

## C. Material und Methoden

### 1. Patienten

85 nicht konsekutive, orthotope Lebertransplantationen (LTX), die zwischen August 1993 und Juli 1994 am Universitätsklinikum Rudolf Virchow der Freien Universität Berlin durchgeführt wurden, sind in die Studie aufgenommen worden. Das Patientenkollektiv setzt sich aus insgesamt 81 Personen (weiblich: 31, männlich: 50) zusammen. Das Durchschnittsalter zum Transplantationszeitpunkt betrug  $45,8 \pm 1,1$  Jahre, wobei der jüngste Patient 18 und der älteste Patient 62 Jahre alt waren.

Im Rahmen dieser Studie wurde bei den Patienten prospektiv die Serumkonzentration diverser Cytokine und extrazellulärer Matrixparameter aus peri- und postoperativ gewonnenem Blut bestimmt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Freien Universität Berlin freigegeben. Da jeder Patient über den Ablauf der Studie und die Studienziele aufgeklärt wurde und sich schriftlich mit der Aufnahme einverstanden erklären musste, war es nicht möglich 85 konsekutive Transplantationen zu analysieren.

Transplantationsindikation war in 62 Fällen eine Leberzirrhose (LZ), bei 5 Patienten ein akutes Leberversagen (ALV), in 12 Fällen eine andere seltene Ursache und 6 Patienten mussten sich einer Retransplantation (Re-LTX) unterziehen (siehe Abbildung 1 und Tabelle 1).

Bei den Patienten mit Leberzirrhose lag in 16 Fällen eine alkoholtoxische LZ, in 12 Fällen eine HBV assoziierte LZ und in 11 Fällen eine HCV assoziierte LZ vor. 11 Patienten litten an einer primär biliären Zirrhose (PBC), 8 Patienten hatten eine kryptogene LZ und 4 Patienten waren an einer Autoimmun LZ erkrankt.

Bei den 5 Fällen von akutem Leberversagen war dies bei einem Patienten auf eine HBV-Infektion, bei 2 Fällen auf eine HCV-Infektion und in 2 weiteren Fällen auf eine Intoxikation zurückzuführen.

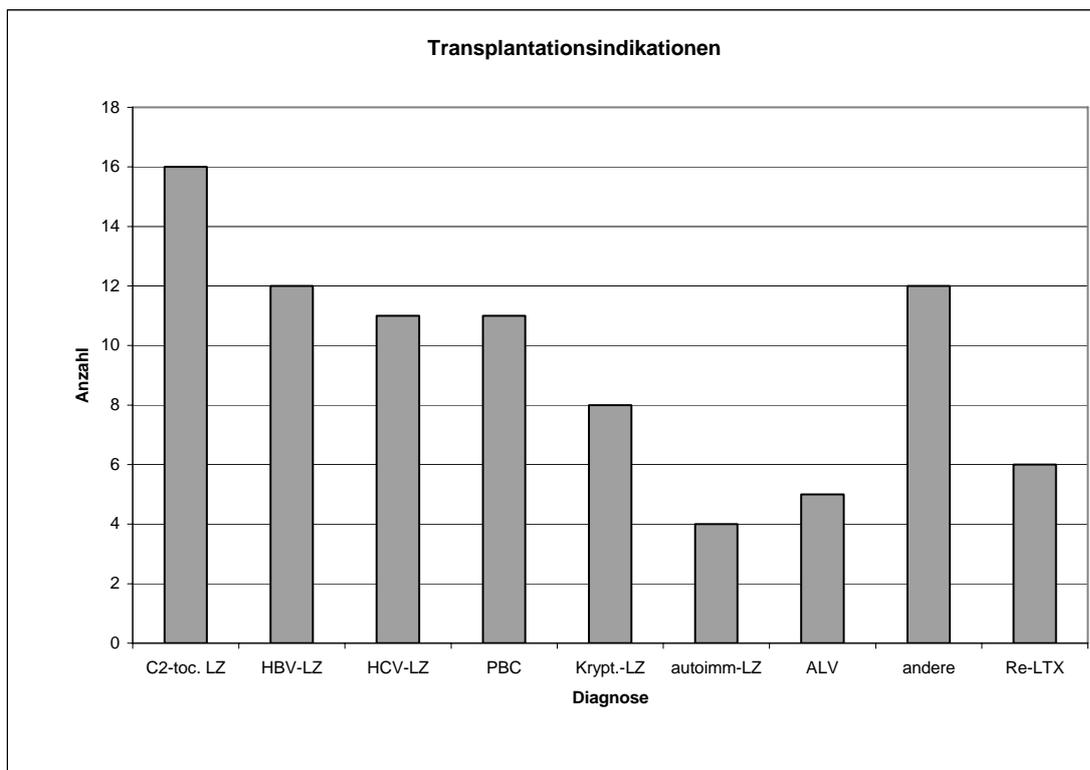
Die anderen Ursachen der Transplantationsindikation in unserem Patientengut setzten sich wie folgt zusammen: Budd-Chiari-Syndrom (3), Oxalose (2), M. Wilson (2), Caroli-Syndrom (1), primär sklerosierende Cholangitis (PSC) (1), Klatskin-Tumor (1) Carcinoidmetastase (1), Zystenleber (1).

