiesen keine Signifikanz auf.

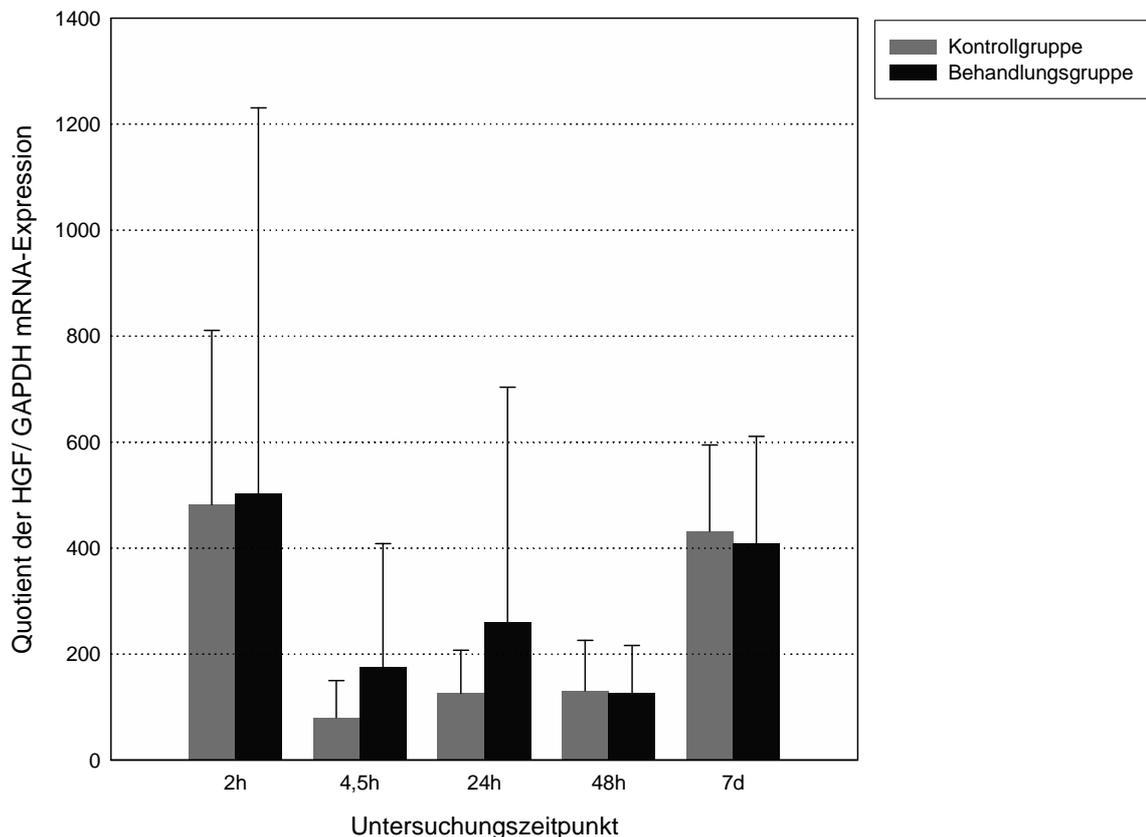


Abbildung 28: Vergleich der HGF mRNA-Expression zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert± Standardabweichung), in Stunden und Tagen angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion;

4.10 Bestimmung der ALT-Aktivität im Plasma

Die ALT-Werte waren nach 4,5 Stunden in der Behandlungsgruppe erhöht (Mittelwert± Standardabweichung): 1037 ± 1084 (Gruppe II/1, n=7) vs. 1570 ± 1410 (Gruppe II/2, n=7). Nach 24 Stunden waren alle ALT-Werte in Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe, der nach 48 Stunden gemessene Wert war signifikant (Mittelwert± Standardabweichung): 1180 ± 896 (Gruppe III/1, n=7) vs. 705 ± 494 (Gruppe III/2, n=7), 459 ± 363 (Gruppe IV/1, n=7) vs. 161 ± 120 (Gruppe IV/2, n=7) ($p: 0,025$) und 84 ± 51 (Gruppe V/1, n=5) vs. 66 ± 56 (Gruppe V/2, n=5) (Abb. 29).

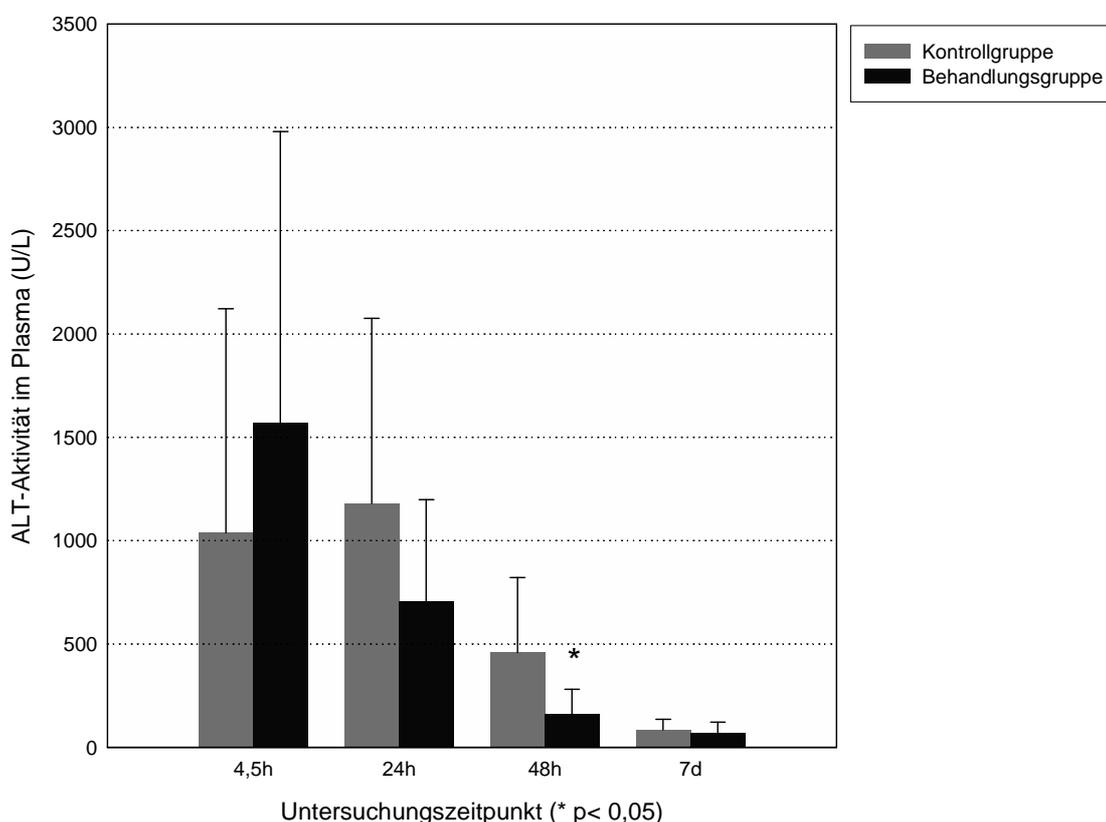


Abbildung 29: Vergleich der ALT-Aktivität im Plasma zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert± Standardabweichung), in Stunden und Tagen angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. (* $p < 0,05$);

4.11 Bestimmung der AST-Aktivität im Plasma

Die AST-Werte waren nach 4,5 und 24 Stunden in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Mittelwert± Standardabweichung): 1529± 1105 (Gruppe II/1, n=7) vs. 2470± 2177 (Gruppe II/2, n=7, n=7) und 1276± 817 (Gruppe III/1, n=7) vs. 2266± 3329 (Gruppe III/2, n=7). Nach 48 Stunden waren alle AST-Werte in Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe, wobei die Ergebnisse nach 48 Stunden signifikant waren (Mittelwert± Standardabweichung): 443± 197 (Gruppe IV/1, n=7) vs. 254± 195 (Gruppe IV/2, n=7) ($p = 0,048$) und 171± 85 (Gruppe V/1, n=5) vs. 156± 127 (Gruppe V/2, n=5) (Abb. 30).

