

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

DISSERTATION

„Transplantatkonditionierung durch die Vortherapie der
hirntoten Organspender mit Methylprednisolon (Urbason®)“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Wladimir Faber

aus Leningrad

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Praschke
 2. Priv.-Doz. Dr. K. Kotsch
 3. Prof. Dr. med. R. J. Ploeg

Datum der Promotion: 20.11.2009

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

1. Einführung
2. Geschichte der allogenen Lebertransplantation
3. Einflussfaktoren auf die allogene Transplantation
 - 3.1. Unspezifische Faktoren
 - 3.2. Major Histocompatibility Complex
 - 3.3. Ischämie und Reperfusion
 - 3.4. Hämodynamische Einflussfaktoren
 - 3.5. Hirntod
 - 3.5.1. Vorgeschichte
 - 3.5.2. Definition und Diagnose des Hirntodes
 - 3.5.3. Hämodynamische Veränderungen
 - 3.5.4. Endokrines System und Metabolismus
 - 3.5.5. Periphere immunologische Prozesse
4. Fragestellung

B. Material und Methoden

1. Organisation
2. Patientenkollektiv
 - 2.1. Organspender
 - 2.1.1. Gruppeneinteilung, Gruppenumfang
 - 2.1.2. Alter und Geschlecht der Organspender
 - 2.1.3. Todesursachen der Organspender
 - 2.1.4. Weitere Charakteristiken der Organspender
 - 2.2. Organempfänger
3. Lebertransplantation
 - 3.1. Organentnahme bei hirntoten Spendern
 - 3.2. Hepatektomie
 - 3.3. Präparation der Spenderleber
 - 3.4. Empfänger-Hepatektomie
 - 3.5. Transplantation der Spenderleber
4. Zeitpunkte und Gewinnung von Proben
 - 4.1. Zeitpunkte und Gewinnung von Serumproben

- 4.2. Zeitpunkte und Gewinnung von Leberbiopsien
 5. Parameter zum Nachweis der immunologischen Organaktivierung
 6. TaqMan-Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Genexpression
 - 6.1. Isolierung der Ribonukleinsäure
 - 6.2. Ribonukleinsäure-Bestimmung
 - 6.3. DNase Behandlung
 - 6.4. Reverse Transkriptase Reaktion
 - 6.5. TaqMan-Real-Time-PCR
 7. Cytometric Bread Array System, BD Biosciences
 - 7.1. Flow-Zytometrie
 - 7.2. Enzyme Linkend Immunosorbent Assay
 - 7.3. Immulite®-System
 8. Statistische Analysen
- C. Ergebnisse
1. Expression von inflammatorischen Faktoren in den Leberbiopsien
 - 1.1. Expression von Tumor-Nekrose-Faktor- α
 - 1.2. Expression von Cluster of Differentiation
 - 1.2.1. Cluster of Differentiation 54
 - 1.2.2. Cluster of Differentiation 68
 - 1.2.3. Cluster of Differentiation 80
 - 1.2.4. Fatty Acid Synthetase Ligand
 - 1.3. Expression von MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A
 - 1.4. Expression von Humanem Leukozytenantigen DRB
 - 1.5. Expression von Interferon-Protein-10
 2. Expression der Zytokine im Serum
 - 2.1. Interleukin-2
 - 2.2. Interleukin-6
 - 2.3. Tumor-Nekrose-Faktor- α
 - 2.4. Monocyte-Chemotactic-Protein-1
 - 2.5. Interferon-Protein-10
 3. Serumkonzentration von Kortisol
 4. Klinisch-chemische Parameter im postoperativen Verlauf
 - 4.1. Aspartat-Aminotransferase
 - 4.2. Bilirubin

5. Ischemic Type Biliary Lesions und Rejektion

D. Diskussion

1. Expression der Zytokine in den peripheren Organen
2. Systemische Inflammation
3. Einfluss der Kortikosteroidtherapie auf die initiale Transplantatfunktion
4. Einfluss der Kortikosteroidtherapie auf die Rate von Ischemic Type Bile Lesions
5. Einfluss der Kortikosteroidtherapie auf die Rejektionsrate

E. Zusammenfassung

F. Literaturverzeichnis

G. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis
2. Danksagung
3. Publikationen
4. Lebenslauf
5. Selbstständigkeitserklärung

A Einleitung

1. Einführung

In den letzten Jahren hat sich die Organtransplantation zu einer Therapiealternative bei finalem Organversagen entwickelt. Durch die fortschreitende Verbesserung und Weiterentwicklung der technischen und pharmakologischen Möglichkeiten gewinnt diese Therapieoption immer mehr an Bedeutung. Durch die Anwendung dieser Therapie ist es möglich, bei einer guten Patientencompliance trotz des irreversiblen Ausfalls der entsprechenden Organe eine hohe Lebensqualität zu erhalten. Heutzutage ist es möglich, Leber, Niere, Herz, Lunge, Pankreas und Dünndarm in den sich darauf spezialisierten Zentren erfolgreich zu transplantieren. Jedoch ist es derzeit wegen Mangel an Spenderorganen nicht möglich, jedem Bedürftigen eine derartige Therapie anzubieten. Die von der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) sowie von Eurotransplat (ET) geführten Statistiken zeigen eine deutliche Diskrepanz zwischen dem Bedarf an den Organen und den tatsächlich durchgeführten Transplantationen (1,2).

Organ\Jahr	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Niere	2326	2516	2479	2712	2776	2320	2167
Herz	395	393	398	396	412	377	369
Leber	758	855	881	976	1063	1042	1007
Lunge	198	212	240	262	253	264	265
Pankreas	163	191	187	165	141	131	127
Dünndarm	4	8	3	2	1	6	10
Gesamt	3844	4175	4188	4513	4646	4140	3945

Tabelle 1: Organtransplantationen in Deutschland einschließlich Lebendspende-Transplantationen (1).

Wenn man die Statistiken über mehrere Jahre verfolgt, zeigt sich, dass die Menge der zur Verfügung stehenden Spenderorgane leicht abnimmt und den deutlich ansteigenden Bedarf an Organen nicht decken kann (Tab. 1 und Tab. 2).

Organ\Jahr	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Niere	9623	9479	9270	8853	8473	8207	8003
Herz	359	473	613	766	822	839	873
Leber	994	1266	1525	1623	1855	1940	1944
Lunge	347	397	457	492	538	594	593
Pankreas	180	145	158	169	190	247	263
Gesamt	11503	11760	12023	11903	11878	11827	11676

Tabelle 2: Warteliste für Deutschland (2).

2. Geschichte der allogenen Lebertransplantation

Die Idee der Organtransplantation ist sehr alt, ihre Ursprünge reichen bis in die antike Welt: bereits dort findet man die Idee der Transformation eines Körperteils in ein anderes. So gibt es zum Beispiel in der griechischen Mythologie viele Kreaturen, die Teile eines anderen Körpers aufweisen wie Pegasus oder die Gorgone Medusa (3). Ein weiteres Beispiel stellt Chimera in der Odyssee von Homer dar, deren einzelne Körperteile der Ziege, dem Löwen und dem Drachen entstammten (4).

Aus dem Mittelalter gibt es ebenfalls viele Überlieferungen über eine Reimplantation abgehackter Gliedmaßen durch Heilige. Ein Beispiel dafür ist der heilige Mark, der einem Soldaten seine bei Kampfhandlungen abgehackte Hand reimplantierte (3).

Erst am Ende des 19. Jahrhunderts begann der Traum der Organtransplantation reelle Gestalt anzunehmen. Am Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Technik der Gefäßanastomosen entwickelt. Dieser Entwicklungsschritt ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Transplantation vaskularisierter Organe und wird als erster Schritt in der Entwicklung der Transplantationsverfahren angesehen. Als Erfinder dieser Techniken gilt Alexis Carrel, der diese Technik bei experimentellen Transplantationen von Extremitäten, Leber, Herz, Ovar und Schilddrüse anwendete (5). Im Jahre 1912 bekam er den Nobelpreis (6,7).

Technisch gesehen war es eigentlich seit Anfang des 20. Jahrhunderts möglich, vaskularisierte Organe zu transplantieren. Problematisch war das Verständnis für die nach einigen Tagen nach der Transplantation einsetzende Destruktion und Zerstörung der transplantierten Organe. Verständnis dieser Prozesse dauerte Jahrzehnte und war ein steiniger Weg (6).

Im Jahre 1943 beschrieb Padgett eine Serie von Auto- und Allotransplantationen der Haut, bei denen es sich zeigte, dass nur Auto- und nicht Allotransplantate regulär heilten und überlebten (8). Er vermutete zwar eine genetische Grundlage, ein Nachweis seiner Vermutungen gelang ihm

jedoch nicht (9). Im Jahre 1952 beobachtete Dausset unter Mikroskop, dass mehrfach transfundierte Patienten Antikörper entwickelten, die Leukozyten der Blutspender agglutinierten, nicht hingegen die körpereigenen Leukozyten (10). Etwa zur gleichen Zeit machte Snell bei der Verpflanzung von Tumoren zwischen verschiedenen Mäusen die Beobachtung, dass die Tumore nach der Verpflanzung zwischen nicht verwandten Mäusen abgestoßen wurden. Bei der Tumorverpflanzung zwischen verwandten Mäusen trat dieses Phänomen jedoch nicht auf. Auf dieser Grundlage konnte er zusammen mit Gorer das Major Histokompatibilitäts Komplex (MHC) beschreiben. 1980 bekam Snell für die Arbeit auf diesem Gebiet den Nobelpreis (Gorer verstarb vorher) (6).

Am 23. Dezember 1954 transplantierte Joseph Murray im Peter Bent Brigham Hospital in Boston eine Niere zwischen zwei eineiigen Zwillingen. Das Transplantat wurde heterotop in den Bauchraum implantiert und nahm sofort seine Funktion auf. Anschließend kam es beim Empfänger zur Urämieremission. Neun Jahre später erlag der Empfänger einem Herzinfarkt. Diese erste erfolgreiche Nierenverpflanzung stellte einen Durchbruch in der Transplantationsgeschichte dar (11).

In den späteren Jahren folgten weitere Organtransplantationen. Am 12. Juli 1963 transplantierten W. R. Webb und J. D. Hardy eine Lunge. Der Empfänger verstarb am 18. postoperativen Tag an Nierenversagen. Die transplantierte Lunge wies nur minimale Rejektion auf (12,13). Am 23. Januar 1964 transplantierte J. D. Hardy einem Empfänger mit einer terminalen hypertensiven Herzinsuffizienz in orthotroper Technik von Lower, Stofer und Shumway ein Schimpansenherz. Das Organ funktionierte 90 Minuten lang nach Wiedererwärmung und Defibrillation (13). Im Zeitraum von 1967 bis 1968 transplantierte Starzl in Pittsburgh sieben Empfängern mit terminalem Leberversagen neue Organe. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung im Jahre 1968 waren noch drei Transplantate intakt. Er berichtete ebenfalls von den ersten Lebertransplantationen von Lebendspendern (14). Im Jahre 1984 transplantierte H. Bismuth zum ersten Mal eine Teilleber. Der Empfänger war ein Kind (15). Im Jahre 1988 erfolgte die erste Splittlebertransplantation, sowohl in Hannover als auch in Paris (16,17).

Um eine langfristige Funktionalität der transplantierten Organe zu gewährleisten, war es notwendig, auch an Medikamenten zu arbeiten, die die Transplantatabstoßung mindern. So berichteten im Jahre 1959 Schwartz und Dameshek von Tuft University in Boston, dass 6-Merkaptopurin die Antikörperbildung bei Kaninchen unterdrücke (18). Caln und Murray konnten mit Hilfe von Azathioprin, einem 6-Merkaptopurinabkömmling, das Überleben der Transplantate wesentlich verlängern (3,19). Die Kombinationstherapie aus Azathioprin und

Kortison bildete die nächsten Jahrzehnte die Stütze der immunsuppressiven Therapie in der Transplantation.

Eine weitere große Entdeckung auf diesem Feld stellte Cyclosporin A dar. Der vom Pilz *Tolypocladium inflatum* gewonnene Wirkstoff, untersucht von Jean Borel in Basel, hemmt die IL-2 Produktion von T-Helferzellen. Calne verwendete den Wirkstoff an der Universität von Cambridge 1979 erfolgreich bei 34 Empfängern 36 verschiedener Organe (32 Nieren, 2 Lebern, 2 Pankreata) hirntoter Spender (20).

3. Einflussfaktoren auf die allogene Transplantation

3.1. Unspezifische Einflussfaktoren

Einige unspezifische antigenunabhängige Risikofaktoren sind bestimmte Spendereigenschaften wie zum Beispiel das Alter vom Spender, ein längerer Krankenhausaufenthalt oder ein hoher Bilirubinspiegel desselben (21,22). Das Geschlecht, die Rasse und die Todesursache sind insbesondere bei der Nierentransplantation von Bedeutung, bei der Herztransplantation hingegen scheint die Todesursache besondere Bedeutung zu haben (22,23).

3.2. Major Histocompatibility Complex

Der entscheidende antigenabhängige Faktor ist der Major Histocompatibility Complex (MHC) mit 30 verschiedenen Genloci. Auf dem Chromosom 6 verschlüsselt der MHC-Komplex zwei Gruppen von sehr polymorphen Molekülen der Zelloberfläche: MHC-Klasse I und MHC-Klasse II (24). Sie präsentieren Antigene in einer für die T-Zellen erkennbaren Form. Diese Histokompatibilitätsantigene induzieren beim Empfänger als Alloantigene die Rejektion (24,25). Dieses MHC- (bzw. HLA-)-System ist die führende Determinante des Empfängers im Prozess der Rejektion. Die Selektion von Spendern und Empfängern nach HLA-Kompatibilität verbessert die Transplantatfunktion (26).