Von den 6 Patienten bei denen eine Retransplantation notwendig wurde, waren 4 Patienten bereits im Rahmen der primären Transplantation Teil unserer Studie.

2 weitere Patienten wurden erst zur Retransplantation in die Studie aufgenommen.

Notwendig wurde die Retransplantation in 2 Fällen durch eine chronische Abstoßungsreaktion, in einem Fall durch eine therapierefraktäre akute Abstoßungsreaktion. Hinzu kamen ein Fall von initialer Nichtfunktion (INF) des Transplantats, eine HBV-Reinfektion, sowie ein Fall von frühem Transplantatversagen aufgrund einer Lysetherapie mit rt-PA und disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC) im Rahmen einer Lungenarterienembolie.

Bei insgesamt 4 Patienten war eine kombinierte Nieren- und Lebertransplantation notwendig. Bei 2 Patienten wurde zusätzlich eine partielle Pankreatoduodenektomie nach Whipple durchgeführt.



**Abb. 1: Indikationen zur Lebertransplantation (n=85)**

<b>Indikation Zur Lebertransplantation (n=85)</b>	<b>Anzahl</b>
Leberzirrhose Äthyltoxisch (16) Hepatitis B (12) Hepatitis C (11) Primär biliäre Zirrhose (11) Kryptogen (8) Autoimmun (4) Budd-Chiary-Syndrom (3) Oxalose (2) M. Wilson (2) Primär Sklerosierende Cholangitis (1)	70
Akutes Leberversagen (ALV) Hepatitis B (1) Hepatitis C (2) Intoxikation (2)	5
Retransplantation (Re-LTX) chronische Abstoßung (2) INF (1) therapierefraktäre Abstoßung (1) HBV- Reinfektion Leberversagen nach ALE mit Lyse-Therapie und DIC (1)	6
Andere	4

Caroli-Syndrom (1)	
Klatskin-Tumor (1)	
Karzinoid-Metastase (1)	
Zystenleber (1)	

**Tab. 1 : Indikationen zur Lebertransplantation**

## 2. Methoden

### 2.1. Prä- und postoperative Untersuchungen

Alle Patienten, die für eine Lebertransplantation in Frage kommen, müssen bevor die Indikation gestellt wird ein Evaluierungsprogramm durchlaufen. Ausgenommen hiervon sind Patienten mit fulminanten Leberversagen.

Teil des Evaluierungsprogramms sind eine körperliche Untersuchung, laborchemische Untersuchungen, eine Sonographie des Abdomen, eine Abdomen-Computertomographie sowie eine Angiographie des Truncus coeliacus.

Postoperativ werden Patient und Transplantat durch umfangreiche laborchemische Untersuchungen kontrolliert. Die Galleproduktion wird in Quantität und Qualität bis zum Abklemmen der T-Drainage dokumentiert.

Am 5. postoperativen Tag wird eine routinemäßige Kontrastmitteldarstellung der Gallenwege über die liegende T-Drainage zum Ausschluss von Leckagen oder Strikturen im Anastomosenbereich durchgeführt. Sind diese ausgeschlossen, wird die T-Drainage abgeklemmt.

Leberbiopsien werden routinemäßig am 7. postoperativen Tag, sowie bei jedem Verdacht einer Transplantatabstoßung durchgeführt.

Vor endgültiger Entfernung der T-Drainage am 42. postoperativen Tag werden die Gallenwege erneut cholangiographiert.