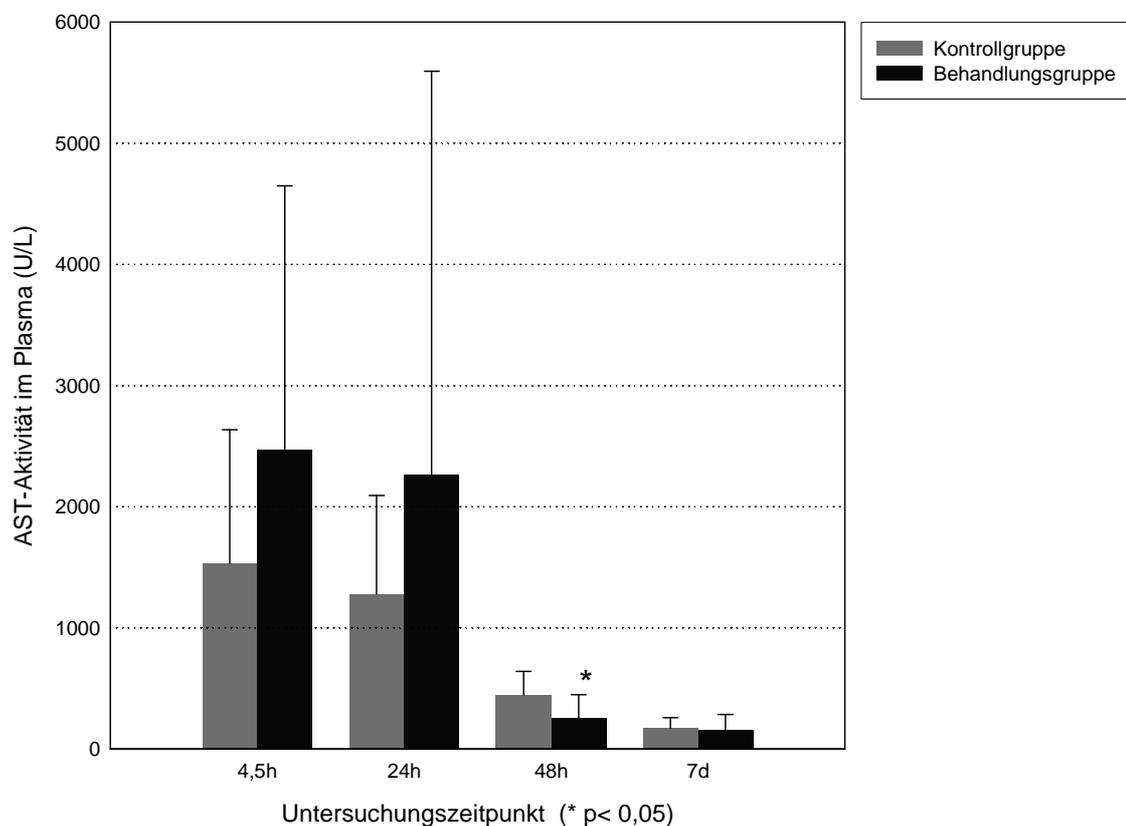


Abbildung 30: Vergleich der AST-Aktivität im Plasma zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert± Standardabweichung), in Stunden und Tagen angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. (* $p < 0,05$);

4.12 Bestimmung der LDH-Aktivität im Plasma

Die LDH-Werte waren zu allen Zeitpunkten in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Mittelwert± Standardabweichung): 6242± 7531 (Gruppe II/1, n=7) vs. 14642± 18255 (Gruppe II/2, n=7), 545± 319 (Gruppe III/1, n=7) vs. 3991± 7848 (Gruppe III/2, n=7), 228± 100 (Gruppe IV/1, n=7) vs. 379± 133 (Gruppe IV/2, n=7)(p: 0,047) und 244± 61 (Gruppe V/1, n=5) vs. 394± 155 (Gruppe V/2, n=5) (p: 0,047) (Abb. 31).

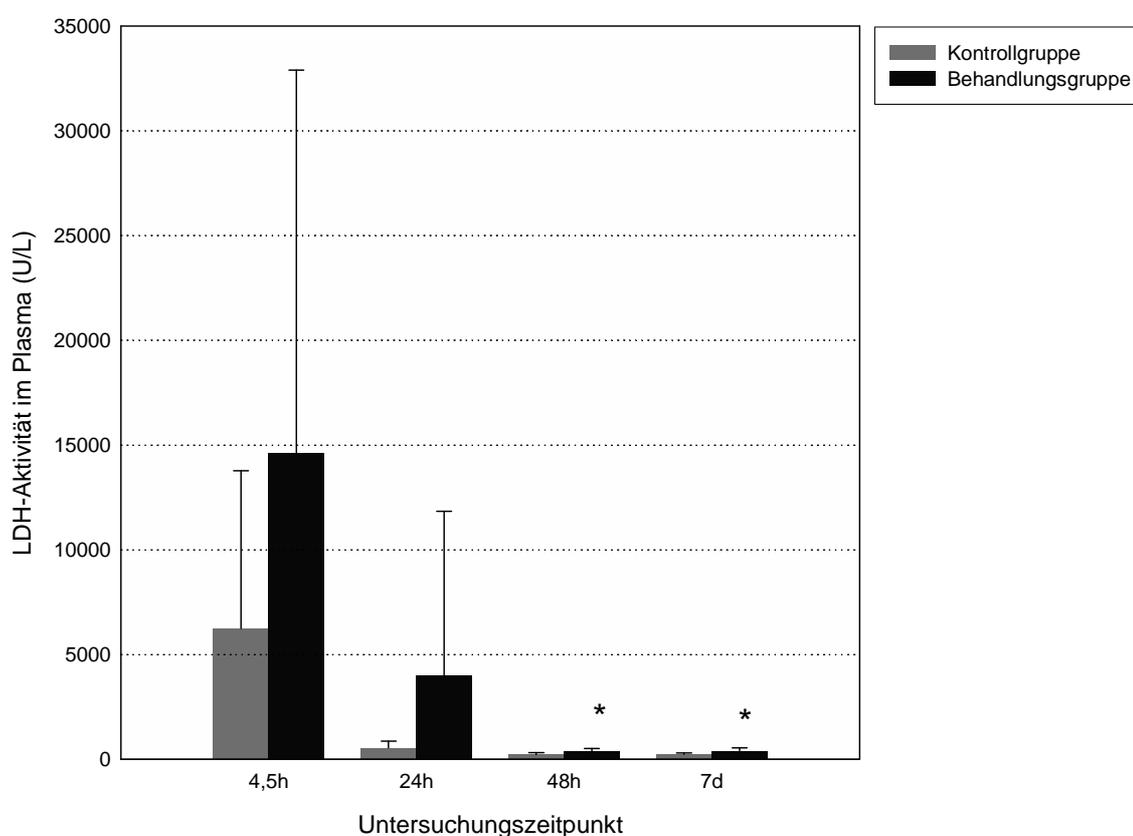


Abbildung 31: Vergleich der LDH-Aktivität im Plasma zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert± Standardabweichung), in Stunden und Tagen angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion. (* p< 0,05);

4.13 Bestimmung der GLDH-Aktivität im Plasma

Die GLDH-Werte waren nach 4,5 und 48 Stunden in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Mittelwert± Standardabweichung): 559 ± 255 (Gruppe II/1, n=7) vs. 758 ± 695 (Gruppe II/2, n=7), 1458 ± 665 (Gruppe III/1, n=7) vs. 2815 ± 2468 (Gruppe III/2, n=7). So ließen sich dagegen nach 48 Stunden und 7 Tagen niedrigere GLDH-Werte in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe detektieren (Mittelwert± Standardabweichung): 886 ± 366 (Gruppe IV/1, n=7) vs. 610 ± 545 (Gruppe IV/2, n=7) und 72 ± 56 (Gruppe V/1, n=5) vs. $70 \pm 72,3$ (Gruppe V/2, n=5) (Abb. 32). Die ermittelten Werte wiesen keine Signifikanz auf.

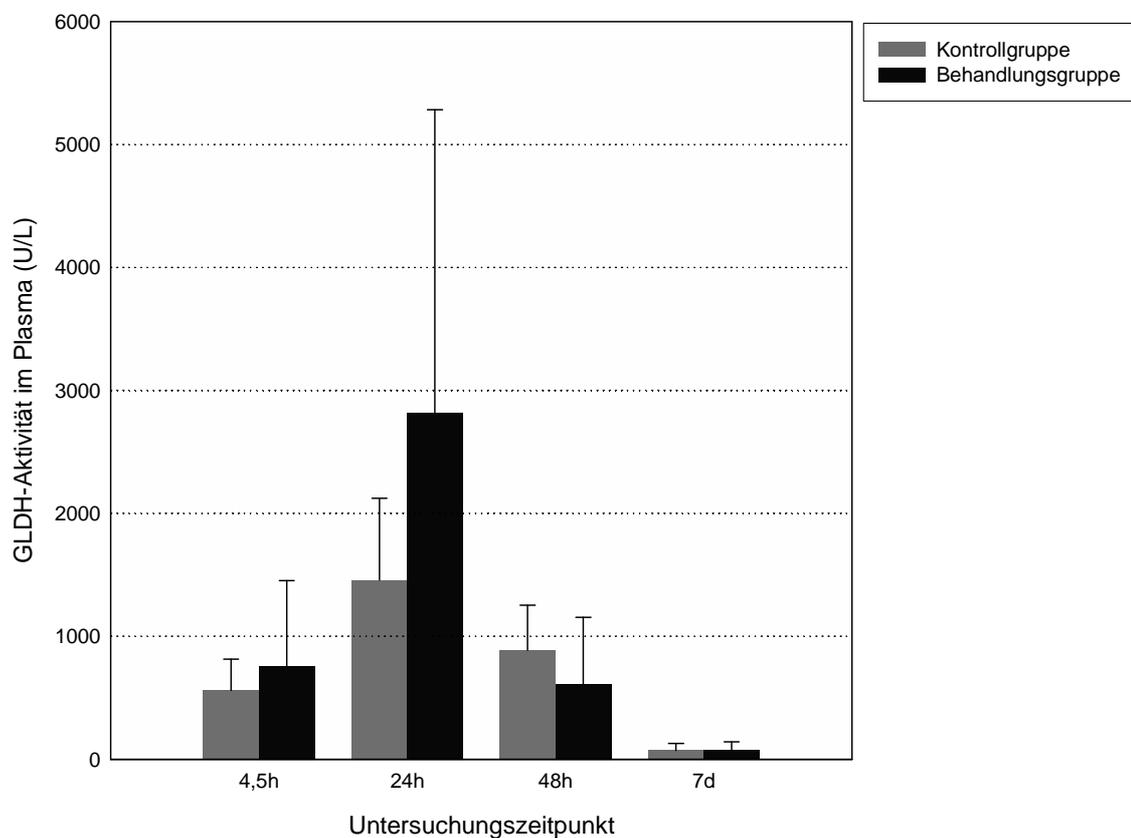


Abbildung 32: Vergleich der GLDH-Aktivität im Plasma zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe; Daten sind als Quotient (Mittelwert± Standardabweichung), in Stunden und Tagen angegeben; Kontrollgruppe mit NaCl-Injektion. Behandlungsgruppe mit rhEPO-Injektion;

5 Diskussion

Die orthotope Lebertransplantation ist und bleibt vorerst die einzige kausale Therapie verschiedener leberspezifischer Erkrankungen.