3.3. Ischämie und Reperfusion

Für die Transplantation vaskularisierter Organe ist aus technischen Gründen die Blutzufuhrunterbrechung notwendig. Daraus ergibt sich eine Sauerstoffdeprivation sowie eine Reoxygenation der Organe bei der Reperfusion. Das verursacht eine zusätzliche Schädigung der Organe (27). Im Verlauf der Transplantation, der zeitgleich die Entnahme, Konservierung und Revaskularisation der Transplantate einschließt, löst die Blutzufuhrunterbrechung ein komplexes pathophysiologisches Geschehen mit Beteiligung zahlreicher Zellen und Moleküle aus. Es werden entzündliche Mediatoren sezerniert und Zellinfiltrationen ausgelöst (28,29).

3.4. Hämodynamische Einflussfaktoren

Jeder operativer Eingriff hat Auswirkungen auf den Kreislauf und die Hämodynamik. Im Rahmen der dem Hirntod vorausgehenden intrazerebralen Drucksteigerung beobachtet man zunächst eine arterielle Hypertonie. Mit dem Eintreten des Hirntodes tritt bei nahezu jedem Organspender die arterielle Hypotonie und ein Abfall des Herzzeitvolumens auf (30,31). Die Ursache liegt im Wegfall des zerebralen Tonus des Sympathikus. Hinzu kommen die Störungen der myokardialen Funktionen aufgrund der Funktionsstörungen des kontraktiven Apparates und der Beeinträchtigung der β -adrenergen Signalübertragung (32,33). Für eine gute Transplantatfunktion ist jedoch ein ausreichender Perfusionsdruck der Spenderorgane von großer Bedeutung (34).

3.5. Hirntod

In den letzten Jahren zeigte sich zunehmend, dass der Hirntod des Organspenders ebenfalls einen wichtigen Risikofaktor für die Transplantate darstellt (35). In dem folgenden Abschnitt wird auf den Hirntod näher eingegangen.

3.5.1. Vorgeschichte

Ende der 50er-Jahre haben französische Neurologen Patienten beschrieben, bei denen zwar kardiale und pulmonale Funktionen mit Maschinen erhalten werden konnten, das Gehirn jedoch irreversibel geschädigt war und keine Funktionen mehr aufwies. Morallet und Goulon bezeichneten diesen Zustand als „Coma Dépassé“ (36).

Diese Beschreibungen brachten eine problematische Frage mit sich: Kann der Gehirntod vor dem Herztod stattfinden? Diese Frage löste eine kontroverse Diskussion aus, da sie medizinisch, ethisch und juristisch ein Problem darstellte.

In August 1968 wurden in den USA die Harvard-Kriterien veröffentlicht. Das Komitee der Universität, das aus Experten unterschiedlicher Fachrichtungen bestand, konnte sich einig werden, dass der Begriff „Erlöschen der vitalen Funktionen“ durch den Begriff „irreversibles Koma“ als Kriterium zur Feststellung des Todes eines Menschen ersetzt werden kann und ersetzt werden muss (37). In Deutschland wurden im Jahre 1982 die ersten Entscheidungshilfen zur Feststellung des Hirntodes von dem wissenschaftlichen Beirat der Ärztekammer formuliert. 1997 wurde unter Berücksichtigung des technischen Fortschritts die dritte Fortschreibung veröffentlicht (38).

3.5.2. Definition und Diagnose des Hirntodes

DEFINITION: Der Zustand der irreversibel erloschenen Gesamtfunktion des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstammes wird als Hirntod bezeichnet. Die Herz- und Kreislauffunktion kann dabei durch die kontrollierte Beatmung aufrechterhalten werden.

Die Diagnose erfordert die Erfüllung folgender Voraussetzungen:

- Vorliegen einer akuten schweren (primären oder sekundären) Hirnschädigung
- Ausschluss von Intoxikation, medikamentöser Sedierung, neuromuskulärer Blockade, primärer Unterkühlung, Kreislaufschock, Koma bei endokriner, metabolischer oder entzündlicher Erkrankung als Ursache oder Mitursache des Ausfalls der Hirnfunktion.
- Feststellung der klinischen Symptome Bewusstlosigkeit, Hirnstammreflexie, Atemstillstand.
- Nachweis der Irreversibilität der klinischen Ausfallssymptome (39).

Hirntod bedeutet den irreversiblen Verlust der integrierten neurologischen Funktionen. Damit fällt mit dem Hirntod die Steuerung von Organismus aus. So stellt der Hirntod einen protrahierten irreversiblen Untergang der Organe und der Zellen dar und soll nicht als plötzlicher Tod des ganzen Organismus verstanden werden (40). Es ist denkbar, dass bei der Feststellung des Hirntodes von zwei unabhängigen Ärzten noch vitale Reste der neurologischen Gewebe vorhanden sind, die jedoch nicht imstande sind, das Bewusstsein oder die Atemfähigkeit wiederherzustellen. Dieses Restgewebe stirbt mit der Zeit ab (41).

Die häufigsten Ursachen des Hirntodes stellen gegenwärtig die Kopfverletzungen mit der daraus resultierenden intrakraniellen Blutung und/oder Schwellung sowie die ischämischen oder hämorrhagischen Insulte dar (42). Diese Ursachen rufen einen Masseneffekt auf das Gehirn hervor, was zu dessen Kompression führt und demzufolge eine venöse Stauung hervorruft. Zusätzlich kommt es zur Hirnstammkompression und deren Einklemmung im Foramen magnum. Das verursacht Atemstillstand und Kompression von Arterien im Hirngewebe und an der Basis und führt zum Infarkt des gesamten Gehirns. Je mehr das Gehirn anschwillt, desto stärker ist die Beeinträchtigung der Blutzirkulation. Wenn die Blutzirkulation über mehrere Minuten sistiert, verhindert das „no reflow“-Phänomen die Wiederaufnahme der Blutzirkulation (43).

Die Lazarus-Zeichen, die komplexe Extremitätenbewegungen darstellen und bei 30 bis 70 Prozent der hirntoten Patienten beobachtet werden, sowie atemähnliche Exkursionen haben offensichtlich einen spinalen Ursprung (44).

Ab dem Zeitpunkt des Hirntodes treten metabolische und hämodynamische Veränderungen sowie Störungen im Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt auf (45). Auf diese Veränderungen wird in dem nächsten Abschnitt näher eingegangen.

3.5.3. Hämodynamische Veränderungen

Nach einer kurzen parasympathisch dominierenden Phase mit Bradykardie tritt eine massive sympathische Aktivität auf, das als „autonomic storm“ bezeichnet wird. Es erfolgt die Freisetzung von Katecholaminen aus Nervenenden und adrenergen Drüsen, was zu einem erhöhten Katecholaminspiegel im Serum führt. Somit sind die zu transplantierenden Organe einer massiven sympathischen Stimulation ausgesetzt (46). Der massiven sympathischen Stimulation liegt die zerebrale Ischämie und Einklemmung des Hirnstammes zugrunde. Die massive Ausschüttung der Katecholamine, gekoppelt an den Hirntod, wurde tierexperimentell belegt (47,48). Eine deutliche Blutdrucksteigerung mit gleichzeitiger Vasokonstriktion wurde ebenfalls beschrieben (47). Die Kombination aus der Hypertonie und dem gesteigerten peripheren Widerstand ergibt eine Verminderung der Organperfusion und führt zur Ischämie der betroffenen Organe (49). Zusätzlich ist für den „autonomic storm“ ein steigender zytosolischer Kalziumspiegel typisch, der zur Aktivierung der Lipasen, Proteasen, Endonukleasen, Nitratoxid-Synthase, Adenosindesaminase und Xanthinoxidase führt. Das unterbricht wiederum die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP) durch die Adenosindysaminase. Die Xanthinoxidase synthetisiert die zytotoxischen freien Radikale (46). Diese Effekte schaden den Organen und begünstigen späteres Organversagen.

Im weiteren Verlauf sinkt der Sympathikus-Spiegel sowie der kardiale Output. Es folgt eine hypotensive Phase, die zur Hypoperfusion der peripheren Organe führt (41,50,51). Somit bleibt die Versorgung der peripheren Organe mit Blut und Sauerstoff bei der inadäquaten vaskulären Regulation weiterhin gestört.

Die beiden Phasen der hämodynamischen Veränderung verursachen eine ischämische Gefährdung der peripheren Organe (52).

3.5.4. Endokrines System und Metabolismus

Bei Eintreten des Hirntodes treten zahlreiche endokrinologische Prozesse auf.

Die Verbindung zwischen dem Hirntod und dem Versagen der Hypothalamus-Hypophyse-Achse gilt inzwischen als erwiesen (53-55). Allerdings gibt es Abweichungen zwischen den existierenden Erkenntnissen über die endokrine Funktion nach dem Hirntod bei Menschen und Tieren (31,56). Es gibt ebenfalls Daten, die besagen, dass bei Menschen der Abfall von Triiodthyronin (T3) im Donorblut fast immer zu finden sei, wogegen bei anderen Hormonen, z.B. Kortison, es von Fall zu Fall unterschiedlich sei (57-59).

Der Abfall der Konzentration des antidiuretischen Hormons (ADH) verursacht den neurogenen Diabetes insipidus (60,61). Ein erniedrigter T3-Plasmaspiegel beeinträchtigt die mitochondriale

Energieproduktion mit negativen Folgen für die Zellen (62). Dieser Effekt kann jedoch durch eine gute Regulation des Hormonhaushaltes erfolgreich gestoppt werden (31). Über den Abfall weiterer Hormone wie Kortisol und Insulin gibt es unterschiedliche Angaben. Die Regulation dieser Hormone wird ebenfalls empfohlen (31,56).

Hervorgerufen durch den Anstieg der Katecholamine, den gestörten Haushalt anderer Hormone und der gestörten Hämodynamik entsteht eine metabolische „Verwirrung“. Das führt zur Verschiebung vom aeroben Metabolismus zum anaeroben Metabolismus. Das führt zur Entleerung der Energiespeicher, was zum Anstieg der Laktatazidose führt (48,63). Wie bereits erwähnt, kann in dieser Situation die Freisetzung der destruktiven Enzyme mit zytotoxischen Folgen für Organe erfolgen (s. Kap. A, Abschnitt 3.5.3).

3.5.5. Periphere immunologische Prozesse

Beim Auftreten des Hirntodes werden auch inflammatorische und immunologische Prozesse in Gang gesetzt. Die Zytokine bilden ein extrazelluläres Signalsystem für die Steuerung und Kontrolle der angeborenen und der spezifischen Immunantwort (64).

Schon seit einigen Jahren hatte man eine höhere Zytokinexpression in den Organen der verstorbenen Spender im Vergleich zu den Organen der lebenden Spender vermutet. Bekräftigt wurde diese Vermutung durch die klinischen Beobachtungen hinsichtlich der Abstoßungsreaktion, der Kurz- und Langzeitfunktion der Transplantate, der initialen Transplantatfunktion sowie dem Outcome der Patienten. Die Transplantationen von lebenden, nicht verwandten Spendern gegenüber den Transplantationen der hirntoten Spender wiesen durchgehend bessere Ergebnisse auf (65-68).

Die bereits in den 80er-Jahren durchgeführten Untersuchungen zur Auswirkung des Hirntodes auf die Transplantatfunktion zeigten eine signifikant reduzierte Sofortfunktion von Organen der hirntoten Spender im Vergleich zu den Organen der lebenden Spender (46,69-71). Diese Beobachtungen führte man auf die metabolischen und hormonellen Entgleisungen, sowie auf die Veränderungen, die als „autonomic storm“ zusammengefasst werden, zurück. Dazu zählen massive Blutdruckschwankungen, Koagulopathien und Elektrolytentgleisungen (31,72-75).

Tierexperimentell zeigte sich nach der Hirntodherbeiführung der Konzentrationsanstieg der proinflammatorischen Zytokine im Serum und in den peripheren Organen, insbesondere von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) (52,75).

Die Erhöhung der Immunogenität in den peripheren Organen nach dem Hirntod wurde zum ersten Mal von Tilney et al. beschrieben. Hierbei wurde nach einer explosiven Hirntodinduktion bei Ratten eine massive immunologische Aktivierung im Gewebe der peripheren Organe

beobachtet. Demzufolge sind die Transplantate von hirntoten Spendern schon zum Zeitpunkt der Organentnahme immunologisch aktiviert (65,74-76). Zusätzlich zeigte sich, dass eine schnelle, explosive Hirntodinduktion deutlichere morphologische Veränderungen als nach langsamer gradueller Induktion erzeugt (77).

Pratschke et al. etablierten das Modell der graduellen, langsamen Hirntodinduktion in Ratten, sodass die dabei beobachteten proinflammatorischen Veränderungen in den Organen hirntoter Spender primär auf die mit dem Hirntod assoziierten Veränderungen und nicht auf die auf der systemischen Hypotension basierenden inflammatorischen Veränderungen zurückzuführen waren (78). Auch in den Untersuchungen mit diesem Modell fand sich eine massive Expression der proinflammatorischen Zytokine und der korrespondierenden Proteine nach der Hirntodinduktion (52,74,75,79). Die Steigerung der Immunogenität des potentiellen Transplantates basiert hierbei auf den hormonellen Veränderungen, auf der direkt durch Katecholamin vermittelten Toxizität und auf einer früh einsetzenden und lang anhaltenden Mikrozirkulationsstörung in den peripheren Organen (80). Der gleichen Arbeitsgruppe ist es im Jahre 2007 gelungen, eine deutlich höhere Zytokinexpression in den Organen der verstorbenen Spender im Vergleich zu den Organen der lebenden Spender bei humaner Lebertransplantation zu belegen (81). In dem folgenden Abschnitt wird auf die einzelnen Zytokine näher eingegangen.

Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) ist ein aus 133 Aminosäuren (15.4 kDa) bestehendes Protein. IL-2 wird hauptsächlich von den T-Zellen sezerniert, die nach der Aktivierung das Antigen Cluster of Differentiation 4 (CD4) und Cluster of Differentiation 8 (CD8) exprimieren. Die ruhenden Zellen sezernieren IL-2 nicht. In vitro wird die Synthese von IL-2 durch Cyclosporin A gehemmt. Die transformierten T-Zellen und B-Zellen, Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK-Zellen) sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sezernieren ebenfalls IL-2 (82,83).