## *2.2. Chirurgische Technik*

Alle Spenderorgane wurden bei kalten Ischämiezeiten zwischen 3,5 und 22 Stunden (Mittelwert  $9,5 \pm 0,4$ ) in der University of Wisconsin (UW)-Lösung konserviert.

Das chirurgische Vorgehen erfolgte nach standardisierten Techniken. Vor Hepatektomie wurde bei allen Patienten ein venovenöser Bypass über eine Pumpe zwischen der V. femoralis und der V. axillaris angelegt. Die Gallenganganastomosen wurden in Seit-zu-Seit Technik mit T-Drainage vorgenommen. In einem Fall musste aus technischen Gründen eine Choledochojejunostomie erfolgen.

Die intraoperativ begonnene Gabe von Aprotinin (0,1 Mio. IE/h) wurde bis zum 3. postoperativen Tag fortgesetzt (33). Ferner erhielten alle Patienten eine Dopaminmedikation in Nierendosis (bis  $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) für 48 Stunden.

## *2.3. Einschätzung der initialen Transplantatfunktion*

Die initiale Transplantatfunktion wurde anhand der Quantität sowie Qualität der in den ersten 24 Stunden nach Reperfusion produzierten Galle und dem Transaminasen-Peak im Blut in den ersten 72 Stunden abgeschätzt. Die initiale Transplantatfunktion wurde anhand dieser Parameter in drei Gruppen (gut, mäßig, schlecht) eingeteilt.

<b>Parameter</b>	<b>1 Punkt</b>	<b>2 Punkte</b>	<b>3 Punkte</b>
Galle Farbe (24 h nach Reperfusion)	Dunkel braun	Leicht braun	Gelb
Gallenproduktion (24 h nach Reperfusion)	>250 ml	<250 ml	Keine
AST (Maximum in 72 h)	<500 U/l	500-1000 U/l	>1000 U/l
ALT (Maximum in 72 h)	<500 U/l	500-1000 U/l	>1000 U/l
Punkte	4-6	7-9	10-12
<b>Transplantatfunktion</b>	<b>Gut</b>	<b>Mäßig</b>	<b>Schlecht</b>

**Tab. 2: Score für die initiale Transplantatfunktion**

## *2.4. Immunsuppression*

Alle Patienten erhielten entweder eine Triple- oder Quadruple Therapie basierend auf Cyclosporin A (CyA), Azathioprin (AZA) und Prednisolon. 71 Patienten erhielten zusätzlich zu diesem Schema eine Induktionstherapie mit entweder Anti-Lymphozyten Immunglobulin (ALG, Mérieux) oder dem Interleukin 2 Rezeptor Antagonisten BT 563 (Biotest).

Die 24 Patienten, die das ALG als Induktionstherapie erhielten, wurden nach 7 Tagen auf die Triple-Therapie umgestellt. Die 42 Patienten, die zusätzlich mit BT 563 therapiert wurden, erhielten dies für die ersten 12 postoperativen Tage. 12 Patienten erhielten keine Induktionstherapie und wurden sofort gemäß des Triple-Schemas immunsupprimiert.

2 der retransplantierten Patienten wurden vor der Retransplantation auf FK 506 (Prograf, Fujisawa) und Prednisolon umgestellt, da die Retransplantationsindikation auf einer Abstoßungsreaktion beruhte.

Patienten	Immunsuppression	Induktionstherapie
47	CyA, AZA, Prednisolon	BT 563
24	CyA, AZA, Prednisolon	ALG
12	CyA, AZA, Prednisolon	Keine
2	FK 506, Prednisolon	Keine

**Tab. 3: Immunsuppression und Induktionstherapie (n=85)**

Die Dosierung von Cyclosporin A und FK 506 erfolgte individuell nach Blutspiegelkontrollen. Die angestrebten Wirkspiegel liegen bei Cyclosporin A bei 600-800 ng/ml und bei FK 506 bei 10-15 ng/ml.

Da die enterale Resorption von Cyclosporin A und Galle gebunden ist, wurde das Medikament bis zum Abklemmen der T-Drainage i.v. verabreicht. FK 506 kann direkt in seiner oralen Form verabreicht werden. Prednisolon und Azathioprin wurden ebenfalls direkt per os gegeben. Die Induktionstherapeutika ALG und BT 563 wurden nur i.v. appliziert. Die Dosierungen der immunsuppressiven Therapie wurde gemäß dem Schema aus folgender Tabelle vorgenommen.