Wie bereits erwähnt, gibt es aufgrund des medizinischen Fortschrittes und einer damit verbundenen vermehrten Indikationsstellung zur Lebertransplantation, einen fortlaufend steigenden Organbedarf. Das Angebot von Organen nimmt hingegen nicht zu, so dass längere Wartezeiten für die zur Lebertransplantation gelisteten Patienten entstehen. Somit sind für diese Patienten in Zukunft, steigende Mortalitäts- und Morbiditätsraten zu erwarten (3, 29). Ein potentieller Weg zur Angebotssteigerung von Organen liegt in der Transplantation von „marginalen“ Organen. Hierbei gibt es unterschiedliche Lösungsansätze, diese Organe „transplantierbar“ zu machen und das Risiko für die Empfänger zu mindern. Diese Arbeit hat sich dem Problem der Fettleber als „Marginalorgan“ angenommen. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss der Applikation von rhEPO im Rahmen einer orthotopen Lebertransplantation am Tiermodell untersucht.

Es gibt verschiedene Tiermodelle die eine Verfettung der Leber induzieren können (98), unter anderem die in dieser Arbeit angewendete Methionin-Cholin-Defizit-Diät (MCDD). Diese Methode wird häufig zur Genese einer Fettleber im Rattenmodell genutzt. Die MCDD führt in Form einer deutlichen Zunahme des Triglyzerid-Anteils in der Leber zu einer massiven Verfettung des Organs. Die entstehende Steatohepatitis erklärt sich zum einen über den hohen Fettanteil und zum anderen durch den Mangel von Methionin und Cholin. Der Methionin-Mangel verringert die Glutathion Synthese und führt dadurch zu einer schwächeren Expressierung von Antioxidantien, die zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dienen. Der Cholin-Mangel führt durch eine konsekutiv abnehmende Phosphatidylcholin-Synthese, zu einer geringeren Ausschleusung von Fettsäuren aus der Leber (99).

Die MCDD wird im Rattenmodell als Referenzmethode zur Generierung einer inflammatorischen Fettleber betrachtet. Diese nutritiv erzeugte Fettleber entspricht am ehesten einer nicht-alkoholischen Steatohepatitis („non-alcoholic steatohepatitis“, NASH), wie sie beim Menschen zu finden ist und kommt daher häufig im Tiermodell zur Anwendung (100, 101). Allerdings fehlen in diesem Tiermodell, im Vergleich mit einem an einer NASH leidenden Menschen, wichtige weitere pathologische

Kennzeichen, wie beispielsweise eine abdominelle Fettleibigkeit und eine erhöhte Kalorienaufnahme (93).

Eine NASH ist als Stadium einer nicht alkoholischen Fettleberkrankheit („non-alcoholic fatty liver disease“, NAFLD) zu betrachten und zeichnet sich durch eine Verfettung, sowie eine Entzündung aus. Sie ist als Progress einer Fettleber zu verstehen (102). Die einfache Fettleber (Steatosis hepatis) ist meist mit einem guten Verlauf behaftet. Hingegen kann die NASH möglicherweise mit einer Fibrose einhergehen und im Verlauf zu einer Zirrhose führen. Im ungünstigsten Fall kann die Genese eines hepatozellulären Karzinoms begünstigt werden (103).

Die NAFLD zeichnet sich unter anderem durch eine vermehrte Fetteinlagerung in den Hepatozyten aus. Zur Diagnosestellung einer NAFLD muss zuerst der Ausschluss einer viralen, autoimmunen oder metabolischen Lebererkrankung erfolgt sein. Hierbei ist insbesondere die Abgrenzung von der alkoholischen Steatohepatitis („alcoholic steatohepatitis“, ASH) wichtig. Die Unterscheidung der NAFLD von der alkoholinduzierten Fettlebererkrankung („alcoholic fatty liver disease“, AFLD) ist einzig und allein von der Menge des Alkoholkonsums des Patienten abhängig. Die Verifizierung des Alkoholkonsums erfolgt primär über die Anamnese, so wird häufig ein täglicher Alkoholkonsum von 40g bei Männern und 20g bei Frauen als Diagnosekriterium herangezogen (104).

Der Goldstandard der diagnostischen Sicherung einer NAFLD ist die Leberbiopsie. In der Folge lässt sich die NAFLD histologisch in vier verschiedene Typen klassifizieren: Typ1 entspricht einer einfachen Fettleber, Typ2 beinhaltet zusätzliche lobuläre Entzündungen, Typ3 weist eine zusätzliche Ballonierung der Hepatozyten auf und Typ4 zeigt sich mit einem zusätzlichen Nachweis von Mallory-Körpern und einer Fibrose (105). In nachfolgenden Studien zeigte sich, dass die NAFLD Typen 3 und 4 zu einem großen Teil korrelieren und nicht getrennt betrachtet werden können. Daher wurden diese Gruppen zusammengefasst und gemeinsam als NASH definiert (106).

Patienten mit einer NAFLD haben in bis zu 85 Prozent der Fälle einen BMI über 25kg/m² und circa 30 Prozent leiden an einem metabolischen Syndrom. Somit gelten Übergewicht, Glukoseintoleranz, Hyperlipidämie und arterieller Hypertonus als Risikofaktoren für die Entwicklung einer NAFLD (107).

Der Pathomechanismus der NAFLD und NASH ist nach wie vor nicht ausreichend geklärt, allerdings gilt die „Zwei-Schritt-Hypothese“ als eine weit verbreitete und akzeptierte Theorie(108).

Dabei wird die Entstehung der Steatosis hepatis als der „Erste Schritt“ gesehen. Im Vordergrund steht hierbei die vorhandene Zunahme von Fettgewebe mit einer Insulinresistenz. Vor allem bei viszeraler Fettleibigkeit werden vermehrt freie Fettsäuren freigesetzt. Das viszerale Fettgewebe zeichnet sich durch die vermehrte Produktion von insulinresistenzbildenden Proteinen wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Resistin und Kortisol aus. Die bei einer Insulinresistenz bestehende gesteigerte Lipolyse wird durch TNF- α weiter verstärkt. Hierdurch werden intrazelluläre Signalwege gehemmt, wodurch noch mehr freien Fettsäuren im Pfortaderblut vorhanden sind und schließlich nach einer intrahepatischen Veresterung zu einer gesteigerten Lipideinlagerung führen. Als Folge der vorhandenen Insulinresistenz und der Hyperinsulinämie wird die intrahepatische β -Oxidation verringert und folglich werden vermehrt Triglyzeride synthetisiert, die dann in den Hepatozyten gespeichert werden. Die intrahepatische Fettspeicherung verstärkt dann die weitere Produktion der proinflammatorischen Zytokine, in deren Folge die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), Apoptose und Nekrose begünstigt ist (109).

Durch den „Ersten Schritt“ der Entstehung der Steatosis hepatis, ist die Leber für die nachfolgenden Pathomechanismen sensibilisiert. Der primäre Pathomechanismus des „Zweiten Schrittes“ ist die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies, die zu einem oxidativen Stress und einer Gewebeschädigung führen. Dem liegen Veränderungen der Mitochondrien zu Grunde, die durch ihre funktionelle Beteiligung an der erhöhten β -Oxidation von Fettsäuren und der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen bedingt sind. Durch Oxidation ungesättigter Fettsäuren und Lipidperoxidation werden Schäden an der mitochondrialen DNA induziert. Durch die vermehrte Expression von TNF- α wird die mitochondriale Atmungskette negativ beeinflusst, wodurch eine geringere ATP-Synthese auftritt. Der Mangel an ATP in einer Fettleber gilt als mögliche Ursache der verminderten Toleranz gegenüber einer Ischämie und einer verminderten Regeneration nach einer chirurgischen Resektion (110). Die reaktiven Sauerstoffspezies induzieren dazu vermehrt die Expression der Zytokine TNF- α , Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8). Das Zytokin TNF- α bewirkt eine zusätzliche mitochondriale Schädigung, IL-8 rekrutiert Entzündungsstellen und sorgt so für einen proinflammatorischen Zustand. Das IL-6 ist in seiner Funktion umstritten, so wird ihm unter anderem eine Verstärkung der Insulinresistenz nachgesagt (111, 112). Zusätzlich entstehen durch Lipidperoxidation

Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxynonenal (HNE) und verstärken mittels Chemotaxis von neutrophilen Zellen die Nekroinflammation. Zudem wird die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen durch die vermehrte Zytokin-Expression des transformierenden Wachstumsfaktors („Transforming Growth Factor“, TGF- β) ausgelöst. Daraufhin induzieren die hepatischen Sternzellen eine Leberfibrose. Schließlich führen die Induktion des Fas-Liganden und die zytotoxischen Effekte der Lipidoxidation zu Zelluntergängen in der Leber (113).