Die Menge der Synthese von IL-2 durch die aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten bestimmt das Ausmaß der T-Zell-abhängigen Immunantwort. Ferner fördert IL-2 die Synthese anderer Zytokine (z.B. IL-1, IFN- γ , TNF) und bewirkt die Proliferation und Aktivierung von NK-Zellen. So wird die Zytotoxizität der NK-Zellen erhöht und deren Transformation zu den LAK-Zellen stimuliert. Auf die B-Lymphozyten wirkt IL-2 als Proliferationsfaktor und als Stimulus für die Antikörperbildung (84,85).

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein proinflammatorisches Protein, bestehend aus 185 Aminosäuren, die an den Positionen 73 and 172 glycosyliert sind. IL-6 wird von T-Zellen, mononukleären Phagozyten, Gefäßendothelzellen, Fibroblasten und anderen Zellen sezerniert. Physiologische

Stimuli für die Synthese von IL-6 sind z.B. IL-1, bakterielle Endotoxine und TNF. IL-6 führt zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen und fördert die Differenzierung von B-Zellen. IL-6 induziert die letzte Reifung der B-Zelle in die Immunglobulin sezernierende Plasmazelle und ist ein früher Marker für Zellschäden durch systemische Proinflammation (84,85).

Tumor-Nekrose-Faktor- α

Die Hauptfunktion von TNF- α ist die Abwehr der gramnegativen Bakterien. Die Lipopolysaccharide (LPS) der bakteriellen Zellwand führen zur Sekretion des TNF- α , insbesondere von den LPS-aktivierten mononukleären Phagozyten, den antigenstimulierten T-Zellen, aktivierten Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und aktivierten Mastzellen. Die Wirkung von TNF- α erfolgt über die Bindung des löslichen Trimers an den Rezeptoren der Zelloberfläche und ist von der Konzentration des Zytokins abhängig. Geringe Konzentrationen (10^{-9} M) erzeugen lokale Entzündungen mit erhöhter Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Aktivierung von Leukozyten und Neutrophilen, Stimulation von mononukleären Phagozyten und anderen Zelltypen. Bei höheren Konzentrationen dringt TNF- α in die Blutbahn ein und erzeugt eine systemische Wirkung. In sehr hohen Konzentrationen führt TNF- α zum klinischen Bild eines septischen Schocks. Interferon- γ (IFN- γ) verstärkt viele Wirkungen von TNF- α durch die Erhöhung der Anzahl von TNF-Rezeptoren (84,85).

Interferon-Protein-10

Interferon Protein-10 (IP-10) gehört zur Familie der Chemokine CXC. IP-10 wird von einigen Zellen (Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen) als Antwort auf IFN- γ sezerniert (86). Die Gene für das IP-10 befinden sich auf dem Chromosom 4 mit einigen anderen Genen der CXC-Familie (87). Es wurden folgende Eigenschaften dieses Proteins beschrieben: Förderung von Chemotaxis der Monozyten und der T-Zellen, Unterstützung der Adhäsion der T-Zellen an den Endothelzellen, Antitumoraktivität, Hemmen der Knochenmark-Kolonien sowie Angiogenese (88,89). Der chemotaktische Effekt wird durch die Bindung am chemokinen Rezeptor CXCR3 erreicht (90). Die erhöhte IP-10 Expression wurde als Risikofaktor für eine akute Rejektion bei Nierentransplantaten beschrieben (91).

Monocyte-Chemotactic-Protein-1

Für die zelluläre Immunantwort ist die gesteuerte Leukozytenmigration sehr wichtig. Diese wird durch die Chemokine (chemotaktische Zytokine) gesteuert (92). Monocyte-Chemotactic-Protein-1 (MCP-1) gehört zur Familie der CC-Chemokine und ist wie die anderen Mitglieder der CC-Chemokine-Familie auf dem Chromosom 17 lokalisiert (93). Seine Wirkung entfaltet MCP-1 durch die Bindung am CC-Chemokine-Rezeptor-2 (CCR-2) (94). MCP-1 ruft die Chemotaxis

bei den Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten hervor. Seine Expression wird unter anderem durch den oxidativen Stress und durch Zytokine erhöht (95).

Cluster of Differentiation 54

Cluster of Differentiation 54 (CD54) ist in geringen Konzentrationen immer an den Zellmembranen der Leukozyten und der Endothelzellen präsent. Durch die Zytokinstimulation (IL-1, TNF- α) wird die Konzentration von CD54 erheblich erhöht. CD54 spielt eine wichtige Rolle in der Adhäsion sowie in der Migration der Leukozyten zu den Inflammationsgebieten. CD54 existiert sowohl membrangebunden als auch in freier Form. Die freie Form konnte im Blutserum und im cerebrospinalen Liquor im Falle einer Infektion oder einer autoimmunen sowie einer proliferativen Erkrankung nachgewiesen werden (96). Die mangelhafte Expression von CD54 bei den Knock-out Mäusern führt zu einer deutlichen Abweichung von der Immunantwort (97).

Cluster of Differentiation 68

Cluster of Differentiation 68 (CD68) ist ein 110 kDa-schweres, O-glykosiertes Membranprotein (98). Es wird in erster Linie an den Monozyten und Makrophagen exprimiert und dient als deren klassischer Marker (99,100). Seine Funktion ist in diesen Zellen unbekannt. Es wird postuliert, dass CD68 in der Zelladhäsion und in der Antigenpräsentation beteiligt ist (101).

Cluster of Differentiation 80

Cluster of Differentiation (CD80) fungiert als Ligand für CD28 an den aktivierten B-Zellen. CD80 ist ein wichtiger Kostimulator der ruhenden T-Zellen. Seine Interaktion mit CTLA-4 an kürzlich aktivierten Zellen kann die Antwort der T-Zellen drosseln (102,103). Takada et al. beschrieben einen signifikanten Anstieg der Expression von CD80 in dem Nierenendothel am Rattenmodell, hervorgerufen durch den Hirntod (75).

Fatty Acid Synthetase Ligand

Fatty Acid Synthetase Ligand (FasL), das zur Familie der TNF gehört, ist ein Protein von 31 kDa (104). Die Bindung von FasL am Fas-Rezeptor führt zur Dimerisierung der Zelltoddomäne (Death Domain, DD). Das führt zur Bindung von Fas-Associated Protein mit Death Domain FADD, die sich an der Death Domain des Fas-Rezeptors befindet (105). Nach der Bindung von FADD an der Death Domain bindet FADD die Kaspase-8 und die Kaspase-10. Der so entstandene Komplex wird Death Inducing Signaling Complex (DISC) genannt und aktiviert die den Zelltod herbeiführenden Kaspasen, z.B. die Kaspase-3 (106,107).

Humanes Leukozytenantigen HLA-DRB

Die menschlichen humanen Leukozytenantigene HLA-DRB des Major Histocompatibility Complex (MHC) befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 in der Region der HLA Klasse II des MHC-Komplexes (108).

Mithilfe des HLA Klasse II Komplexes erfolgt die Antigenpräsentation durch die antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie B-Lymphozyten, Makrophagen und aktivierte T-Lymphozyten (109). Jeder HLA Klasse II Komplex besteht aus einer α - und einer β -Kette, die miteinander nicht kovalent verbunden sind (110). HLA-DRB kodiert die β -Kette für den HLA Klasse II Komplex. In der heutigen Nomenklatur werden mehrere verschiedene Loci von HLA-DRB beschrieben (111,112).

Der Einfluss des HLA Klasse II Komplexes auf eine Immunantwort hängt nicht nur von der Antigenpräsentation ab, sondern auch von dem Expressionsgrad des Komplexes und demzufolge von dem Expressionsgrad des HLA-DRB als deren Bestandteil (112).

MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A

Bei den Versuchen, der Assoziation des HLA-B27 mit der Spondyloarthropathie auf den Grund zu gehen, wurde von Bahram und Spies im Jahre 1989 die MIC-Familie entdeckt, zu der auch MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A (MICA) gehört (113).

Im Gegensatz zu den sogenannten klassischen Genen der MHC-I wird MICA nicht ubiquitär exprimiert. Während MICA in Fibroblasten und epithelialen Zelllinien gefunden werden kann, fehlt MICA in der lymphohämatopoetischen Linie. Seine Expression wird durch Zytokine nicht beeinflusst (114). Die Transkription von MICA wird unter anderem durch einen Hitzeschock, oxidativen Stress oder eine virale Infektion gesteigert (115-117). Die Erkennung von MICA durch den NKG2D-Rezeptor, der an den NK-Zellen, $\alpha\beta$ - und $\lambda\delta$ -T-Lymphozyten exprimiert wird, führt zur Zellyse (118,119).

4. Fragestellung

Die Datenlage zeigt eine gesteigerte Expression inflammatorischer Zytokine nach dem Eintreten des Hirntodes.

Mit dieser Untersuchung sollen Aussagen über folgende Fragen gemacht werden:

1. Lässt sich die Expression inflammatorischer Zytokine im Gewebe der humanen Leichenorganspender durch die Methylprednisolon-Stoßtherapie signifikant senken?
2. Lässt sich die Konzentration inflammatorischer Zytokine im Serum der humanen Leichenorganspender durch die Methylprednisolon-Stoßtherapie signifikant senken?
3. Ist der langfristige klinische Verlauf nach der Transplantation der mit Methylprednisolon-Stoßtherapie vorbehandelten Organe klinisch signifikant besser?
4. Lässt sich durch die Methylprednisolon-Stoßtherapie die Rejektionsrate und die Rate von Ischemic Type Bile Lesions bei transplantierten Organen hirntoter Spender senken?

B Material und Methoden

Diese Studie wurde vom Ethik-Komitee der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin genehmigt.

Die Studie beschränkte sich ausschließlich auf die Organexplantationen im Raum Berlin-Brandenburg, die durch die Teams der chirurgischen Kliniken der Charité in Zusammenarbeit mit der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) Berlin-Brandenburg durchgeführt wurden. Im Klinikum Charité, Campus Virchow Klinikum (CVK), befindet sich zusätzlich ein Büro (Transplantationsbüro), das für die lokale Organisation der Organexplantationen zuständig ist.

1. Organisation

Vor Beginn der Studie wurde ein Protokoll ausgearbeitet, das während der ganzen Studie eingehalten wurde. Dokumentiert wurden das Alter des Spenders, das Geschlecht, die Ursache des Hirntodes, die Intensivzeit und der Intensivverlauf sowie der Zeitpunkt der Explantation. Weiterhin wurden die von der Eurotransplant und von der DSO vergebenen Spendernummern fixiert. Es wurde im Protokoll ebenfalls fest definiert, wann, wie viele und welche Organbiopsien und Serumproben zu entnehmen waren sowie die Nummerierung der Proben.

Es waren drei Studenten für die Durchführung der Studie verantwortlich. Da der Zeitpunkt der Organentnahme nicht voraussagbar war, wurde ein Bereitschaftsdienst für die Dauer der ganzen Studie eingerichtet. Ein Dienst umfasste immer eine Woche (von Montag bis Sonntag). In dieser Zeit war der entsprechende Student rund um die Uhr unter einer mobilen Telefonnummer erreichbar. Jede Organentnahme, bei der auch eine Leber entnommen werden sollte, wurde von dem Studenten, der zum Entnahmezeitpunkt Bereitschaftsdienst hatte, begleitet. In den Fällen, in denen die Implantation des entnommenen Organs in Charité, Campus Virchow Klinikum erfolgte, wurde auch die Implantation von dem Studenten begleitet. Hierbei wurden weitere Leberbiopsien gewonnen.

Die Mitarbeiter des Transplantationsbüros in Charité, Campus Virchow Klinikum erklärten sich freundlicherweise bereit, den entsprechenden Studenten so früh wie möglich über die anstehenden Explantationen zu informieren.

Auch die Verständigung mit der DSO war im Voraus notwendig. Bei jeder Organentnahme war ein DSO-Koordinator anwesend, der von dem Moment der Meldung eines potentiellen Spenders an bis hin zum Ende der Explantation in dem jeweiligen Krankenhaus den Organspender überwachte, die Organqualität beurteilte und entsprechende Meldungen an Eurotransplant

durchführte. Mit dieser Studie vertraut, hatten die Mitarbeiter der DSO der Zusammenarbeit zugestimmt. Die Mitarbeiter der DSO hatten intern bestimmt und notiert, welche Spender der Methylprednisolon-Stoßtherapie unterzogen wurden und leiteten diese noch vor dem Eintreffen des Chirurgeteams ein. Dadurch war die Durchführung der Studie als doppelblind möglich. Ferner wurde durch den Mitarbeiter der DSO die Gewinnung der ersten zwei Serumproben durchgeführt.

2. Patientenkollektiv

2.1. Organspender

2.1.1. Gruppeneinteilung, Gruppenumfang

Zur Klärung der Fragestellung wurden die humanen Leberbiopsien sowie die Blutserumproben den hirntoten Organspender untersucht. Da nur ein Teil der Organspender der Methylprednisolon-Stoßtherapie unterzogen wurde, standen die Proben von vorbehandelten und von nicht vorbehandelten Organspendern zur Verfügung, was grundlegend für die Gruppeneinteilung war.

Sämtliche Organspender, die während der Intensivzeit einer Therapie mit Steroiden sowie einer antibiotischen Therapie bei Infektion unterzogen wurden, wurden von der Studie ausgeschlossen. In dem Zeitraum vom August 2002 bis zum Januar 2005 konnten die humanen Leberbiopsien sowie die Blutserumproben von 115 hirntoten Organspendern konserviert werden. Hiervon waren 56 Spender mit Methylprednisolon-Stoßtherapie vorbehandelt und 51 Spender nicht. Acht Spender wurden aus verschiedenen Gründen aus dem Protokoll herausgenommen. Alle Organexplantationen fanden im Raum Berlin-Brandenburg in Deutschland statt.