Immunsuppressivum	Dosierung zu Beginn	Erhaltungsdosis
Cyclosporin A (CyA)	2 x 1-2 mg/kg i.v.	ab POD 5: 2 x 5-7 mg/kg p.o., dann individuell nach Spiegel
Azathioprin (AZA)	1 x 25 mg p.o.	ab POD 7: 1-2 mg/kg, abhängig von den Leukozyten
Prednisolon	1 x 1 mg/kg p.o.	ab POD 4: stufenweise Reduktion
ALG	5 mg/kg i.v.	bis POD 8
BT 563	10 mg i.v. als Perfusor /24h	POD 6-12: 10 mg i.v. über 6 h
FK 506	0,1 – 0,2 mg/kg p.o.	Individuell nach Spiegel

**Tab. 4: Dosierungsschema der Immunsuppressiva**

## 2.5. Diagnostik und Therapie von akuten Abstoßungsreaktionen

Bei klinischem Verdacht auf eine akute Abstoßungsreaktion wurde diese immer mittels Leberbiopsie verifiziert. Als klinische Zeichen einer akuten Abstoßungsreaktion gelten Fieber, eine Erhöhung leberspezifischer Laborparameter (ALT, AST, AP,  $\gamma$ -GT, Bilirubin), sowie bei geöffneter T-Drainage eine Verminderung der Gallesekretion oder Aufhellung der Gallenfarbe.

Histologische Kriterien einer akuten Abstoßungsreaktion wurden gemäß folgender Tabelle angewandt:

Schweregrad	Histologische Kriterien
<b>0</b>	Kein Anhalt für eine akute Abstoßungsreaktion.
<b>I</b>	Geringe periportale mononukleäre Infiltrate, geringe Endothelitis, geringe Gallengangsverletzung, keine Leberzellnekrosen
<b>II</b>	Moderate periportale mononukleäre Infiltrate, die die Membran des Periportalfeldes überschreiten, begrenzte Endothelitis, begrenzte Gallengangsverletzung, Einzelzellnekrosen der Hepatozyten
<b>III</b>	Weitergehende Veränderungen als II und konfluierende Leberzellnekrosen

**Tab. 5: Histologische Einteilung der Abstoßungsreaktionen**

Nach histologischer Sicherung einer akuten Abstoßungsreaktion wurde diese zunächst mit Methylprednisolon 500 mg/d i.v. für 3 Tage therapiert. Kam es unter dieser Medikation nicht zu einer klinischen Besserung des Befundes wurde die Abstoßung als steroid-resistent eingestuft.

Nach erneuter histologischer Sicherung der persistierenden Abstoßungsreaktion wurde in Fällen einer steroid-resistenten Rejektion eine Rescue-Therapie mit FK 506 (0,1-0,2 mg/kg/d p.o.) eingeleitet. In besonders schwerwiegenden Fällen wurde die FK 506-Therapie mit monoklonalen Antikörpern (OKT3, Orthoclone, Cilag)(5 mg/d für 7 Tage) kombiniert.

Bei Patienten, die histologische Zeichen einer geringgradigen Abstoßung in der Routine-Biopsie aufwiesen, jedoch klinisch unauffällig waren, wurde dies nicht als akute Abstoßung interpretiert und auch nicht als solche therapiert.

## *2.6. Prophylaxe, Diagnostik und Therapie von Infektionen*

Bereits nach Indikationsstellung wurde bei allen Patienten schon auf der Warteliste eine selektive Darmdekontamination (SDD) mit SDD3 p.o. (Polymyxin 100 mg, Nystatin 0,5 Mio. IE, Tobramycin 80 mg) durchgeführt. Ausgenommen hiervon waren Patienten mit fulminantem Leberversagen. Nach erfolgter Lebertransplantation wurde SDD3 weiter 4x/d für 3 Wochen gegeben.

Alle Patienten erhielten bis zum 2. postoperativen Tag eine systemische Antibiotikaprophylaxe mit Cefotaxim, Tobramycin und Metronidazol i.v.. Im Anschluss daran wurde die Antibiotikaprophylaxe mit Ciprofloxacin (250 mg/d p.o.) und Cotrimoxazol (3 x 480 mg/Woche p.o.) bis 2 Wochen nach Entlassung aufrechterhalten.