Die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Arbeit zeigen ein sehr differenziertes Bild auf. Dieser Umstand offenbart auch die bis dato in vielen Belangen unklaren auftretenden Schädigungsmechanismen in der Fettleber.

Insgesamt wurden 70 erfolgreiche Lebertransplantationen mit vornehmlich makrovesikulär verfetteten Spenderlebern am Rattenmodell durchgeführt. Das kumulative Überleben war in der mit rhEPO behandelten Gruppe signifikant verbessert (RhEPO vs. NaCl: 86,6% vs. 65%, $p=0,031$). Die verstorbenen Tiere verendeten alle innerhalb der ersten vier Stunden nach der Reperfusion des Transplantates, ohne Hinweise auf einen operativen oder technischen Fehler. Dieses positive Ergebnis stimmt mit denen bis dato veröffentlichten Publikationen überein (114, 115). So demonstrierten tierexperimentelle Studien ein signifikant verbessertes Überleben bei einer 90-prozentigen Leberteilektomie an Ratten unter entsprechender rhEPO-Applikation. Ebenso gelang derselben Arbeitsgruppe der Nachweis eines signifikanten Überlebensvorteils bei partieller Lebertransplantation am Rattenmodell unter rhEPO-Gabe (116). Eine zuvor durchgeführte tierexperimentelle Studie bezüglich eines Ischämie/Reperfusionsschadens am Rattenmodell, konnte ebenfalls einen signifikanten Überlebensvorteil unter rhEPO beweisen. Hierbei wurden die coeliakalen sowie mesenterialen Arterien zeitweise ausgeklemmt. Der ausgeprägte Schock der Visceralorgane führte bei allen Tieren ohne rhEPO-Behandlung zum Tod, hingegen überlebten signifikant mehr Tiere unter rhEPO-Applikation (117).

Die Höhe der Lebertransaminasen lieferte kein eindeutiges Ergebnis zu Gunsten der Behandlungsgruppe, so war nur nach 48 Stunden eine signifikante Reduktion in der Behandlungsgruppe zu sehen. Diese Daten stehen im Kontrast zu den bis dato veröffentlichten Publikationen, die Lebertransplantationen mit nicht verfetteten Lebern unter rhEPO-Behandlung durchführten (118). Ein Grund für die uneinheitlichen Ergebnisse könnte die Fettleber selbst sein. Es konnte nachgewiesen

werden, dass im Vergleich zu einer normal gesunden Leber, die Ischämie/Reperfusionsschäden in einer Fettleber zu einer verstärkten Leberenzym-Ausschüttung führen (119). Zudem könnte der Effekt von rhEPO durch die teilweise stark erhöhten Transaminasenniveaus mit einer beträchtlichen Standardabweichung maskiert sein.

Die immunhistologische Hypoxyprobe™-Färbung zeigte signifikant niedrigere hypoxische Zellveränderungen in den Hepatozyten der transplantierten Leber der rhEPO-Gruppe an. Dieser Umstand könnte ein Hinweis darauf sein, dass in der rhEPO-Gruppe möglicherweise in Regionen mit weniger auftretenden hypoxischen Zellen auch weniger reaktive Sauerstoffspezies entstehen (120). Die signifikant verringerte Apoptoserate nach 4,5 Stunden in der rhEPO-Gruppe spiegelt diese Reaktion wieder.

Der Nachweis von Apoptosen und Nekrosen in der transplantierten Fettleber wurde in dieser Arbeit via TUNEL-, HE- und PAS-Färbung erbracht. Diese beiden Mechanismen des Zellunterganges spielen eine große Rolle bei Ischämie/Reperfusionsschäden.

Nach zwei Stunden ließen sich vermehrt Nekrosen in der rhEPO-Gruppe nachweisen und zeitgleich stand dem eine verminderte Apoptoserate in der identischen Gruppe entgegen. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass unter rhEPO vermehrt unkontrollierte Zelluntergänge stattfinden, gleichzeitig aber das regelrechte Leberparenchym verbesserte funktionelle Eigenschaften aufweist. Das verringerte Ausmaß der Apoptosen in der rhEPO-Gruppe stimmt mit den bisherigen wissenschaftlichen Ergebnissen überein und ist als direkter Schutz vor Ischämie/Reperfusionsschäden durch rhEPO zu deuten (118). Im Kontrast hierzu steht die erhöhte Anzahl an nekrotischem Gewebe in der rhEPO-Gruppe nach 2 Stunden. Allerdings findet vermutlich durch rhEPO eine effektivere Elimination des nekrotischen Gewebes statt. So war dieses an den erhöhten Nekroseanteilen in der Kontrollgruppe nach 24 Stunden bemerkbar und wurde durch erhöhte leberspezifische GLDH-Werte untermauert. Denn diese waren nach 24 Stunden auch eindeutig zu Gunsten der Behandlungsgruppe verschoben. RhEPO schützt die Zellen nicht nur direkt vor Ischämie/Reperfusionsschäden, sondern führt vermutlich durch ein verbessertes zelluläres „Remodelling“ zu einer zügigeren und anhaltenden Leberregeneration.

Eine verbesserte Leberregeneration durch rhEPO konnte bereits nachgewiesen werden. So ließ sich dieser positive Umstand durch ausgedehnte Leberresektionen unter rhEPO-Gabe am Rattenmodell demonstrieren (121). Es konnten zudem ähnliche Feststellungen im Bereich der Regeneration von Neuronen und Kardiomyozyten angestellt werden (76, 122-124).

Die Auswertung der multiplen mRNA Bestimmungen der Zytokine bot, unter anderem aufgrund der teilweise hohen Standardabweichung, auf den ersten Blick kein eindeutiges Bild zu Gunsten der rhEPO-Therapie.

Bei genauerer Analyse der regenerations-assoziierten Zytokine HIF1- α , HGF und VEGF bestätigte sich allerdings die bereits erhobene Vermutung einer verbesserten Regeneration unter rhEPO, da diese Zytokine alle in den ersten 24 Stunden vermehrt in der RhEPO-Gruppe exprimiert wurden. Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass eine erhöhte HIF1- α Expression im Rahmen der Leberregeneration vorhanden ist. Diese ist mit einer erhöhten VEGF-Expression assoziiert (125, 126) und man geht derzeitig davon aus, dass dieses einen positiven Effekt auf die Rekonstruktion der sinusoidalen Endothelzellen der Leber während der Regeneration hat (127, 128).

Ergänzend hierzu war die mRNA-Expression des unter anderem antiinflammatorisch wirksamen IL-6 bei den mit rhEPO behandelten Tieren erhöht, wenn auch vermutlich durch die hohe Standardabweichung keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Das Zytokin IL-6 wird als ein bedeutender Faktor der Leberregeneration nach einem stattgefundenen Ischämie/Reperfusionsschaden betrachtet (129, 130). Allerdings ist die klare Zuordnung der pro- oder antiinflammatorischen Wirkung des IL-6 umstritten. Im Gegensatz zu einer ausschließlich verfetteten Leber, kann in einer NASH-Leber ein erhöhter IL-6 Spiegel nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis führte zu der Schlussfolgerung, dass IL-6 eine Rolle in der Entstehung einer NASH-Leber spielt und es wird daher in Teilen der Literatur als ein proinflammatorisches Zytokin angegeben (131).

Hingegen war die mRNA-Expression des proinflammatorischen Interleukin-1 β (IL-1 β) vermehrt in der rhEPO-Gruppe anzutreffen, jedoch ebenso ohne Signifikanz. IL-1 β wird in der NASH-Leber, ebenso wie das TNF- α , vermehrt nachgewiesen. Daher wird angenommen, dass diese Zytokine durch ihre proinflammatorische Wirkung die Entstehung einer NASH-Leber begünstigen (132).

Um das Ausmaß der Leberzellschädigung nach einer stattgehabten Ischämie mit anschließender Reperfusion des Organs einzuschätzen, wird häufig die Höhe der TNF- α Expression herangezogen (133-135). Diese Arbeit konnte zeigen, dass die TNF- α mRNA-Expression in der rhEPO-Gruppe signifikant reduziert war. So erscheint allerdings eine isolierte Betrachtungsweise der beteiligten Zytokine wenig sinnvoll, da erhöhte Expressionen von IL-1 und TNF- α zu einer vermehrten HIF-1 Expression führen (136). Diese auftretenden widersprüchlichen Zytokin-Aktivitäten könnten ihre Erklärung in der abnormalen Stoffwechselaktivität der Fettleber haben (113).

Unter Berücksichtigung aller erfassten Daten zeigt diese Arbeit, dass die Gabe von rhEPO an Spendertier und Empfängertier zu einer Senkung von Ischämie/Reperfusionsschäden in dem Fettlebertransplantat führt. Zudem wurde der Nachweis eines signifikanten Überlebensvorteils erbracht. Diese Ergebnisse decken sich mit bereits erschienen Publikationen, die den protektiven Einfluss von rhEPO auf die Zellintegrität verschiedener Gewebe durch die Reduzierung von Ischämie/Reperfusionsschäden nachweisen konnten. So wurde bereits gezeigt, dass rhEPO zu einer Reduzierung von Ischämie/Reperfusionsschäden nach oLTX mit 18 Stunden kalter Ischämie an der Ratte führt (118).

Die epidemiologischen Daten verdeutlichen den Stellenwert dieser tierexperimentellen Arbeit im Hinblick einer möglichen klinischen humanen Relevanz. Die NAFLD stellt vermutlich die häufigste Lebererkrankung in der westlichen Welt dar. So zeigte sich in Autopsien, dass bis zu 70 Prozent der Patienten mit Übergewicht und 30 Prozent der Patienten mit Normalgewicht von einer NAFLD betroffen waren (104).