2.1.2. Alter und Geschlecht der Organspender

Das Alter der vorbehandelten Organspender betrug 15 bis 77 Jahre. Der Mittelwert lag bei 49,88 Jahren, die Standardabweichung betrug 15,3. 57,1% (n=32) der vorbehandelten Organspender waren männlichen, 42,9% (n=24) weiblichen Geschlechts. Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen betrug bei vorbehandelten Organspendern 1,33 : 1,00.

Das Alter der nicht vorbehandelten Organspender betrug 17 bis 83 Jahre. Der Mittelwert lag bei 48,54 Jahren, die Standardabweichung betrug 18,1. 57,1% (n=25) der nicht vorbehandelten Organspender waren männlichen, 42,9% (n=26) weiblichen Geschlechts. Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen betrug bei den nicht vorbehandelten Organspendern 0,96 : 1,00.

2.1.3. Todesursachen der Organspender

Im Zuge des Intensivverlaufes der Organspender werden von den zuständigen Ärzten und den DSO-Koordinatoren Protokolle geführt, denen die Ursachen für den Hirntod entnommen werden konnten. Ein von Eurotransplant formuliertes Protokoll wird bei jeder Organtransplantation ausgefüllt und an die Zentrale weitergeleitet. In diesem Protokoll werden Alter, Geschlecht, Todesursache, Zeitpunkt des auslösenden Ereignisses, die klinischen Laborparameter, bekannte Vorerkrankungen sowie der Befund der sonographischen Untersuchung des Abdomens fixiert.

Die häufigsten Ursachen des Hirntodes bei vorbehandelten Organspendern waren die SAB (17 Spender), die ICB (13 Spender), SHT (7 Spender) sowie hypoxischer Hirnschaden (6 Spender).

Die häufigsten Ursachen des Hirntodes bei nicht vorbehandelten Organspendern waren die ICB (13 Spender), hypoxischer Hirnschaden (10 Spender), SAB (9 Spender) sowie SHT (8 Spender).

Der Rest verteilte sich bei beiden Gruppen auf andere Hirntodursachen.

2.1.4. Weitere Charakteristiken der Organspender

Die Intensivzeit der vorbehandelten Organspender lag bei 105 ± 76 Stunden, die der nicht vorbehandelten Organspender lag bei 110 ± 103 Stunden. Somit bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kollektiven bezüglich der Intensivzeit.

Die kalte Ischämiezeit der Organe, die den vorbehandelten Spendern entnommen wurden, betrug 634 ± 121 min. Die kalte Ischämiezeit der Organe, die den nicht vorbehandelten Spendern entnommen wurden, betrug 601 ± 153 min. Auch in diesem Punkt bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Das Gewicht der den vorbehandelten Spendern entnommenen Lebern betrug 1756 ± 145 g. Das Gewicht der den nicht vorbehandelten Spendern entnommenen Lebern betrug 1699 ± 183 g. Hier bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

2.2. Organempfänger

Der Model of End Stage Liver Disease Score (MELD-Score) der Organempfänger wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Sein Mittelwert lag bei den Empfängern der vorbehandelten Organe bei 14.8 sowie bei den Empfängern der nicht vorbehandelten Organe bei 14.1.

Die immunsuppressive Therapie der Organempfänger beider Gruppen basierte auf der Therapie mit Tacrolimus oder Cyclosporin A in Kombination mit Mycophenolat-Mofetil und Steroiden ohne dass zwischen den beiden Gruppen signifikante Unterschiede bezüglich der Therapie oder

der Dosierung bestanden. Einer Induktionstherapie wurde keiner der Organempfänger unterzogen.

Die für die Anastomosen benötigte warme Ischämiezeit betrug bei den Organempfängern der vorbehandelten Organe 43 ± 11 min. Bei den Empfängern der nicht vorbehandelten Organe betrug die warme Ischämiezeit 45 ± 9 min. Somit bestand bei der warmen Ischämiezeit ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

3. Lebertransplantation

3.1. Organentnahme bei hirntoten Spendern

Nach einer totalen Sternolaparotomie wird zuerst ein Sternumspreizer eingesetzt. Nach der Durchtrennung des Ligamentum teres hepatis und Inzision des Ligamentum falciforme bis etwa 2-3 cm an die Vena cava bzw. an die Lebervene wird der Bauchspreizer eingesetzt. Es folgt die Mobilisierung von Caecum, Colon ascendens und der rechten Kolonflexur. Das Mesenterium wird von der Bauchrückenwand bis zur Arteria mesenterica superior abgelöst, das Duodenum und Pankreas mobilisiert. Das rechte Hemicolon sowie der Dünndarm werden gegebenenfalls unter Mobilisierung von Colon descendens nach oben geschlagen und auf dem Thorax platziert. Anschließend wird die Arteria mesenterica inferior möglichst am Abgang durchtrennt, und der Mesocolon basisnah mobilisiert. Dann wird die Arteria gastroduodenalis bis zum Abgang der Arteria hepatica communis verfolgt und abgesetzt. Die Arteria hepatica communis wird angeschlungen. Dann erfolgt die stumpfe Darstellung und Anschlingung der Vena porta in der Tiefe und der Arteria lienalis. Während eine zusätzliche Arterie zum linken Leberlappen in der Regel leichter identifiziert wird, bereitet die Arterie zum rechten Leberlappen im Bereich des Ligamentum hepatoduodenale öfter Schwierigkeiten. Am besten tastet man die Arterie bei hochgespanntem Quercolon im Bereich des Mesocolons, sie verläuft grundsätzlich hinter dem Ducuts choledochus. Anschließend wird die Vena cava inferior infrarenal angeschlungen, bei stumpfer Freipräparation der Vena cava sollte man auf die untere Portalarterie und auf die Lumbalvenen achtgeben. Knapp oberhalb der Bifurkation wird die Aorta zwei Mal im Abstand von 2-3 cm frei präpariert und unterfahren. Es wird die linke Vena renalis mit ihrer Mündung in die Vena cava inferior dargestellt. Die abdominelle Präparation ist mit dem Anschlingen der Aorta oberhalb von Truncus coeliacus beendet. Zu diesem Zweck wird das rechte mediale Crus des Hiatus aorticus durchtrennt. Bevor man mit der Präparation thorakaler Organe beginnt, kann Pankreas durch eine Öffnung im Ligamentum gastrocolicum inspiziert werden.

Im Thorax wird der Herzbeutel eröffnet, die Perikardränder hochgenäht, die Hohlvenenhinterwand sowie die Vorderfläche des rechten Pulmonalisastes stumpf dargestellt.

Im Bereich der Aortenwurzel erfolgt nach Heparinisierung das Vorlegen einer Tabaksbeutelnaht. Anschließend wird eine Kanüle für die Perfusionslösung eingelegt und fixiert. In den Truncus pulmonalis wird ebenfalls eine Kanüle eingelegt und fixiert.

Im Abdomen wird der bifurkationsnahe Faden der Aorta ligiert, wonach die Aorta proximal von dem Faden eröffnet wird. Anschließend wird ein weitlumiger Schlauch für die Perfusion in die Aorta eingeführt und fixiert. Die Spitze soll sich deutlich unterhalb des Truncus coeliacus befinden. Für die separate Perfusion des Pfortadersystems kann ein Katheter über die Vena mesenterica superior oder inferior in die Vena porta eingeführt werden. Anschließend wird die obere Hohlvene okkludiert sowie die untere Hohlvene intraperikardial abgeklemmt und kranial der Klemme breit eröffnet, so dass ein ausreichend großer Teil des Vorhofes am Herzen und ein genügend langes Segment an der Leber verbleibt. Nach Leerschlagen des Herzens wird die Aorta distal der Perfusionskanüle abgeklemmt, und es kann mit der Perfusion des Herzens begonnen werden. In die Lungenbahn wird Prostazyklin injiziert; nach Perfusionsbeginn der Lunge wird das linke Herzohr gekappt, um den Abfluss aus dem Lungenstromgebiet zu garantieren. Nach dem Start der Herzperfusion wird die Klemme an der Vena cava inferior entfernt und die Aorta oberhalb des Truncus coeliacus abgeklemmt. Nun erfolgt die Perfusion der Bauchorgane mit University of Wisconsin (UW)- oder HTK-Bretschner-Lösung. Üblicherweise wird über die Aorta mit Druck und simultan über die Pfortader ohne Druck perfundiert. Der im Bereich der infrarenalen Vena cava vorgelegte Faden wird ligiert. Unmittelbar nach dem Perfusionsbeginn wird zur topischen Kühlung eiskalte Kochsalz- oder Ringer-Laktat-Lösung in die Bauchhöhle gegossen. Nun können die einzelnen Organe aus dem Bauchsitus entnommen werden.

3.2. Hepatektomie

Zu Beginn wird die Pfortader in Höhe der Einmündung der V. coronaria ventriculi quer durchtrennt. Danach erfolgt die Durchtrennung der A. lienalis und der A. gastrica sinistra etwa 0,5 cm distal ihres Abgangs. Anschließend wird der Truncus coeliacus bis zur Aorta freigelegt und mit einem Patch aus der Aortenvorderwand exzidiert. Dann werden das kleine Netz und linke Ligamentum triangulare bis in die Nähe der linken Lebervene durchtrennt. Vor der Durchtrennung des rechten Ligamentum triangulare erfolgt die Ablösung von Adhäsionen am Unterrand der Leber gegen die V. cava und die rechte Nebenniere. Danach erfolgt die vertikale Inzidierung des Zwerchfells von ventral bis auf etwa 1 cm an die V. cava heran. Dann wird die Hohlvene mit einem etwa 1-2 cm breiten Zwerchfell-Perikard-Saum umschnitten. Als letzter Schritt muss die infrahepatische V. cava knapp oberhalb der Einmündung der linken Nierenvene

quer durchtrennt werden. Danach wird die Leber sofort in die eiskalte Kochsalz- oder Ringer-Laktat-Lösung gelegt.

3.3. Präparation der Spenderleber

Die „backtable“-Präparation beinhaltet die Darstellung der Arteria hepatica und des Truncus coeliacus mit Ligatur und Übernähung der Gefäßabgänge. In manchen Fällen finden sich akzessorische linke oder rechte Leberarterien. Die linke Arterie entspringt aus der Arteria gastrica sinistra und soll bei der Entnahme möglichst erhalten bleiben. Eine akzessorische rechte Leberarterie hat ihren Ursprung oft in der Arteria mesenterica superior. Im Bereich der Vena cava sollen die Venenzuflüsse wie die rechte Nebennierenvene oder Zwerchfellvenen übernäht werden. Falls bei der Entnahme die Cholezystektomie noch nicht durchgeführt wurde, sollte sie jetzt erfolgen.

3.4. Empfänger-Hepatektomie

Als erstes wird die Vena axillaris und Vena saphena magna über eine 5 cm lange Inzision im Bereich der linken Axilla und der Leiste für den späteren veno-venösen Bypass dargestellt und angeschlossen. Dann wird das Abdomen durch quere Oberbauchlaparotomie unter Verlängerung des Schnittes bis zum Xiphoid in den Medianen eröffnet. Der linke Leberlappen wird mobilisiert, die suprahepatische Vena cava wird unter Ablösung des rechten Leberlappens vom Zwerchfell dargestellt und angeschlossen. Anschließend wird die Arteria hepatica propria bzw. Arteria hepatica dextra und sinistra dargestellt und ligiert. Die Arteria hepatica communis wird inklusive der Arteria gastroduodenalis für die spätere Anastomose dargestellt. Jetzt wird der Ductus cysticus und Ductus choledochus nahe des Leberhilus dargestellt und durchtrennt. Es werden Katheter in die Vena femoralis und die Vena axillaris für den veno-venösen Bypass eingelegt. In die Pfortader wird ein weiterer Katheter nach deren Ligatur und Durchtrennung eingelegt. Der Bypass wird angeschlossen und leitet das Blut der Nieren, der unteren Extremitäten und das Mesenterialvenenblut zur Vena axillaris. Anschließend wird der subhepatische Abschnitt der Vena cava inferior dargestellt und abgeklemmt. Nach der Abklemmung wird die Leber aus dem Retroperitoneum unter Mitnahme der Vena cava inferior und Schonung der rechten Nebenniere herausgelöst.

3.5. Transplantation der Spenderleber

Vorgehen bei Anastomosierung:

1. Suprahepatische Vena cava
2. Infrahepatische Vena cava
3. Arteria hepatica
4. Vena porta
5. Gallenwege

Zuerst erfolgt die Anastomosierung der suprahepatischen Vena cava inferior in fortlaufender Nahttechnik mit Prolene 3/0. Danach folgt die Anastomosierung der infrahepatischen Vena cava inferior in der gleichen Technik mit Prolene 4/0. Diese Anastomose wird im Gegensatz zur Anastomose der suprahepatischen Vena cava inferior nicht verknotet, sondern mit Katheter versorgt. Die Arteria hepatica des Transplantates wird mit der Arteria hepatica des Empfängers mit Prolene 7/0 anastomosiert.

Jetzt wird der Bypass diskonnektiert und die Länge der Vena porta den lokalen anatomischen Gegebenheiten angepasst und mit Prolene 6/0 unter leichter Spannung anastomosiert. Damit der Reperfusionsschaden so gering wie möglich ausfällt, werden Arteria hepatica propria sowie Vena porta simultan reperfundiert. Zu diesem Zweck werden zunächst die Arteria hepatica propria und Vena porta eröffnet, und, je nach Transplantatgewicht, 300-700 ml Blut über die Vena cava inferior abgelassen. Nach Verschluss der infrahepatischen Cavaanastomose wird der Blutfluss der infra- und suprahepatischen Vena cava freigegeben.

Es erfolgt die Anastomosierung des Empfänger- und Spendergallenganges in Seit-zu-Seit Technik, wodurch der Abfluss der Galle auch nach dem Schrumpfen der Anastomose noch gewährleistet ist. Zwecks innerer Schienung des Gallenganges wird im Bereich des Empfängergallenganges 2-3 cm unterhalb der Anastomose eine T-Drainage eingelegt, die im Bereich der rechts-lateralen Oberbauchwand nach außen ausgeleitet wird.