Zusätzlich wurde Acyclovir p.o. für 6 Wochen als Prophylaxe einer Herpes simplex (HSV) Virusinfektion gegeben. Zur Verhinderung einer Zytomegalie-Virusinfektion (CMV) erhielten alle Patienten am 1. und 14. postoperativen Tag CMV-Antikörper (Cytotect, Biotest). CMV negative Patienten denen ein Organ eines CMV positiven Spenders transplantiert wurde, bekamen Cytotect und Gancyclovir 1 x /Woche für 4 Wochen als Standardtherapie.

Als Screening wurden alle Patienten routinemäßig mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Alkaline Phosphatase anti-Alkaline Phosphatase (APAAP) auf CMV-Infektion untersucht. Im Falle einer nachgewiesenen Neuinfektion wurde diese mit Gancyclovir therapiert.

HbsAG positive Patienten erhielten anti-HBs Hyperimmunglobulin (Hepatect, Biotest) bereits intraoperativ und anschließend für 7 Tage. Die weitere Hepatect-Medikation wurde individuell an den anti-HBs-Titer angepaßt.

Zur weiteren Infektionsverhinderung bzw. Früherkennung wurden dreimal pro Woche Routineabstriche von T-Drainage, Rachen, Rektum, Urin und bei Frauen auch aus der Vagina entnommen. Bei positivem Routineabstrich der T-Drainage wurde dies auch ohne klinische Infektzeichen als Cholangitis gewertet und entsprechend therapiert.

Bei unklarem Fieber wurden sofort Blut-, Urin-, Galle- und Sputumkulturen angelegt und die Lunge radiologisch abgeklärt. Bei klinischen oder radiologischen Verdacht auf eine Pneumonie wurde zusätzlich eine diagnostische Bronchoskopie durchgeführt.

Die kalkulierte Initialtherapie wurde mit Imipenem und Vancomycin durchgeführt. Infektionen wurden als schwerwiegend definiert, wenn 2 oder mehr sekundäre Organdysfunktionen oder Organversagen im Rahmen der Infektion auftraten. Dies beinhaltete akutes Nierenversagen (ANV), akute respiratorische Insuffizienz (ARDS), akutes Lebersversagen, katecholaminpflichtige Kreislaufinsuffizienz, disseminierte intravasale Gerinnungsstörung (DIC), Sepsis, systemic inflammatory response syndrom (SIRS), neurologische Symptome sowie eine akute oder chronische Abstoßungsreaktion.

### **3. *Material***

#### **3.1. *Materialgewinnung***

Die Blutentnahmen erfolgten prä-, peri- und postoperativ zu definierten Zeitpunkten. Zusätzlich wurde eine Blutprobe vom Spender asserviert. Die Zeitpunkte der Blutentnahme beim Patienten waren: Operationsbeginn, vor der Hepatektomie, zur Reperfusion des Transplantats, sowie 15 Minuten, 120 Minuten, 6 Stunden, 12 Stunden, 18 Stunden, 24 Stunden, 36 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach Reperfusion. Anschließend wurde einmal täglich (morgens) während des Aufenthaltes des Patienten auf der Transplantationsintensivstation (i.d.R. 2 Wochen) Blut entnommen. In dem Zeitraum, in dem der Patient einen zentralvenösen Katheter (ZVK) hatte, wurde dieser für die Blutentnahmen benutzt. Nach Entfernung des ZVK (ca.3 Tage postop.) wurde eine periphere Vene zu Blutentnahme benutzt.

Zusätzlich zum ZVK wurde den Patienten einen Lebervenenkatheter (LVK) gelegt. Hierzu wurde präoperativ ein Oxymetrie-Katheter (Baxter) über die linke Vena jugularis interna unter Durchleitungskontrolle in eine Lebervene eingebracht. Vor der Hepatektomie wurde der LVK in die Vena cava inferior zurückgezogen. Zur Reperfusion wurde der Katheter manuell vom Operateur wieder in einer Lebervene positioniert. Der LVK verblieb in der Regel für 2 postoperative Tage. In den ersten 48 Stunden wurden alle Blutentnahmen zentralvenös sowie auch lebervenös durchgeführt.

Zur Reperfusion wurde eine weitere Blutprobe direkt vom Operateur aus der Lebervene entnommen. Diese Zeitpunkt bezeichneten wir als „Flush“.

Die heparinisierten Blutproben wurden direkt nach Entnahme auf Eis gekühlt und binnen 30 Minuten für 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde abpipettiert und in verschiedenen Aliquots zu je 250 µl bei  $-80^{\circ}\text{C}$  asserviert.