Die entsprechenden Daten bezüglich der Prävalenz einer NASH reichen von 2,7 Prozent bis zu 18,5 Prozent. Die Patienten mit einem Typ 2 Diabetes mellitus wiesen in bis zu 75 Prozent der Fälle eine NAFLD in unterschiedlichen Stadien auf. Bei Menschen mit Übergewicht, also einem Body Mass Index zwischen 25 und 29,9 kg/m², konnte in 3 Prozent der Fälle eine Leberzirrhose nachgewiesen werden. Wiesen diese Menschen als Komorbidität einen Diabetes mellitus auf, belief sich die Prävalenz einer Leberzirrhose sogar auf bis zu 19 Prozent (104).

Diese Daten machen deutlich, welchen Stellenwert die NASH bereits aktuell in der Medizin einnimmt. Das amerikanische „Center for Disease Control (CDC)“ schätzt, dass im Jahre 2025 bis zu 50 Prozent der Menschen in den USA an Fettleibigkeit

(BMI >30kg/m²) leiden. In Anbetracht dieser Entwicklung und der derzeitigen angenommenen Prävalenz der NASH in Assoziation mit einer Fettleibigkeit gehen Schätzungen davon aus, dass im Jahre 2025 über 25 Millionen Menschen in den USA an einer NASH leiden werden. Sollte diese Entwicklung tatsächlich so eintreten, würde die Prävalenz der NASH im Jahre 2025 die der aktuellen Hepatitis C Infektion um das 10-fache in den USA übersteigen (137).

In diesem Zusammenhang ist die Progression der NASH zu einer Zirrhose und einer terminalen Lebererkrankung nicht hinreichend geklärt. So reicht die Prävalenz einer Leberzirrhose bei Patienten mit einer NASH von 3 bis zu 15 Prozent (138-140). Es gibt derzeit keine ausreichenden Daten bezüglich des prozentualen Anteils der durchgeführten Lebertransplantationen aufgrund einer NASH. Allerdings zeigten mehrere Studien, dass bis zu 50 Prozent aller Lebertransplantationen bei einer kryptogenen Leberzirrhose, womöglich einer nicht erkannten NASH geschuldet waren (141, 142). Derzeitig werden in Europa circa 8 Prozent der Lebertransplantationen aufgrund einer kryptogenen Zirrhose durchgeführt (143). Sollten die Prognosen bezüglich der zukünftigen Zunahme der NAFLD zutreffen, könnte die Anzahl der durchgeführten Lebertransplantationen, aufgrund einer kryptogenen beziehungsweise NASH bedingten Leberzirrhose, in 15 Jahren um ein mehrfaches steigen (137). Hinzu käme wahrscheinlich noch eine hohe Anzahl von Patienten mit einer NASH bedingten Zirrhose, die aufgrund ihrer Komorbiditäten nicht für eine Lebertransplantation geeignet wären (144). Ferner könnte eine Fettleibigkeit möglicherweise zu einer verstärkten Progression bereits bestehender HCV- oder Alkohol-assoziierten Lebererkrankungen führen (145, 146).

Trotz der zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen, die es zu möglichen protektiven Substanzen im Zusammenhang mit Ischämie/Reperfusionsschäden bei der Lebertransplantation gibt, konnte dieses Wissen nur vergleichsweise wenig im klinischen Alltag etabliert werden (135). Ein großer Anteil dieser Substanzen ist nicht für den klinischen Gebrauch am Menschen zugelassen. Daher ist der klinische Einsatz nicht möglich oder sehr erschwert. rhEPO ist hingegen bereits seit Jahren als Medikament im klinischen Einsatz etabliert und kann als eine relativ sichere Substanz, mit einigen wenigen Nebenwirkungen, betrachtet werden (147-153).

Die Verringerung von Ischämie/Reperfusionsschäden bringt rhEPO in Verbindung mit einer verbesserten Geweberegeneration, in eine viel versprechende Position bezüglich einer möglichen Anwendung von „marginalen“ Transplantaten und einer

möglicherweise damit verbundenen verbesserten initialen Transplantatfunktion. Der in dieser Arbeit bewiesene signifikante Überlebensvorteil der mit rhEPO behandelten Ratten untermauert diese These.

Daher könnte die Konditionierung eines „marginalen“ Organes zur Verbesserung der initialen Transplantatfunktion, durch die Gabe von rhEPO vor und nach der Transplantation, als wertvolles Werkzeug dienlich sein (154).

6 Zusammenfassung

Der Mangel von geeigneten Spenderorganen stellt eines der Hauptprobleme in der heutigen Transplantationschirurgie dar. Dieser Umstand zwingt den Chirurgen immer öfter zur Akzeptanz von „marginalen“ Organen. Diese qualitativ schlechteren Transplantate sind vermehrt mit einem primären Transplantatversagen, einer primären Transplantatdysfunktion und einem verringerten Empfängerüberleben assoziiert. Tierexperimentelle Untersuchungen konnten bereits mehrfach die positiven Auswirkungen von rekombinantem humanen Erythropoietin (rhEPO) gegenüber verschiedenen Organsystemen demonstrieren. In diesem Zusammenhang konnte der protektive Einfluss von rhEPO gegenüber Ischämie/Reperfusionsschäden in der Leber, der Lunge und dem Gehirn nachgewiesen werden.

Diese Arbeit hat es sich zum Ziel gemacht die Auswirkungen von Erythropoietin auf die Ischämie/Reperfusionsschäden der Fettleber nach orthotoper Lebertransplantation am Rattenmodell zu beleuchten.

Es wurden insgesamt 140 Lewis Ratten verwendet und 70 Lebertransplantationen am Rattenmodell durchgeführt. Zur Induktion einer Fettleber (Verfettung >50%) wurde eine Methionin-Cholin-Defizit-Diät (MCDD) bei allen 70 Spendertieren angewendet. Die Behandlungsgruppen bestanden aus 60 Spender- und Empfängertieren und diese erhielten jeweils 4000 Einheiten rhEPO pro Kilogramm Körpergewicht portalvenös injiziert. Die anderen 80 Spender- und Empfängertiere der Kontrollgruppen erhielten jeweils eine portalvenöse Injektion mit Kochsalzlösung. Die Injektionen erfolgten eine halbe Stunde vor der Organentnahme in der Spendergruppe und direkt nach der Organreperfusion in der Empfängergruppe. Bei sämtlichen Transplantaten wurde eine Kaltischämiezeit von 6 Stunden eingehalten und die Organe wurden mit der University of Wisconsin-Lösung konserviert. Die Tiere wurden 4,5, 24 und 48 Stunden, sowie 7 Tage nach der Reperfusion getötet. Zwei Stunden nach der Reperfusion war bei den Tieren die 4,5 Stunden nach Reperfusion getötet wurden, eine Resektion des Lobus triangulatus zur histologischen und molekularbiologischen Aufbereitung durchgeführt worden. Von sämtlichen Tieren wurde zum Tötungszeitpunkt Blut- und Lebergewebe asserviert. Es erfolgten Laboranalysen der Leberenzyme (AST, ALT, LDH, GLDH), histologische Untersuchungen (H.E.-, PAS-Färbung), sowie immunhistologische Analysen

(TUNEL, HypoxyprobeTM, TNF- α) und Bestimmungen der mRNA-Expression bestimmter Zytokine mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (HGF, HIF-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , VEGF).

Die kumulative Überlebensrate der Tiere die mit rhEPO behandelt worden sind, war signifikant höher, als die der Tiere die nur mit Kochsalzlösung behandelt wurden. RhEPO vs. NaCl: 86,6% (n=30; 26 überlebt/4 gestorben) vs. 65% (n=40; 26 überlebt/14 gestorben) (p=0,031). Sämtliche verstorbenen Tiere kamen circa innerhalb der ersten 4 Stunden nach der Operation zu Tode und wiesen in der Obduktion alle Zeichen eines hyperakuten Transplantatversagens auf. Der beobachtete signifikante Überlebensvorteil unter rhEPO-Applikation, stimmt somit mit vielen bis dato publizierten tierexperimentellen Studien überein (114-116).

Die ALT- und AST-Aktivität im Plasma war in der mit rhEPO behandelten Gruppe 48 Stunden nach der Reperfusion des Transplantates, signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Alle anderen gemessenen Leberenzyme zeigten sehr uneinheitliche Ergebnisse auf. Der prozentuale Anteil des nekrotischen Lebergewebes konnte weder in der Kontroll- noch in der Behandlungsgruppe ein eindeutiges Ergebnis erbringen. Die immunhistologische HypoxyprobeTM-Färbung zeigte signifikant niedrigere hypoxische Zellen 4,5 Stunden nach Reperfusion in der rhEPO-Gruppe auf. Es wurde eine signifikant verringerte Apoptoserate in der rhEPO-Gruppe nach 4,5 Stunden festgestellt. Fast sämtliche Zytokine konnten keine signifikanten Ergebnisse aufweisen. Lediglich die TNF- α Expression war in der rhEPO-Gruppe nach 48 Stunden signifikant reduziert. Die VEGF mRNA-Expression war in der rhEPO-Gruppe ergänzend dazu nach 4,5 Stunden signifikant erhöht. Zudem konnte der Nachweis eines signifikanten Überlebensvorteils für die mit rhEPO behandelten Tiere erbracht werden.