4. Zeitpunkte und Gewinnung von Proben

4.1. Zeitpunkte und Gewinnung von Serumproben

Nach der Ankunft des DSO-Teams am Spender erfolgt die erste Blutabnahme. Das Blut wird auf sechs Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml) verteilt und fünf Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Capsulefuge, TOMY; Centrifuge PMC-060). Anschließend wird das überstehende Serum abpipetiert und auf sechs Naglene-Röhrchen mit der Nummer 1 verteilt. Unmittelbar danach wird das Serum in den Naglene-Röhrchen im flüssigen Stickstoff kryokonserviert. Wenn der Spender zu der Gruppe gehört, die die

Vorbehandlung erfährt, erfolgt nun die Applikation von 250 mg Methylprednisolon, zunächst als Bolus und anschließend als Dauerinfusion (100 mg/h). Nach der Ankunft des Organentnahmeteam's unmittelbar vor der Laparotomie erfolgt eine erneute Gewinnung des Blutserums, das nach demselben Schema in sechs Naglene-Röhrchen mit der Nummer 5 kryokonserviert wird. Insgesamt hat man nun zwölf Naglene-Röhrchen mit kryokonservierten Serumproben: einige mit dem vor dem Einleiten der Methylprednisolon-Stoßtherapie entnommenen Serum und andere mit dem Serum, das unmittelbar vor der Laparotomie entnommen wurde.

4.2. Zeitpunkte und Gewinnung von Leberbiopsien

Nach der erfolgten Laparotomie wird die erste Leberbiopsie gewonnen. Die Leberbiopsie wird immer keilförmig mit einem sterilen Skalpell entnommen und auf einem sterilen Tupfer verabreicht. Danach wird die Biopsie in vier gleich große Stücke geteilt, auf zwei Naglene-Röhrchen mit der Nummer 7 verteilt und sofort im flüssigen Stickstoff kryokonserviert, um eine mögliche Hybridisierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu vermeiden. Eine weitere Leberbiopsie wird unmittelbar vor der Perfusion gewonnen und nach demselben Schema in zwei Naglene-Röhrchen mit der Nummer 8 kryokonserviert.

Nach dem Abschluss der Entnahme sämtlicher zu transplantierenden Organe und eventueller Gefäße werden noch Biopsien anderer Organe gesammelt, auf zwei Naglene-Röhrchen verteilt und nach demselben Schema kryokonserviert. Hierbei werden die Lungenbiopsien auf die zwei Naglene-Röhrchen mit der Nummer 11, die des Pankreas auf die zwei Naglene-Röhrchen mit der Nummer 12, die der Aorta auf die zwei Naglene-Röhrchen mit der Nummer 14 und die der Milz auf die zwei Naglene-Röhrchen mit der Nummer 15 verteilt und anschliessend kryokonserviert.

Im Falle der anschließenden Leberimplantation in Charité, Campus Virchow Klinikum bestand zusätzlich die Möglichkeit, Leberbiopsien unmittelbar vor der Reperfusion und eine Stunde nach der Reperfusion zu gewinnen. Die Leberbiopsie, die unmittelbar vor der Reperfusion gewonnen wird, wird nach dem gleichen Schema wie die bereits gewonnenen Leberbiopsien in vier gleich große Stücke geteilt, auf die zwei Naglene-Röhrchen mit der Nummer 9 verteilt und kryokonsert. Die Leberbiopsie, die eine Stunde nach der Reperfusion gewonnen wird, wird ebenfalls nach dem gleichen Schema in vier gleich große Stücke geteilt und auf die Naglene-Röhrchen mit der Nummer 10 verteilt und kryokonserviert.

Nach dem Abschluss von Kryokonservierung der Biopsien wurden alle gewonnenen Proben in den neoLab-KRYO-Aufbewahrungsboxen (130x130x50/35 mm CX weiß Dr. 2/0+L) bei minus

84°C bis zur endgültigen Auswertung gelagert. So wurde sichergestellt, dass die Kühlkette nach der Kryokonservierung nicht unterbrochen wurde.

5. Parameter zum Nachweis der immunologischen Organaktivierung

Zur Beurteilung der immunologischen Organqualität der Spender wurde die Expression inflammatorischer Zytokine und inflammatorischer Cluster of Differentiation (CD) gemessen. Hierzu wurde die Transkriptionsrate von TNF- α , CD54, IP-10, MICA, FasL, HLA-DRB, MCP-1, CD68 und CD80 in der ersten Leberbiopsie (Probe Nr. 7) aus beiden Gruppen bestimmt. Zusätzlich wurde in den Serumproben der Organspender die Konzentration von Cortisol, TNF- α , IL-2, IL-6, MCP-1 und IP-10 gemessen.

Für den langfristigen klinischen Verlauf wurde in den Serumproben der Organempfänger die Konzentration von ALT, AST, AP, GLDH und Bilirubin am dritten postoperativen Tag, am zehnten postoperativen Tag sowie sechs Monate nach der Transplantation mit üblichen laborchemischen Methoden bestimmt.

6. TaqMan-Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Genexpression

Die Bestimmung der Zytokinexpression sowie der Expression von Cluster of Differentiation in den Leberbiopsien erfolgte mittels TaqMan-Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (Echtzeit-Fluoreszenz-PCR). Im folgenden Abschnitt wird die Methode erläutert.

6.1. Isolierung der Ribonukleinsäure

Die Leberbiopsien wurden nach der Gewinnung zu den vorher beschriebenen Zeitpunkten entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff bei minus 170°C kryokonserviert. Zur Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) wurden die aufgetauten Biopsien im Ultraturax-Gewebe-Homogenisator (Jahnke und Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland) zerkleinert und anschließend mit 700 μ l TRIZOL-Reagenz (GibcoBRL) aufgefüllt. Die Reagenz enthält Guanidiniumisothiocyanat und Phenol. Guanidiniumisothiocyanat ist ein Denaturierungsmittel, welches zur Inaktivierung zellulärer RNasen und Isolierung intakter RNA führt. Phenol dient der Entfernung von Proteinen aus der Nukleinsäurelösung. Durch Bildung von Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureseitenketten, dissoziiert es Protein-Nukleinsäure-Komplexe und führt zur Denaturierung und Anreicherung der Proteine. Nach Zugabe von Chloroform und anschließendem Zentrifugieren teilt sich das Reagenz in eine wässrige Phase mit der RNA, eine Interphase und eine untere Phenol-Chloroform-Phase, in welcher sich unter anderem die Proteinfraction befindet. Nach abpipettieren der wässrigen Phase

wurde die RNA mithilfe von Isopropylalkohol präzipitiert, in 70-prozentigem Ethanol gewaschen und das RNA-Pellet in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Das Zentrifugieren am Ende der Präzipitation erfolgte mit 12 000 Umdrehungen pro Minute (rpm) für zehn Minuten.

6.2. Ribonukleinsäure-Bestimmung

Die Konzentration der RNA, als Grundlage für alle Untersuchungen zur Genexpression, wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt, dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren. Hier gilt, dass die optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA entspricht. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Reinheit die Absorption der Probenlösung bei 280 nm bestimmt, dem Absorptionsmaximum aromatischer Verbindungen (z.B. Phenol). Über den Absorptionsquotienten A₂₆₀/A₂₈₀ lässt sich eine Aussage über mögliche Verunreinigungen der Probenlösung durch Proteine oder Phenol machen.

6.3. DNase Behandlung

Vor der reversen Transkription wurde eine DNase-Behandlung durchgeführt. Hierbei werden einzel- und doppelsträngige DNA in Oligo-Desoxyribonukleotide gespalten. Dies ist wichtig, damit die verwendete RNA keine DNA-Kontamination enthält bzw. diese nicht amplifiziert werden kann, da dies zu falsch-positiven Ergebnissen führt.

6.4. Reverse-Transkriptase-Reaktion

Bei diesem Schritt der Untersuchung der Genexpression mittels RT-PCR Technik wird die isolierte RNA mit Hilfe des Enzyms „Reverse Transkriptase“ in ihre komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) umgeschrieben. Dabei dient die RNA als Matrize für die cDNA Erststrangsynthese. Durch einen Oligo(dT)-Primer, der am Poly(a)-Schwanz am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA hybridisiert, erfolgt die selektive Umschreibung der mRNA-Moleküle (2-4 % der Gesamt-RNA) in cDNA.

6.5. TaqMan-Real-Time-PCR

Die Genexpression der TNF- α , CD54, IP-10, MICA, FasL, HLA-DRB und MCP-1 sowie der CD68 und CD80 wurden durch Real-Time-RT-PCR (TaqMan-PCR) im ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (TaqMan, Foster City, CA) gemessen. Die Durchführung der Messung sowie das Entwerfen der Primer hierzu erfolgte durch das Institut für Medizinische Immunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, mit Hilfe von Primer Express Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

Diese Methode beruht auf der Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion und nutzt die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase in Verbindung mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde. Die fluorogene Sonde ist ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, welches zwischen den beiden Primern an die Zielsequenz bindet. Am 5'-Ende trägt die Sonde einen fluoreszierenden Farbstoff (FAM, 6-Carboxyfluorescein), der als Reporter dient, und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (TAMRA, 6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin), der die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe durch einen Fluoreszenz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Die Sonde selbst kann nicht durch die Taq-Polymerase verlängert werden, da das 3'-Ende durch einen Phosphatrest blockiert ist. Während der PCR hybridisieren Primer und Sonde an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase verdrängt die Taq-Polymerase die Sonde vom Strang und schneidet sie durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität.

Dabei wird der Reporter-Farbstoff abgetrennt, die räumliche Nähe zwischen Reporter-Farbstoff und Quencher-Farbstoff unterbrochen und somit der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer aufgehoben. Ein Fluoreszenzsignal wird nun vom Reporter-Farbstoff freigesetzt. Die Fluoreszenz des Reporters steigt entsprechend der Akkumulation der PCR-Produkte mit jedem PCR-Zyklus an. Mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System wurde die Veränderung der Fluoreszenzen im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus detektiert und online verfolgt. Dabei wird das Fluoreszenzsignal über ein Glasfaserkabel einer CCD-Kamera (charge-coupled-device camera) zugeführt. Die CCD-Kamera sammelt die Fluoreszenz-Emissionsdaten über einen Wellenbereich von 500-660 nm. Der Anstieg der Intensität des Reporter-Fluoreszenzsignals während der PCR-Zyklen ist hierbei proportional zur Amplifikation der Zielsequenz.

Durchführung der TaqMan-PCR

Es wurde der TaqMan® Universal PCR Master Mix (AmpliAq Gold, dNTP mit dUTP, AmpErase UNG, 25 mM MgCl₂) von Perkin Elmer verwendet. Enthalten sind hier alle notwendigen Substanzen außer den Primern, der Sonde und der Zielsequenz (cDNA). UNG (Uracil-n-Glykosylase) entfernt hierbei Uracilreste aus doppelsträngiger DNA und verhindert die Reamplifikation von Verunreinigungen aus vorherigen PCR-Zyklen. Die Amplifikation erfolgte durch eine 2-Schritt-PCR mit 40 Zyklen nach folgendem Temperaturprofil:

2 min	50°C	AmpErase UNG
10 min	95°C	AmpliAq Gold DNA-Polymerase Aktivierung
40 Zyklen: 1. Schritt: 15 sec	95°C	Denaturierung
2. Schritt: 1 min	60°C	Annealing und Extension

Der 25 µl PCR-Ansatz enthielt 1 µl cDNA, 12,5 µl Master Mix (TaqMan Universal Master Mix, Perkin Elmer), 200 nmol/l genspezifische Sonde, 50 bis 900 nmol/l von jedem Primer und 5,5 µl destilliertes Wasser.

Auswertung der TaqMan-PCR

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte über den Ct-Wert (threshold cycle), der die Zyklenzahl anzeigt, an dem die Reporter-Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert (threshold) oberhalb der Basislinie (vorher definiertes Fluoreszenzniveau) erreicht. Je höher die Ausgangskonzentration der Zielsequenz am Anfang ist, desto eher wird der Schwellenwert erreicht und desto geringer ist der Ct-Wert. Bei 100-prozentiger Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die Amplifikatmenge und dementsprechend auch das Fluoreszenzsignal der Probe. Bei der hier angewandten relativen Quantifizierung (User Bulletin No.2, Perkin-Elmer, 1997; DNA/RNA Real-Time Quantitative PCR, Perkin-Elmer, 1998 Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) werden nicht absolute Konzentrationen oder Kopienzahlen bestimmt. Die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites co-exprimiertes und ubiquitäres Gen (Standard-Probenmaterial) bezogen. Dieses sogenannte „housekeeping-gene“ wird unter den gegebenen Versuchsbedingungen selbst nicht transkriptionell reguliert und war in dieser Arbeit das Aldolase-Gen. Die mathematische Berechnung der Expression erfolgte durch die vergleichende Δ Ct-Methode. Dabei wird im ersten Schritt für jede Probe der Ct-Wert des Referenzgens (Ct_{Aldolase}) vom Referenzwert des zu untersuchenden Gens (Ct_{Zytokin}) subtrahiert (Δ Ct). Nach dieser Normierung ergibt sich das relative Expressionslevel aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta Ct}$. Beim Überschreiten des Ct-Wertes von 40 Zyklen wurde die Expression als negativ definiert.

7. Cytometric Bread Array System, BD Biosciences

Als Cytometric Bread Array System (CBA), auch „multiplexed bead array“, wird eine Serie aus spektraldiskreten Partikeln bezeichnet, die zum Einfangen und Quantifizieren von löslichen Proben genutzt werden. Die Probe wird dann mit einem auf Fluoreszenz basierenden Detektionsmechanismus sowie mit der „Flow“-Zytometrie-Analyse gemessen.

Das BD CBA erzeugt simultan Daten, die mit auf Enzyme Linkend Immunosorbend Assay (ELISA) basierten Formaten vergleichbar sind. Die Konzentrationen der unbekannt Proteine werden für das CBA kalkuliert, wie für jedes „sandwich format assay“, also durch die Nutzung von bekannten Standards und das Plotten (Aufzeichnen) der Unbekannten gegen Standardkurven. Mit BD CBA ist es möglich, Zytokinprofile ohne Volumenrestriktionen zu

evaluieren. Zusätzlich zu den quantitativen Daten werden grafische Abbilder erstellt, die einzigartige Profile oder Signaturen zeigen.