### 3.2. Labormethoden

Die tiefgefrorenen Blutplasmaproben wurden aufgetaut und TGF- $\beta$ 1 anschließend mittels einem Immunoassays (Quantikine, R&D Systems) quantitativ bestimmt. Das Prinzip der benutzten Meßmethode beruht auf der quantitativen Sandwich Enzym Immunoassay Technik. Hierbei befindet sich TGF- $\beta$  *soluble* Rezeptor Typ II, der TGF $\beta$ 1 bindet, auf dem Boden einer Mikrotiterplatte. Standardproben und Messproben werden in die Mikrotiterplatte pipettiert und vorhandenes TGF- $\beta$ 1 wird von dem immobilisierten Rezeptor gebunden. Nachdem alle ungebundenen Proteine abgewaschen wurden, wird ein TGF- $\beta$ 1 spezifischer *enzyme-linked* polyklonaler Antikörper hinzugefügt, der sich ebenfalls an das während der ersten Inkubation gebundene TGF- $\beta$ 1 bindet. Da der auf der Mikrotiterplatte vorhandene Rezeptor TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3 und TGF $\beta$ 5 mit ähnlichen Affinitäten bindet, wird die TGF- $\beta$ 1-Spezifität der Messung durch den polyklonalen Antikörper gewährleistet. Nachdem die Mikrotiterplatte erneut gewaschen wurde um ungebundene Antikörper-Enzym Reagenzien zu entfernen, wird eine Substratlösung hinzugefügt. Diese bewirkt, dass sich die verschiedenen Mulden der Mikrotiterplatte proportional zur vorhandenen TGF- $\beta$ 1-Menge anfärben. Nach einem definierten Zeitraum wird diese Reaktion durch ein hinzugefügtes Reagenz gestoppt.

Mit Hilfe der Standardproben wird eine Kurve ermittelt, anhand derer man die TGF- $\beta$ 1-Konzentration durch Messung der optischen Dichte bestimmen kann (38, 39).

### 3.3. Dokumentation

Alle ermittelten Messdaten wurden in einer Computer-Datenbank gespeichert. Zusätzlich wurden bei jedem Patienten anamnestische, operative und postoperative Daten erhoben und in die Datenbank aufgenommen.

Die anamnestischen Daten waren neben Alter, Größe, Gewicht, etc. des Patienten, die für die Transplantation ursächliche Lebererkrankung sowie evtl. bestehende Begleiterkrankungen. Zusätzlich wurde das Leberzirrhose-Stadium anhand der CHILD-Klassifikation ermittelt.

Die operativen Daten umfassten die Operationsdauer, die Ischämiezeiten der Spenderorgane, den intraoperativen Blutverlust sowie die Anzahl der intraoperativ benötigten Erythrozytenkonzentrate (EK) und Menge des substituierten Plasmas (FFP).

Ebenfalls wurden die Spenderdaten gemäß des Eurotransplant-Begleitscheines erfasst.

Postoperativ wurden, während des Aufenthaltes des Patienten auf der Intensivstation, alle routinemäßigen Laborparameter, sowie die Menge der täglichen Diurese, der Katecholaminbedarf und die Menge eventuell verabreichter Diuretika erfasst. Ebenfalls wurde bis zum Abklemmen der T-Drainage die Menge der täglich produzierten Galle erfasst. Im Falle einer Abstoßungsreaktion oder einer Infektion wurden die histologischen bzw. infektiologischen Ergebnisse dokumentiert.

Nach Verlegung des Patienten auf Normalstation wurden bis zur Entlassung nur noch die routinemäßig erhobenen Daten dokumentiert.

#### **4. Statistik**

Kaplan-Meier-Analysen, Wilcoxon-, Chi-Quadrat und Kruskal-Wallis-Tests, sowie Varianz-Analysen (One-Way-ANOVA und Multivarianz-Analyse) wurden ihrer Funktion entsprechend durchgeführt. Lineare Regressions-Analysen dienten zur Korrelation der untersuchten Parameter mit der Inzidenz sowie der Schwere von akuten Abstoßungen. Zur Untersuchung des Einflusses sowie der Abgrenzung von schweren Abstoßungen und Infektionen auf den jeweiligen Parameter wurden Multivarianz-Analysen durchgeführt.