RhEPO verringert die Ischämie/Reperfusionsschäden und verbessert in Verbindung mit einer gesteigerten Geweberegeneration das Überleben, im Rahmen der Transplantation einer Fettleber bei der Ratte.

7 Literatur

1. Starzl TE, Todo S, Tzakis AG, Gordon RD, Makowka L, Stieber A, et al. Liver transplantation: an unfinished product. *Transplantation proceedings*. 1989 Feb;21(1 Pt 2):2197-200.
2. Consensus Conference on Indications of Liver Transplantation. Paris, France, June 22-23, 1993. *Hepatology* (Baltimore, Md. 1994 Jul;20(1 Pt 2):1S-68S.
3. Mirza DF, Gunson BK, Da Silva RF, Mayer AD, Buckels JA, McMaster P. Policies in Europe on "marginal quality" donor livers. *Lancet*. 1994 Nov 26;344(8935):1480-3.
4. Schwartz R, Eisner A, Dameshek W. The effect of 6-mercaptopurine on primary and secondary immune responses. *The Journal of clinical investigation*. 1959 Aug;38(8):1394-403.
5. Briggs BM, Jones RN, Erwin ME, Barrett MS, Johnson DM. In vitro activity evaluations of cefdinir (FK482, CI-983, and PD134393). A novel orally administered cephalosporin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1991 Sep-Oct;14(5):425-34.
6. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1963 Dec;117:659-76.
7. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stahelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and actions*. 1976 Jul;6(4):468-75.
8. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet*. 1979 Nov 17;2(8151):1033-6.
9. Neuhaus P, Blumhardt G, Bechstein WO, Platz KP, Jonas S, Mueller AR, et al. Comparison of FK506- and cyclosporine-based immunosuppression in primary orthotopic liver transplantation. A single center experience. *Transplantation*. 1995 Jan 15;59(1):31-40.
10. Starzl TE, Iwatsuki S, Shaw BW, Jr., Gordon RD, Esquivel C. Liver transplantation in the ciclosporin era. *Progress in allergy*. 1986;38:366-94.
11. Chang GJ, Mahanty HD, Quan D, Freise CE, Ascher NL, Roberts JP, et al. Experience with the use of sirolimus in liver transplantation--use in patients for whom calcineurin inhibitors are contraindicated. *Liver Transpl*. 2000 Nov;6(6):734-40.
12. Langrehr JM, Schneller A, Guckelberger O, Lohmann R, Neumann U, Jonas S, et al. Comparison of quadruple induction including ATG or IL-2R antibody with FK506-based therapy after liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1998 Jun;30(4):1439-40.
13. Sterneck M, Fischer L, Gahlemann C, Gundlach M, Rogiers X, Broelsch C. Mycophenolate mofetil for prevention of liver allograft rejection: initial results of a controlled clinical trial. *Ann Transplant*. 2000;5(1):43-6.

14. Iwatsuki S, Esquivel CO, Klintmalm GB, Gordon RD, Shaw BW, Jr., Starzl TE. Nephrotoxicity of cyclosporine in liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1985 Aug;17(4 Suppl 1):191-5.
15. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988 Apr;45(4):673-6.
16. Momii S, Koga A. Time-related morphological changes in cold-stored rat livers. A comparison of Euro-Collins solution with UW solution. *Transplantation*. 1990 Nov;50(5):745-50.
17. Angus PW, McCaughan GW, Gane EJ, Crawford DH, Harley H. Combination low-dose hepatitis B immune globulin and lamivudine therapy provides effective prophylaxis against posttransplantation hepatitis B. *Liver Transpl*. 2000 Jul;6(4):429-33.
18. Bismuth H, Samuel D, Castaing D, Adam R, Chiche L, Johann M, et al. The Paul Brousse liver transplant series 1989 to 1992: new trends in the last four years. *Clinical transplants*. 1992:161-6.
19. Edwards EB, Roberts JP, McBride MA, Schulak JA, Hunsicker LG. The effect of the volume of procedures at transplantation centers on mortality after liver transplantation. *The New England journal of medicine*. 1999 Dec 30;341(27):2049-53.
20. First MR. Transplantation in the nineties. *Transplantation*. 1992 Jan;53(1):1-11.
21. Otte JB. Recent developments in liver transplantation. Lessons from a 5-year experience. *Journal of hepatology*. 1991 May;12(3):386-93.
22. Moreno J, Montero JL, Gavilan F, Costan G, Herrero C, Cardenas M, et al. [Open clinical trial with oral acyclovir for the prophylaxis of disease by Cytomegalovirus in low risk liver transplant recipients]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 1999 Oct;17(8):382-5.
23. Porte RJ, Ploeg RJ, Hansen B, van Bockel JH, Thorogood J, Persijn GG, et al. Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. *European Multicentre Study Group. Transpl Int*. 1998;11 Suppl 1:S164-7.
24. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, et al. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation*. 1991 Jan;51(1):157-63.
25. Furukawa H, Todo S, Imventarza O, Casavilla A, Wu YM, Scotti-Foglieni C, et al. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation*. 1991 May;51(5):1000-4.
26. Todo S, Demetris AJ, Makowka L, Teperman L, Podesta L, Shaver T, et al. Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation*. 1989 May;47(5):903-5.
27. Howard RJ, Reed AI, Van der Werf WJ, Silkensen JA, Patton PR, Scornik JC. Development of polycystic disease in a kidney 10 years after transplantation. *Transplantation*. 1999 Nov 27;68(10):1620.

28. Szabo A, Heemann U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplantation proceedings*. 1998 Dec;30(8):4281-4.
29. Everhart JE, Lombardero M, Detre KM, Zetterman RK, Wiesner RH, Lake JR, et al. Increased waiting time for liver transplantation results in higher mortality. *Transplantation*. 1997 Nov 15;64(9):1300-6.
30. Kalayoglu M, Hoffmann RM, D'Alessandro AM, Pirsch JD, Sollinger HW, Belzer FO. Results of extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Transplantation proceedings*. 1989 Jun;21(3):3487-8.
31. Markmann JF, Markmann JW, Markmann DA, Bacquerizo A, Singer J, Holt CD, et al. Preoperative factors associated with outcome and their impact on resource use in 1148 consecutive primary liver transplants. *Transplantation*. 2001 Sep 27;72(6):1113-22.
32. Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *Jama*. 1989 Feb 3;261(5):711-4.
33. Pratschke J, Mittler J, Neuhaus P. [Expanding the liver donor pool through extended-criteria donation]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*. 2008 Feb;79(2):130-4.
34. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M. Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1994 Oct;20(4 Pt 1):829-38.
35. Bundesärztekammer. Richtlinien zur Organtransplantation nach §16 TPG, Änderung;. *Deutsches Ärzteblatt*. 2004 May;5(101):246-7.
36. Hilden M, Christoffersen P, Juhl E, Dalgaard JB. Liver histology in a 'normal' population--examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1977;12(5):593-7.
37. Hornboll P, Olsen TS. Fatty changes in the liver: the relation to age, overweight and diabetes mellitus. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 1982 May;90(3):199-205.
38. Berson A, De Beco V, Letteron P, Robin MA, Moreau C, El Kahwaji J, et al. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):764-74.
39. Fromenty B, Berson A, Pessayre D. Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Journal of hepatology*. 1997;26 Suppl 1:13-22.
40. Selzner M, Clavien PA. Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2000 Jan;31(1):35-42.
41. Perez-Daga JA, Santoyo J, Suarez MA, Fernandez-Aguilar JA, Ramirez C, Rodriguez-Canete A, et al. Influence of degree of hepatic steatosis on graft function and postoperative complications of liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2006 Oct;38(8):2468-70.
42. Hilden M, Juhl E, Thomsen AC, Christoffersen P. Fatty liver persisting for up to 33 years. A follow-up of the inversen-roholm liver biopsy material. *Acta medica Scandinavica*. 1973 Dec;194(6):485-9.

43. Nikeghbalian S, Nejatollahi SM, Salahi H, Bahador A, Sabet B, Jalaeian H, et al. Does donor's fatty liver change impact on early mortality and outcome of liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2007 May;39(4):1181-3.
44. Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. 2000 Dec;32(6):1280-8.
45. Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, Krishna MK, Ludwig J, Nagorney DM. Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg*. 1998 May-Jun;2(3):292-8.
46. Taneja C, Prescott L, Koneru B. Critical preservation injury in rat fatty liver is to hepatocytes, not sinusoidal lining cells. *Transplantation*. 1998 Jan 27;65(2):167-72.
47. Brunner. Wenn Zellen sterben... Unipress. 2003 Oct;118:5-7.
48. Koneru B, Dikdan G. Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation*. 2002 Feb 15;73(3):325-30.
49. Pizarro M, Balasubramaniyan N, Solis N, Solar A, Duarte I, Miquel JF, et al. Bile secretory function in the obese Zucker rat: evidence of cholestasis and altered canalicular transport function. *Gut*. 2004 Dec;53(12):1837-43.
50. Shiraishi K, Matsuzaki S, Ishida H, Nakazawa H. Impaired erythrocyte deformability and membrane fluidity in alcoholic liver disease: participation in disturbed hepatic microcirculation. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 1993;1A:59-64.
51. Akamatsu K, Nishinobu M, Ohuchi T, Tada K, Ohta Y. Effect of chronic alcohol intake on rat liver microcirculation assessed by the multiple indicator dilution technique. *Alcohol and alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. 1993;1A:53-8.
52. Baskin-Bey ES, Canbay A, Bronk SF, Werneburg N, Guicciardi ME, Nyberg SL, et al. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *American journal of physiology*. 2005 Feb;288(2):G396-402.
53. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2003 Jan;228(1):1-14.
54. Graber SE, Krantz SB. Erythropoietin and the control of red cell production. *Annual review of medicine*. 1978;29:51-66.
55. Adamson J. Erythropoietin, iron metabolism, and red blood cell production. *Seminars in hematology*. 1996 Apr;33(2 Suppl 2):5-7; discussion 8-9.
56. Samtleben W, Ivanovich P, Gurland HJ. Recombinant human erythropoietin in nephrology. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 1989;43(8):607-12.
57. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2004 Aug;43(8):649-59.
58. Silver M, Corwin MJ, Bazan A, Gettinger A, Enny C, Corwin HL. Efficacy of recombinant human erythropoietin in critically ill patients admitted to a long-term acute care facility: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Critical care medicine*. 2006 Sep;34(9):2310-6.