Für die Auswertung der Serumkonzentration von IL-2, IP-10, IFN- γ , MCP-1 und IL-10 wurde das CBA von Becton Dickinson (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

7.1. Flow-Zytometrie

Ein Zytometer besteht aus drei wichtigen Komponenten: einem die Probe zuführenden System, einer Lichtquelle und einem elektronischen System. Das elektronische System sammelt die Informationen der Lichtinteraktion mit an den Zellen haftenden fluoreszierenden Molekülen und den Zellen. Die Zellsuspension wird in ein fluides zuführendes System so eingeleitet, dass die Zellen in einer einzigen Reihe durch eine Fließzelle wandern, wo sie von einem schmal fokussierten Lichtstrahl (hochintensiver Laser einer bestimmten Wellenlänge) geschnitten werden. Beim Eintreffen des Lichtstrahl auf die Zelle können gleichzeitig verschiedene Informationen über die Zelle gewonnen werden: Außer der Zellgröße (mithilfe eines forward angle light scatter) und der Komplexität der Zelle (durch einen side light scatter) können Zellen von besonderem Interesse in Kombination mit spezifischen Antikörpern in einer Probe identifiziert werden.

7.2. Enzyme Linkend Immunosorbent Assay

Bei Enzyme Linkend Immunosorbent Assay (ELISA) kommt die Nutzung von Antigenen oder Antikörpern zum Einsatz, die mit einem Enzym konjugiert sind, welches, während es mit seinem Substrat reagiert, ein kolorimetrisches, chemoluminiszierendes oder fluoreszierendes Reaktionsprodukt bildet. Solide Materialien, die mit Antikörpern überzogen sind, werden als Immunoabsorbens genutzt. Die Probe mit dem vermeintlichen Antigen wird simultan mit den Enzym-markierten Antigenen der soliden Phase zugeführt. Dadurch konkurrieren sie um die Antikörperbindung auf der soliden Phase. In Addition wird eine separate Reaktion durchgeführt, die nur die gekennzeichneten Antigene und einen Puffer der soliden Phase beifügt (Vergleichsreaktion).

7.3. Immulite®-System

Das Immulite®-System (DPC Buehlmann GmbH, Salzburg, Österreich) verwendet die Chemilumineszenz-Assaytechnologie. Hierbei wird ein enzymverstärkter CLIA (Chemilumineszenz-Immunoassay) eingesetzt. Im Gegensatz zur Direktmarkierung des Antikörpers wird die alkalische Phosphatase verwendet, die mit einem gegen den zu

bestimmenden Analyten konjugiert ist. Als Substrat wird Adamanthyldioxethanphosphat (AMPPD) in Überschuss zugegeben. Dieses Substrat wird durch die alkalische Phosphatase in ein instabiles Anionzwischenprodukt dephosphoryliert, das bei Zerfall ein Photon der Wellenlänge 477 nm abgibt.

Da ein Enzymmolekül viele Substratmoleküle umsetzt und demzufolge viele Lumineszenzreaktionen auslöst, wird das Signal verstärkt. Hierdurch wird die sehr hohe Empfindlichkeit der Immulite® Methode erreicht. Da die Lichtemission bereits nach 5 min. die Sättigung erreicht, wird nur eine kurze Substratinkubationszeit benötigt. Wegen der linearen Beziehung der ausgesendeten Lichtmenge und Menge der gebundenen alkalischen Phosphatase kann auf die Konzentration des Alkylats errechnet werden.

Als Festphase werden Polystyrolkugeln verwendet, die mit einem spezifischen Antikörper gegen den zu bestimmenden Analyten beschichtet sind. Die Trennung des immobilisierten Analyten von der ungebundenen Phase erfolgt durch Zentrifugation. Die Nachweisgrenze liegt bei einem Zeptomol (10^{-21} mol).

Mithilfe dieses Systems wurde die Serumkonzentration von IL-2, IL-6, IL-8 und TNF- α bestimmt.

8. Statistische Analysen

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurden der ANOVA-Test sowie der Mann-Whitney-Test verwendet. Multiple Vergleiche zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe von Zwei-Wege-ANOVA analysiert. Der Bonferroni Post-Hoc-Test wurde für die individuelle Zeitpunktanalyse und Differenzen innerhalb der Gruppen verwendet. Kategorische Variablen wurden in Prozent angegeben und mithilfe eines Chi-squared-Tests oder Fisher's-exact-Tests verglichen. Die Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert.

Alle Werte im Text und in den Abbildungen sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

C Ergebnisse

1. Expression von inflammatorischen Faktoren in den Leberbiopsien

Für die Auswertung wurden die Leberbiopsien herangezogen, die unmittelbar nach der Laparotomie des Organspenders gewonnen wurden (siehe Kapitel B, Abschnitt 4.2).

Hierbei zeigten sich bei den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender signifikant niedrigere Expressionen der meisten bestimmten Zytokine im Vergleich zu den Leberbiopsien der nicht vorbehandelten Organspender. Im einzelnen zeigte sich insbesondere eine deutlich geringere Expression von TNF- α , FasL und IP-10 mit einer deutlichen Signifikanz bei $p < 0,0001$ in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender. Die Expressionen von CD54 und CD80 ist ebenfalls signifikant niedriger in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender bei $p < 0,01$.

In den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender hingegen war die Expression von CD68 und MICA deutlich sowie die Expression von HLA-DRB geringfügig erhöht bei $p < 0,05$.

1.1. Expression von Tumor-Nekrose-Faktor- α

Die Expression von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender betrug $0,0025 \pm 0,0005$. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern betrug die Expression von TNF- α $0,0067 \pm 0,0009$. Damit war die Expression von TNF- α in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender deutlich geringer als bei den nicht vorbehandelten Organspendern. Mit $p < 0,0001$ war das Ergebnis deutlich signifikant (Diagramm 1).

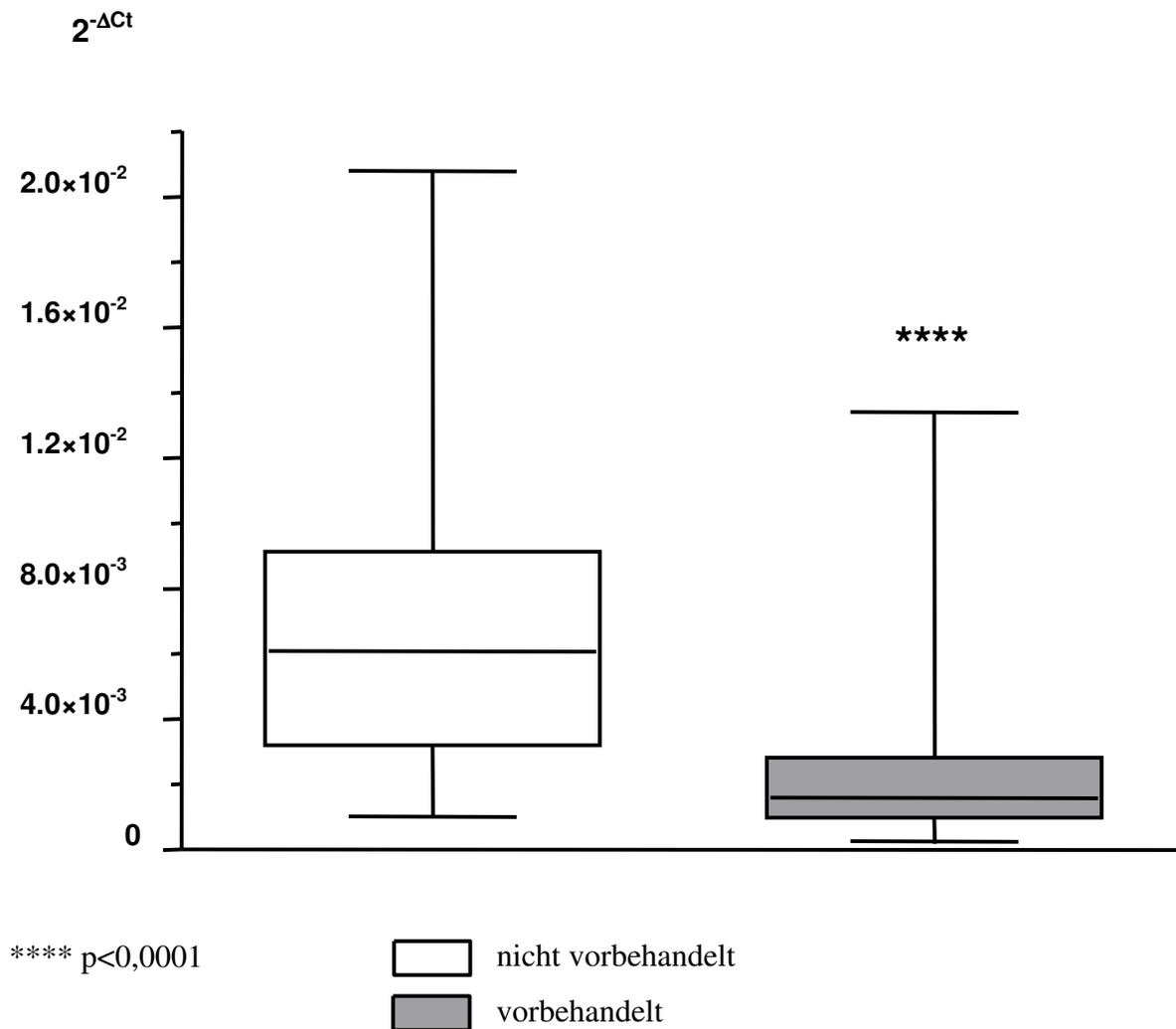


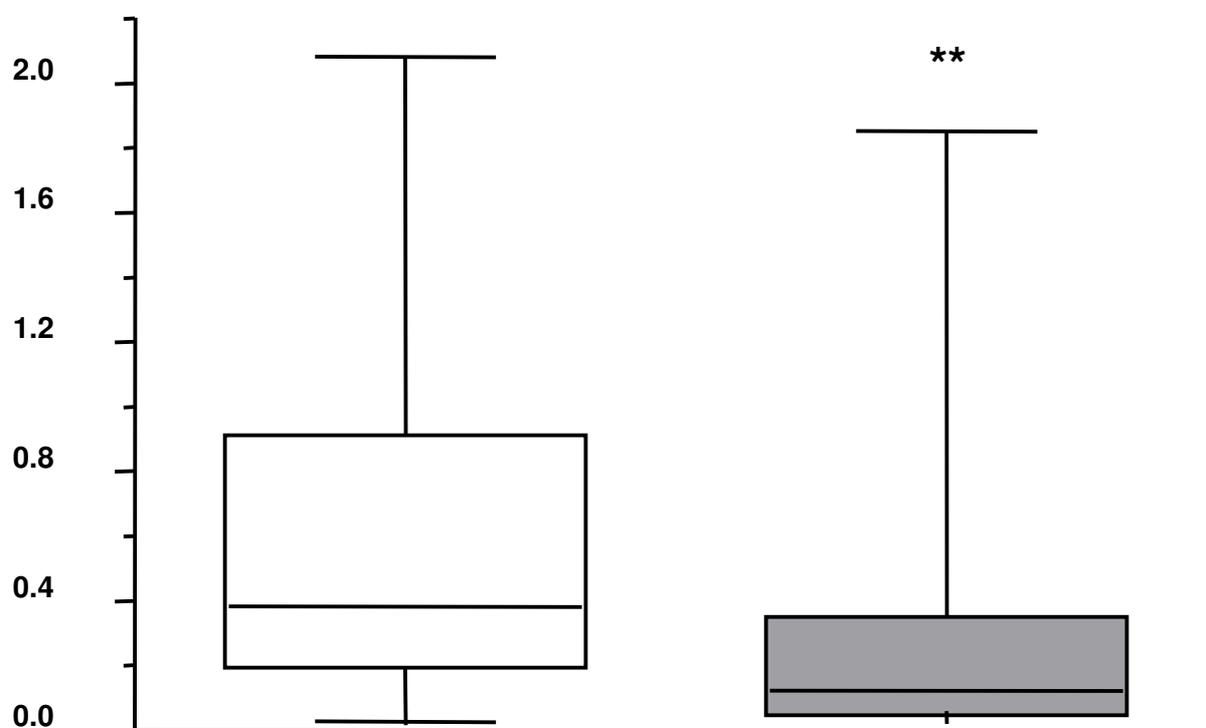
Diagramm 1: Expression von TNF- α im Lebergewebe der vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Organspender, gemessen durch Real-Time-PCR (TaqMan) (s. Kap. B, Abschnitt 6).

1.2. Expression von Cluster of Differentiation

1.2.1. Cluster of Differentiation 54

Die Expression von Cluster of Differentiation 54 (CD54) in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender betrug $0,2677 \pm 0,0736$. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern betrug die Expression von CD54 $0,6044 \pm 0,1028$. Die Expression von CD54 in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender war deutlich geringer im Vergleich zur Expression von CD54 in den Leberbiopsien der nicht vorbehandelten Organspender. Mit $p < 0,01$ war das Ergebnis signifikant (Diagramm 2).

$2^{-\Delta Ct}$



** $p < 0,01$

 nicht vorbehandelt
 vorbehandelt

Diagramm 2: Expression von CD54 im Lebergewebe der vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Organspender, gemessen durch Real-Time-PCR (TaqMan) (s. Kap. B, Abschnitt 6).

1.2.2. Cluster of Differentiation 68

Die Expression von Cluster of Differentiation 68 (CD68) in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender betrug $9,00 \pm 1,06$. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern betrug die Expression von CD68 $6,92 \pm 5,85$. Somit lag die Expression von CD68 in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender höher als die in den Leberbiopsien der nicht vorbehandelten Organspender. Mit $p < 0,05$ war das Ergebnis ebenfalls signifikant (Diagramm 3).

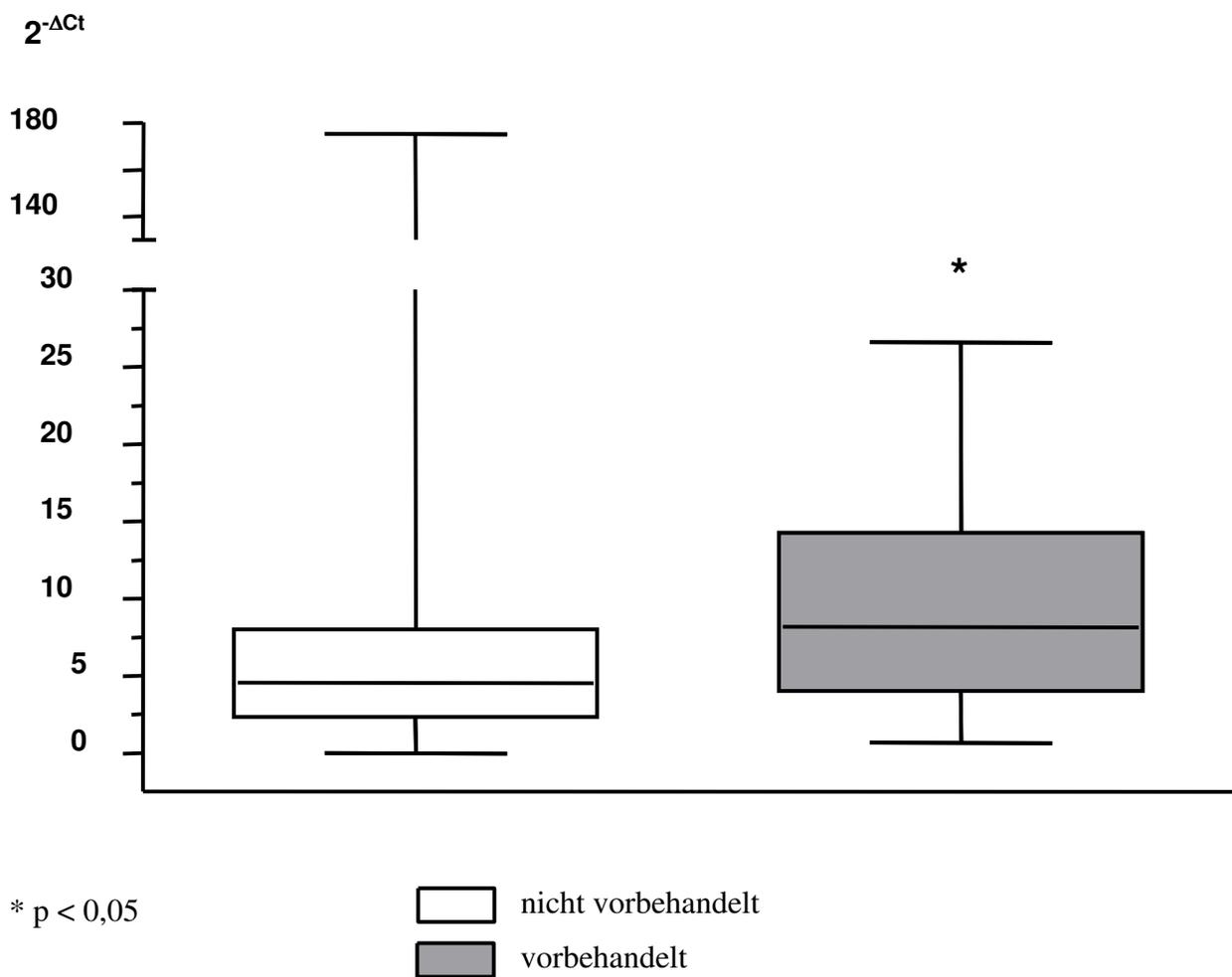


Diagramm 3: Expression von CD68 im Lebergewebe der vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Organspender, gemessen durch Real-Time-PCR (TaqMan) (s. Kap. B, Abschnitt 6).

1.2.3. Cluster of Differentiation 80

Die Expression von Cluster of Differentiation 80 (CD80) in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender betrug $0,0017 \pm 0,0003$. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern betrug die Expression von CD80 $0,0041 \pm 0,0008$. Die Expression von CD80 in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender war deutlich niedriger als die in den Leberbiopsien der nicht vorbehandelten Organspender. Mit $p < 0,05$ war dieses Ergebnis ebenfalls signifikant (Diagramm 4).

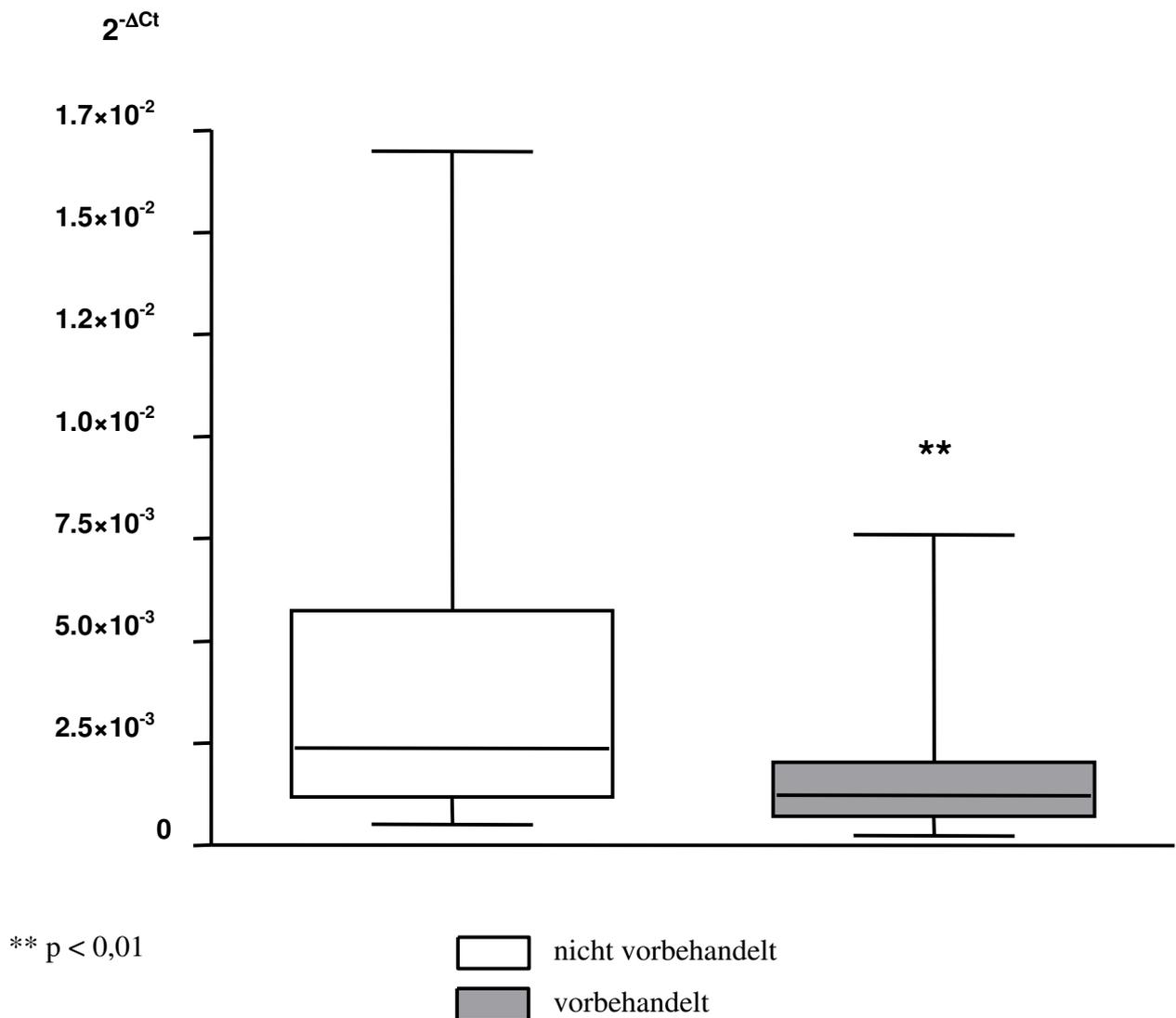


Diagramm 4: Expression von CD80 im Lebergewebe der vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Organspender, gemessen durch Real-Time-PCR (TaqMan) (s. Kap. B, Abschnitt 6).

1.2.4. Fatty Acid Synthetase Ligand

Die Expression von Fatty Acid Synthetase Ligand (FasL) in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender betrug $0,0013 \pm 0,0002$. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern betrug die Expression von FasL $0,0075 \pm 0,0023$. Auch die Expression von FasL in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender war deutlich niedriger als die in den Leberbiopsien der nicht vorbehandelten Organspender. Mit $p < 0,0001$ war auch dieses Ergebnis deutlich signifikant (Diagramm 5).

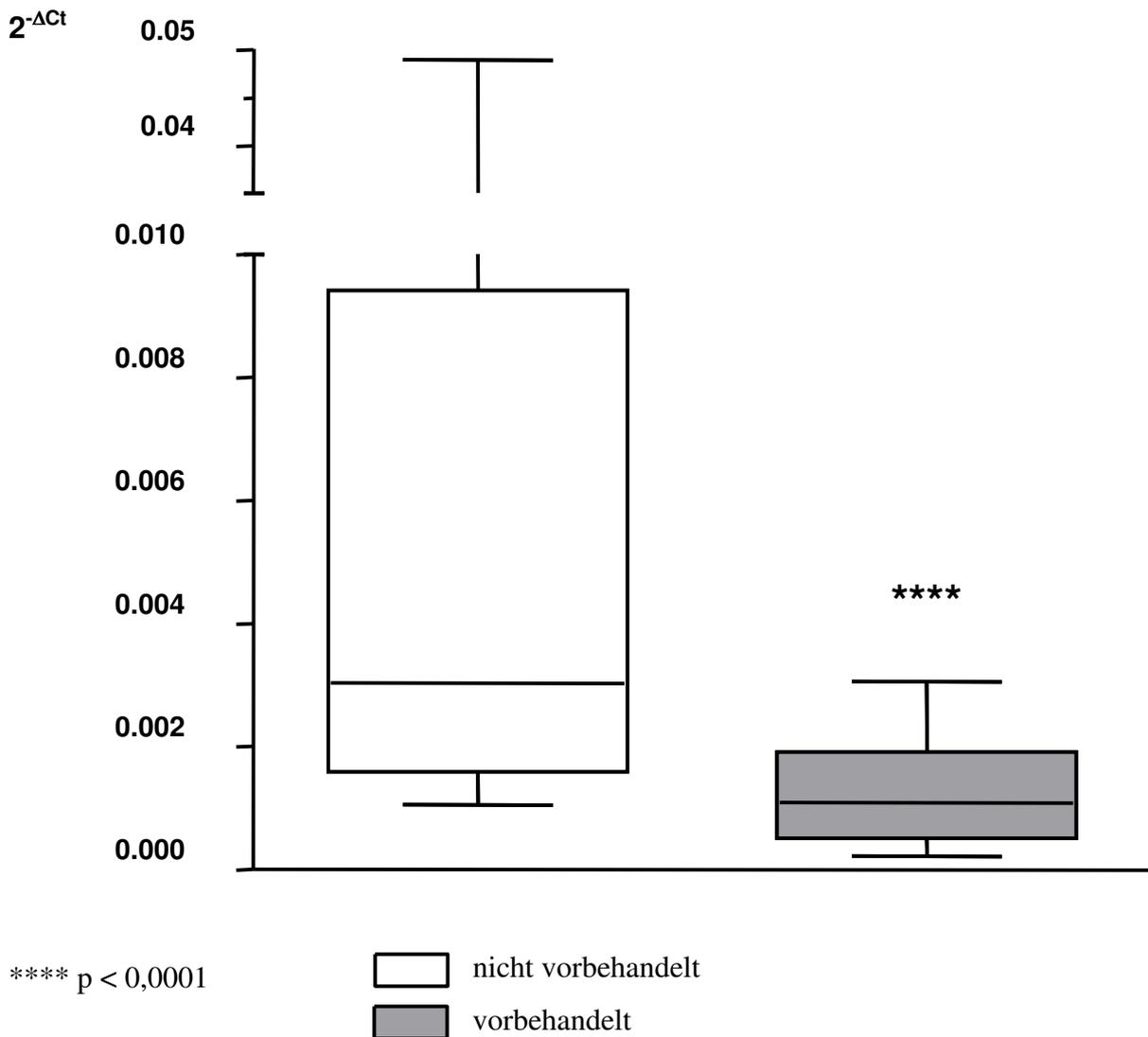


Diagramm 5: Expression von FasL im Lebergewebe der vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Organspender, gemessen durch Real-Time-PCR (TaqMan) (s. Kap. B, Abschnitt 6).

1.3. Expression von MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A

Die Expression von MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A (MICA) betrug in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender $0,0381 \pm 0,0031$. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern betrug die Expression von MICA $0,0228 \pm 0,0051$. Somit lag die Expression von MICA in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender etwas höher als die in den Leberbiopsien der nicht vorbehandelten Organspender. Mit $p < 0,05$ war das Ergebnis signifikant (Diagramm 6).