59. Hewitson KS, McNeill LA, Schofield CJ. Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway: applications from cardiovascular disease to cancer. *Current pharmaceutical design*. 2004;10(8):821-33.
60. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Jun 6;92(12):5510-4.
61. Hoffmann MW, Wonigeit K, Steinhoff G, Behrend M, Herzbeck H, Flad HD, et al. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in rejecting human liver grafts. *Transplantation proceedings*. 1991 Feb;23(1 Pt 2):1421-3.
62. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*. 1999 May 20;399(6733):271-5.
63. Bunn HF, Gu J, Huang LE, Park JW, Zhu H. Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *The Journal of experimental biology*. 1998 Apr;201(Pt 8):1197-201.
64. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K, Kobayashi S, Kim SU. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2001 Apr;60(4):386-92.
65. Sawada H, Kan M, McKeehan WL. Opposite effects of monokines (interleukin-1 and tumor necrosis factor) on proliferation and heparin-binding (fibroblast) growth factor binding to human aortic endothelial and smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1990 Feb;26(2):213-6.
66. Sawyer ST, Krantz SB, Luna J. Identification of the receptor for erythropoietin by cross-linking to Friend virus-infected erythroid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987 Jun;84(11):3690-4.
67. D'Andrea AD, Zon LI. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *The Journal of clinical investigation*. 1990 Sep;86(3):681-7.
68. Constantinescu SN, Huang LJ, Nam H, Lodish HF. The erythropoietin receptor cytosolic juxtamembrane domain contains an essential, precisely oriented, hydrophobic motif. *Molecular cell*. 2001 Feb;7(2):377-85.
69. Kubatzky KF, Ruan W, Gurezka R, Cohen J, Ketteler R, Watowich SS, et al. Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr Biol*. 2001 Jan 23;11(2):110-5.
70. Philo JS, Aoki KH, Arakawa T, Narhi LO, Wen J. Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction. *Biochemistry*. 1996 Feb 6;35(5):1681-91.
71. von Lindern M, Parren-van Amelsvoort M, van Dijk T, Deiner E, van den Akker E, van Emst-de Vries S, et al. Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Nov 3;275(44):34719-27.
72. Damen JE, Wakao H, Miyajima A, Kros J, Humphries RK, Cutler RL, et al. Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-

- induced cell proliferation and Stat5 activation. *The EMBO journal*. 1995 Nov 15;14(22):5557-68.
73. Remy I, Wilson IA, Michnick SW. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science (New York, NY)*. 1999 Feb 12;283(5404):990-3.
 74. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Mar 27;98(7):4044-9.
 75. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2002 Aug;8(8):495-505.
 76. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Oct;112(7):999-1007.
 77. Liu J, Yang D, Minemoto Y, Leitges M, Rosner MR, Lin A. NF-kappaB is required for UV-induced JNK activation via induction of PKCdelta. *Molecular cell*. 2006 Feb 17;21(4):467-80.
 78. Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends in molecular medicine*. 2001 Jul;7(7):314-9.
 79. Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, et al. Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life sciences*. 2006 Apr 4;78(19):2255-64.
 80. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003 Jul 8;108(1):79-85.
 81. Lipsic E, van der Meer P, Henning RH, Suurmeijer AJ, Boddeus KM, van Veldhuisen DJ, et al. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2004 Oct;44(4):473-9.
 82. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Apr 15;100(8):4802-6.
 83. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, et al. Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003 Sep 5;308(4):990-4.
 84. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends in pharmacological sciences*. 2004 Nov;25(11):577-83.
 85. Sack MN, Smith RM, Opie LH. Tumor necrosis factor in myocardial hypertrophy and ischaemia--an anti-apoptotic perspective. *Cardiovascular research*. 2000 Feb;45(3):688-95.

86. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2002 Jan;53(1):31-47.
87. Liu YQ, Mu ZQ, You S, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Fas/FasL signaling allows extracellular-signal regulated kinase to regulate cytochrome c release in oridonin-induced apoptotic U937 cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2006 Sep;29(9):1873-9.
88. Bal-Price A, Brown GC. Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *Journal of neurochemistry*. 2000 Oct;75(4):1455-64.
89. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Mar;23(3):320-30.
90. Kang JQ, Chong ZZ, Maiese K. Critical role for Akt1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation. *Molecular pharmacology*. 2003 Sep;64(3):557-69.
91. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation*. 2002 Dec 3;106(23):2973-9.
92. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN. Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *The Journal of cell biology*. 2000 Oct 30;151(3):483-94.
93. Caraceni P, Bianchi C, Domenicali M, Maria Pertosa A, Maiolini E, Parenti Castelli G, et al. Impairment of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat fatty liver exposed to preservation-reperfusion injury. *Journal of hepatology*. 2004 Jul;41(1):82-8.
94. Lee S, Charters AC, Chandler JG, Orloff MJ. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1973 Dec;16(6):664-9.
95. Zimmermann FA, Butcher GW, Davies HS, Brons G, Kamada N, Turel O. Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of the immunologic responses to fully allogeneic liver grafts. *Transplantation proceedings*. 1979 Mar;11(1):571-7.
96. Begg AC, Engelhardt EL, Hodgkiss RJ, McNally NJ, Terry NH, Wardman P. Nitroakridin 3582: a fluorescent nitroacridine stain for identifying hypoxic cells. *The British journal of radiology*. 1983 Dec;56(672):970-3.
97. Miller GG, Ngan-Lee J, Chapman JD. Intracellular localization of radioactively labeled misonidazole in EMT-6-tumor cells in vitro. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1982 Mar-Apr;8(3-4):741-4.
98. Romestaing C, Piquet MA, Bedu E, Rouleau V, Dautresme M, Hourmand-Ollivier I, et al. Long term highly saturated fat diet does not induce NASH in Wistar rats. *Nutrition & metabolism*. 2007;4:4.
99. Gauthier MS, Couturier K, Latour JG, Lavoie JM. Concurrent exercise prevents high-fat-diet-induced macrovesicular hepatic steatosis. *J Appl Physiol*. 2003 Jun;94(6):2127-34.
100. Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain

- and sex difference studies. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2003 Nov;18(11):1272-82.
101. Starkel P, Sempoux C, Leclercq I, Herin M, Deby C, Desager JP, et al. Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *Journal of hepatology*. 2003 Oct;39(4):538-46.
 102. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic proceedings*. 1980 Jul;55(7):434-8.
 103. Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes & metabolism*. 2008 Dec;34(6 Pt 2):634-7.
 104. Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2003 May;37(5):1202-19.
 105. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1413-9.
 106. Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, et al. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002 Sep;123(3):745-50.
 107. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2003 Apr;37(4):917-23.
 108. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998 Apr;114(4):842-5.
 109. Marchesini G, Marzocchi R, Agostini F, Bugianesi E. Nonalcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*. 2005 Aug;16(4):421-7.
 110. McCullough AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of clinical gastroenterology*. 2006 Mar;40 Suppl 1:S17-29.
 111. Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Current opinion in gastroenterology*. 2005 Nov;21(6):702-7.
 112. Farrell GC, George J, de la M. Hall P, McCullough AJ. *Fatty Liver Disease: NASH and Related Disorders*: Wiley-Blackwell; 2004.
 113. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine*. 2002 Apr 18;346(16):1221-31.
 114. Schmeding M, Boas-Knoop S, Lippert S, Ruehl M, Somasundaram R, Dagdelen T, et al. Erythropoietin promotes hepatic regeneration after extended liver resection in rats. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008 Jul;23(7 Pt 1):1125-31.
 115. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, et al. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int*. 2006 Nov;19(11):919-26.

116. Bockhorn M, Fingas CD, Rauhen U, Canbay A, Sotiropoulos GC, Frey U, et al. Erythropoietin treatment improves liver regeneration and survival in rat models of extended liver resection and living donor liver transplantation. *Transplantation*. 2008 Dec 15;86(11):1578-85.
117. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, et al. Recombinant human erythropoietin inhibits iNOS activity and reverts vascular dysfunction in splanchnic artery occlusion shock. *British journal of pharmacology*. 1999 May;127(2):482-8.
118. Schmeding M, Hunold G, Ariyakhagorn V, Rademacher S, Boas-Knoop S, Lippert S, et al. Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transpl Int*. 2009 Jul;22(7):738-46.
119. Caraceni P, Domenicali M, Vendemiale G, Grattagliano I, Pertosa A, Nardo B, et al. The reduced tolerance of rat fatty liver to ischemia reperfusion is associated with mitochondrial oxidative injury. *The Journal of surgical research*. 2005 Apr;124(2):160-8.
120. Saito Y, Uppal A, Byfield G, Budd S, Hartnett ME. Activated NAD(P)H oxidase from supplemental oxygen induces neovascularization independent of VEGF in retinopathy of prematurity model. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008 Apr;49(4):1591-8.
121. Schmeding M, Neumann UP, Boas-Knoop S, Spinelli A, Neuhaus P. Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung*. 2007;39(3):189-97.
122. Chang YS, Mu D, Wendland M, Sheldon RA, Vexler ZS, McQuillen PS, et al. Erythropoietin improves functional and histological outcome in neonatal stroke. *Pediatric research*. 2005 Jul;58(1):106-11.
123. Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, Brismar H, Brines M, Cerami A, et al. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Feb 3;106(5):1602-7.
124. Iwai M, Cao G, Yin W, Stetler RA, Liu J, Chen J. Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2007 Oct;38(10):2795-803.
125. Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer*. 2000 Aug;36(13 Spec No):1649-60.
126. Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P, Jain RK. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1 α hypoxia response element VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer research*. 2000 Nov 15;60(22):6248-52.
127. Maeno H, Ono T, Dhar DK, Sato T, Yamanoi A, Nagasue N. Expression of hypoxia inducible factor-1 α during liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Liver Int*. 2005 Oct;25(5):1002-9.
128. Tajima T, Goda N, Fujiki N, Hishiki T, Nishiyama Y, Senoo-Matsuda N, et al. HIF-1 α is necessary to support gluconeogenesis during liver regeneration.

- Biochemical and biophysical research communications. 2009 Oct 2;387(4):789-94.
129. Camargo CA, Jr., Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* (Baltimore, Md. 1997 Dec;26(6):1513-20.
 130. Wustefeld T, Rakemann T, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Hyperstimulation with interleukin 6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* (Baltimore, Md. 2000 Sep;32(3):514-22.
 131. Wieckowska A, Papouchado BG, Li Z, Lopez R, Zein NN, Feldstein AE. Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis. *The American journal of gastroenterology*. 2008 Jun;103(6):1372-9.
 132. Adams LA, Feldstein A, Lindor KD, Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease among patients with hypothalamic and pituitary dysfunction. *Hepatology* (Baltimore, Md. 2004 Apr;39(4):909-14.
 133. Hatano E. Tumor necrosis factor signaling in hepatocyte apoptosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007 Jun;22 Suppl 1:S43-4.
 134. Tacke F. [Monocyte subpopulations in inflammation processes: principles and perspectives]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946). 2009 Aug;134(33):1645-8.
 135. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiological reviews*. 2009 Oct;89(4):1269-339.
 136. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*. 1999 Sep 1;94(5):1561-7.
 137. Burke A, Lucey MR. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant*. 2004 May;4(5):686-93.
 138. Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* (Baltimore, Md. 1999 Dec;30(6):1356-62.
 139. Evans CD, Oien KA, MacSween RN, Mills PR. Non-alcoholic steatohepatitis: a common cause of progressive chronic liver injury? *Journal of clinical pathology*. 2002 Sep;55(9):689-92.
 140. Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* (Baltimore, Md. 1990 Jan;11(1):74-80.
 141. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* (Baltimore, Md. 1999 Mar;29(3):664-9.
 142. Poonawala A, Nair SP, Thuluvath PJ. Prevalence of obesity and diabetes in patients with cryptogenic cirrhosis: a case-control study. *Hepatology* (Baltimore, Md. 2000 Oct;32(4 Pt 1):689-92.

143. Primary indications of Liver Transplantation in Cirrhosis in Europe. European Liver Transplant Registry 2008; [WWW document]:http://www.eltr.org/IMG/gif_DIA25.gif.
144. Schunkert H. Obesity and target organ damage: the heart. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Dec;26 Suppl 4:S15-20.
145. Ortiz V, Berenguer M, Rayon JM, Carrasco D, Berenguer J. Contribution of obesity to hepatitis C-related fibrosis progression. *The American journal of gastroenterology*. 2002 Sep;97(9):2408-14.
146. Raynard B, Balian A, Fallik D, Capron F, Bedossa P, Chaput JC, et al. Risk factors of fibrosis in alcohol-induced liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2002 Mar;35(3):635-8.
147. Defamie V, Laurens M, Patrono D, Devel L, Brault A, Saint-Paul MC, et al. Matrix metalloproteinase inhibition protects rat livers from prolonged cold ischemia-warm reperfusion injury. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008 Jan;47(1):177-85.
148. Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, Yamashita K, Csizmadia E, Lassman C, et al. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2004 Dec;40(6):1333-41.
149. Hamada T, Fondevila C, Busuttil RW, Coito AJ. Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008 Jan;47(1):186-98.
150. Kiemer AK, Vollmar AM, Bilzer M, Gerwig T, Gerbes AL. Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF-alpha mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF-kappaB and AP-1. *Journal of hepatology*. 2000 Aug;33(2):236-46.
151. Mueller TH, Kienle K, Beham A, Geissler EK, Jauch KW, Rentsch M. Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation*. 2004 Nov 15;78(9):1267-73.
152. Nakajima H, Mizuta N, Fujiwara I, Sakaguchi K, Ogata H, Magae J, et al. Blockade of the Fas/Fas ligand interaction suppresses hepatocyte apoptosis in ischemia-reperfusion rat liver. *Apoptosis*. 2008 Aug;13(8):1013-21.
153. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, et al. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Annals of surgery*. 2004 Feb;239(2):220-31.
154. Schmeding M, Rademacher S, Boas-Knoop S, Roecken C, Lendeckel U, Neuhaus P, et al. rHuEPo reduces ischemia-reperfusion injury and improves survival after transplantation of fatty livers in rats. *Transplantation*. 2010 Jan 27;89(2):161-8.

Abkürzungen

ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Aktivatorprotein
Apaf	apoptosis protease activating factor
APS	Ammoniumpersulfat
AST	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Caspasen	cystein-specific aspartate proteases
cDNA	Komplementäre DNA
CFU	Kolonie-bildende Einheiten
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DISC	death inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Gemisch aus vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELTR	European Liver Transplant Registry
EPO	Erythropoietin
ERK	extrazelluläre Signalkinase
FAM	6-Carboxyfluorescein
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
G	Gauches
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia-inducible factor
IAP	Apoptose–inhibierenden-Proteinen
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IGF	Insulin-ähnlicher-Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
JAK	Januskinase

JNK	c-Jun Aminoendekinas
LDH	Lactatdehydrogenase
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MBK	minimale bakterizide Konzentration
MCDD	Methionin-Cholin-Defizit-Diät (MCDD)
M _r	Molekulargewicht
mRNA	Boten-RNA
NASH	Nicht-alkoholische Fettleberhepatitis
NF	nukleärer Faktor
NF-κB	Nuklearfaktor-kappa-B
oLTX	orthotope Lebertransplantation
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDF	Primäre Transplantatdysfunktion
PKC	Protein-Kreatinin-Kinase
PNF	Primäres Transplantatversagen
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoietin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
rt-PCR	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT	signal transducers and activators of transcription
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamine
Taq	Eubakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
U/min	Umdrehung pro Minute
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ΔΨ _m	mitochondriales Membranpotential

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ulf Neumann und meinem Betreuer Herrn PD. Dr. med. Maximilian Schmeding für die Überlassung des Themas und die fortwährende Hilfestellung. In den vergangenen Jahren gab mir ihr entgegengebrachtes Vertrauen stets die Zuversicht und die Kraft diese Arbeit voranzutreiben.

Frau Sabine Boas-Knoop danke ich für die andauernde unermüdliche Hilfe in allen Lebenslagen.

Ich danke Herrn Dietrich Polenz für die Einführung in die tierexperimentelle Lebertransplantation und für seine hilfreiche Begleitung während dieser Zeit.

Herrn Steffen Lippert gilt mein Dank für das große Engagement und die geduldige Hilfestellung im Labor.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz, die freundliche und kompetente Hilfe.

Meinem Kollegen Herrn Dr. med. Gerhard Hunold danke ich für seine wertvolle Hilfe bei der Einführung in die experimentelle Lebertransplantation bei der Ratte und der Ausarbeitung der Promotionsschrift.

Zudem gilt mein Dank meinem Chef und Lehrer, Herrn Prof. Dr. med. Peter Neuhaus. Ich verdanke ihm die Möglichkeit, dass ich diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen konnte.

Meiner Familie danke ich für die zahlreichen Ratschläge und den stetigen Rückhalt. Katharina danke ich, dass sie allezeit ein offenes Ohr für meine Gedanken und Sorgen bei der schriftlichen Umsetzung dieser Arbeit hatte. Ihre Liebe und Unterstützung war mir stets eine Stütze und haben mich immer wieder auf neue Ideen gebracht.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht veröffentlicht.

Erklärung an Eides Statt

„Ich, Sebastian Rademacher, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Auswirkungen von Erythropoietin auf die Ischämie/Reperfusionsschäden der Fettleber nach orthotoper Lebertransplantation am Rattenmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Publikationsliste

„RHuEPO reduces ischemia-reperfusion injury and improves survival after transplantation of fatty livers in rats.”

Schmeding M, Rademacher S et al.
Transplantation 2010 Jan 27;89(2):161-8.

„Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats.”

Schmeding M, Hunold G, Ariyakhagorn V, Rademacher S et al.
Transpl Int. 2009 Jul;22(7):738-46.