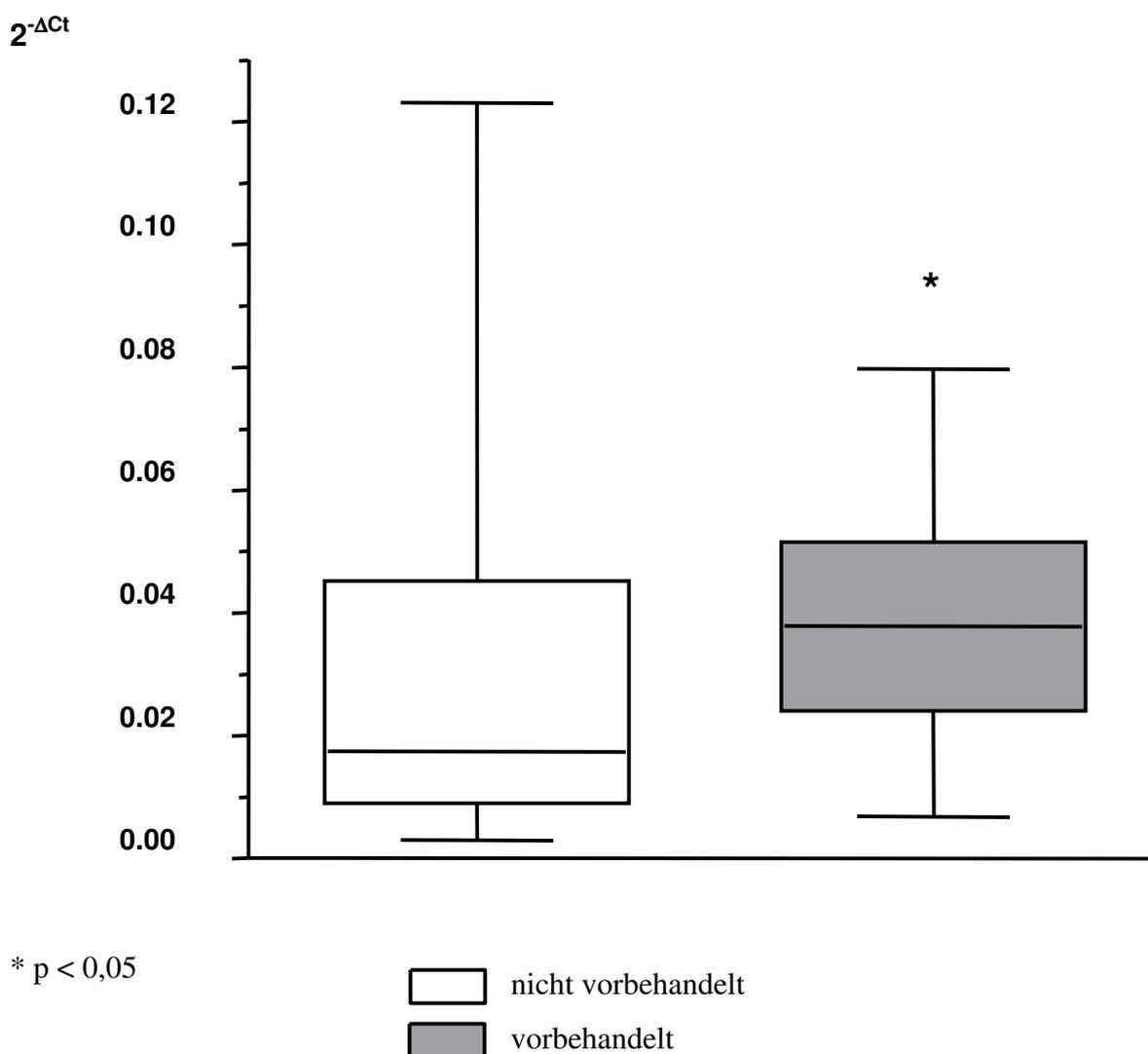
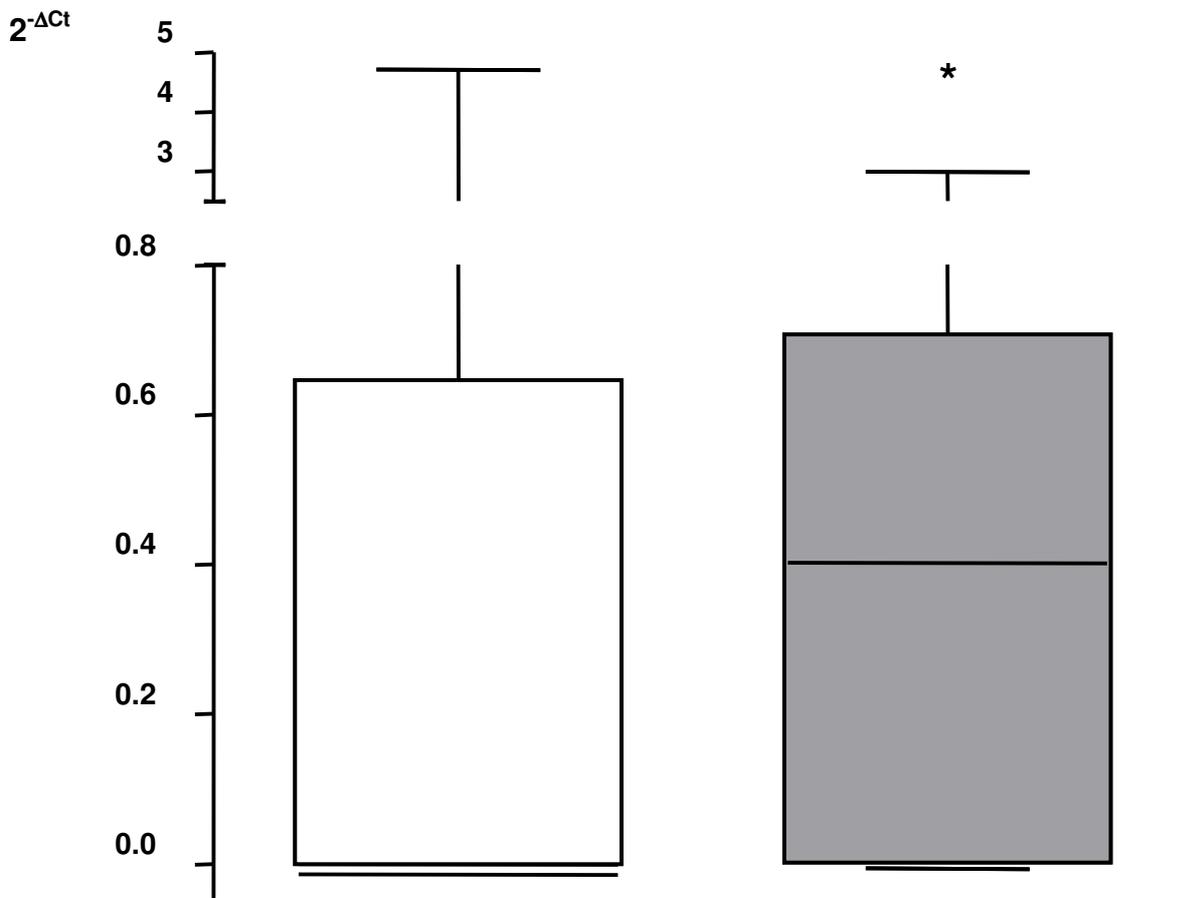


Diagramm 6: Expression von MICA im Lebergewebe der vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Organspender, gemessen durch Real-Time-PCR (TaqMan) (s. Kap. B, Abschnitt 6).

1.4. Expression von Humanem Leukozytenantigen DRB

Die Expression von humanem Leukozytenantigen DRB (HLA-DRB) in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender betrug $0,5393 \pm 0,1283$. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern betrug die Expression von HLA-DRB $0,5657 \pm 0,2073$. Somit war die Expression von HLA-DRB in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender geringer als in den Leberbiopsien der nicht vorbehandelten Organspender. Das Ergebnis war mit $p < 0,05$ signifikant (Diagramm 7).



* $p < 0,05$

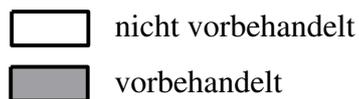


Diagramm 7: Expression von HLA-DRB im Lebergewebe der vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Organspender, gemessen durch Real-Time-PCR (TaqMan) (s. Kap. B, Abschnitt 6).

1.5. Expression von Interferon-Protein-10

Die Expression von Interferon-Protein-10 (IP-10) in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender betrug $0,0105 \pm 0,0035$. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern betrug die Expression von IP-10 $0,0445 \pm 0,0117$. Somit war die Expression von IP-10 in den Leberbiopsien der vorbehandelten Organspender deutlich niedriger im Vergleich zu der Expression von IP-10 in den Leberbiopsien der nicht vorbehandelten Organspender. Mit $p < 0,0001$ war das Ergebnis deutlich signifikant (Diagramm 8).

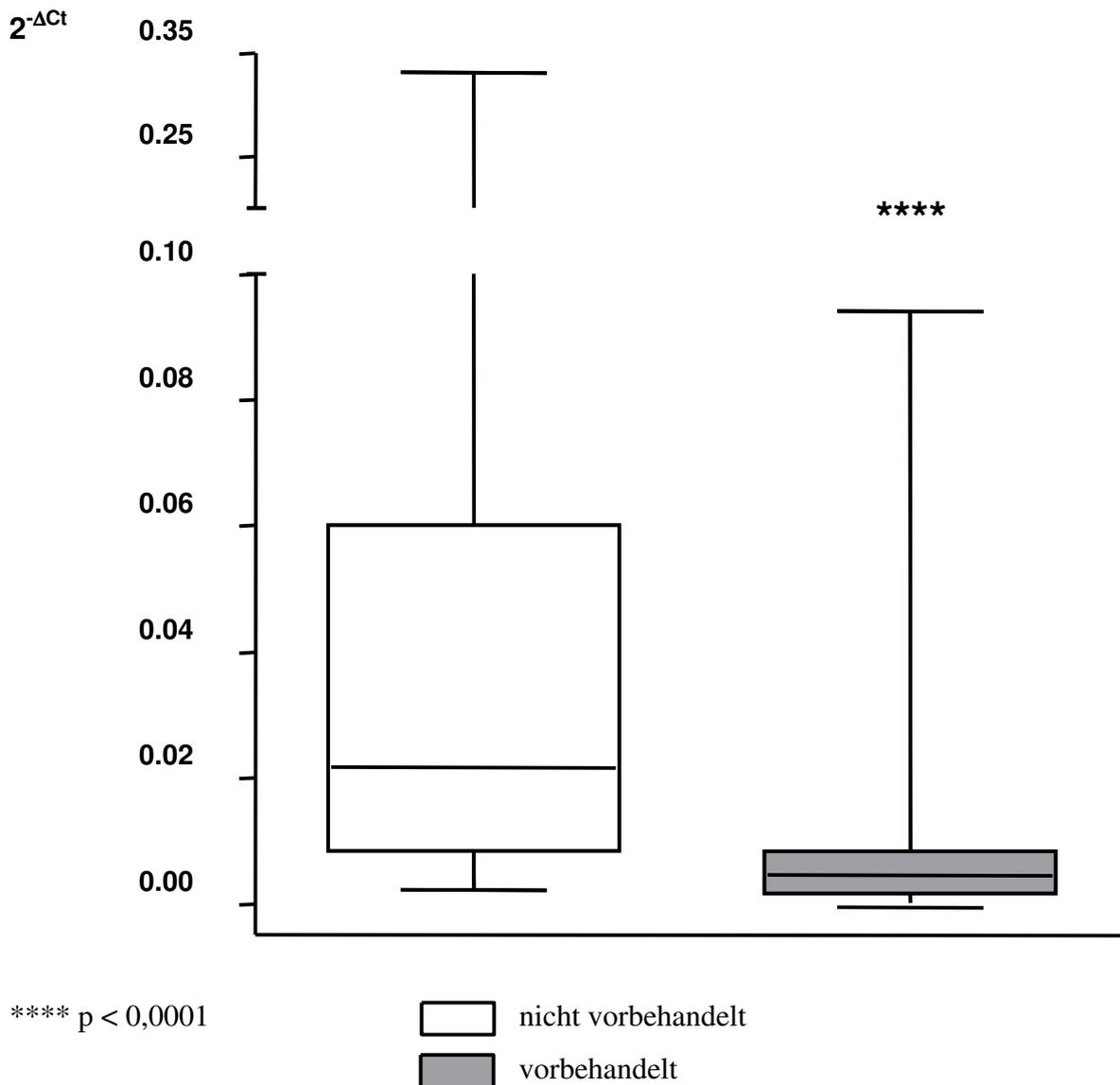


Diagramm 8: Expression von IP-10 in den Leberbiopsien der vorbehandelten und der nicht vorbehandelten Organspender, gemessen durch Real-Time-PCR (TaqMan) (s. Kap. B, Abschnitt 6).

2. Expression der Zytokine im Serum

Für die Auswertung von Serumkonzentration der Zytokine wurden die Proben ausgewertet, die unmittelbar nach der Ankunft des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) und die unmittelbar vor der Laparotomie (Zeitpunkt 2) gewonnen wurden (siehe Kapitel B, Abschnitt 4.1).

Die Serumproben, die zum Zeitpunkt 1 gewonnen wurden, wiesen bei den vorbehandelten Organspendern im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Organspendern eine leicht höhere Konzentration aller bestimmten Zytokine (IL-2, IL-6, TNF- α , MCP, IP-10) auf.

Die im weiteren Verlauf (Zeitpunkt 2) gewonnenen Serumproben zeigten einen Anstieg aller bestimmten Zytokine bei den nicht vorbehandelten Organspendern. Bei den vorbehandelten Organspendern zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Senkung der Serumkonzentration aller bestimmten Zytokine.

2.1. Interleukin-2

Die Konzentration von Interleukin-2 (IL-2) war in den Serumproben der vorbehandelten Organspender zum Zeitpunkt 1 höher, als bei den nicht vorbehandelten Spendern. Im weiteren Verlauf änderte sich dieser Sachverhalt. In den Serumproben, die zum Zeitpunkt 2 gewonnen wurden, zeigte sich eine geringere Serumkonzentration von IL-2 bei den vorbehandelten Organspendern. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern zeigte sich eine höhere Serumkonzentration von IL-2. Mit $p < 0,01$ ist der Anstieg der Serumkonzentration des IL-2 bei den nicht vorbehandelten Organspendern signifikant. Der Abfall der Serumkonzentration von IL-2 ist mit $p < 0,01$ bei den vorbehandelten Organspendern ebenfalls deutlich signifikant (Diagramm 9).

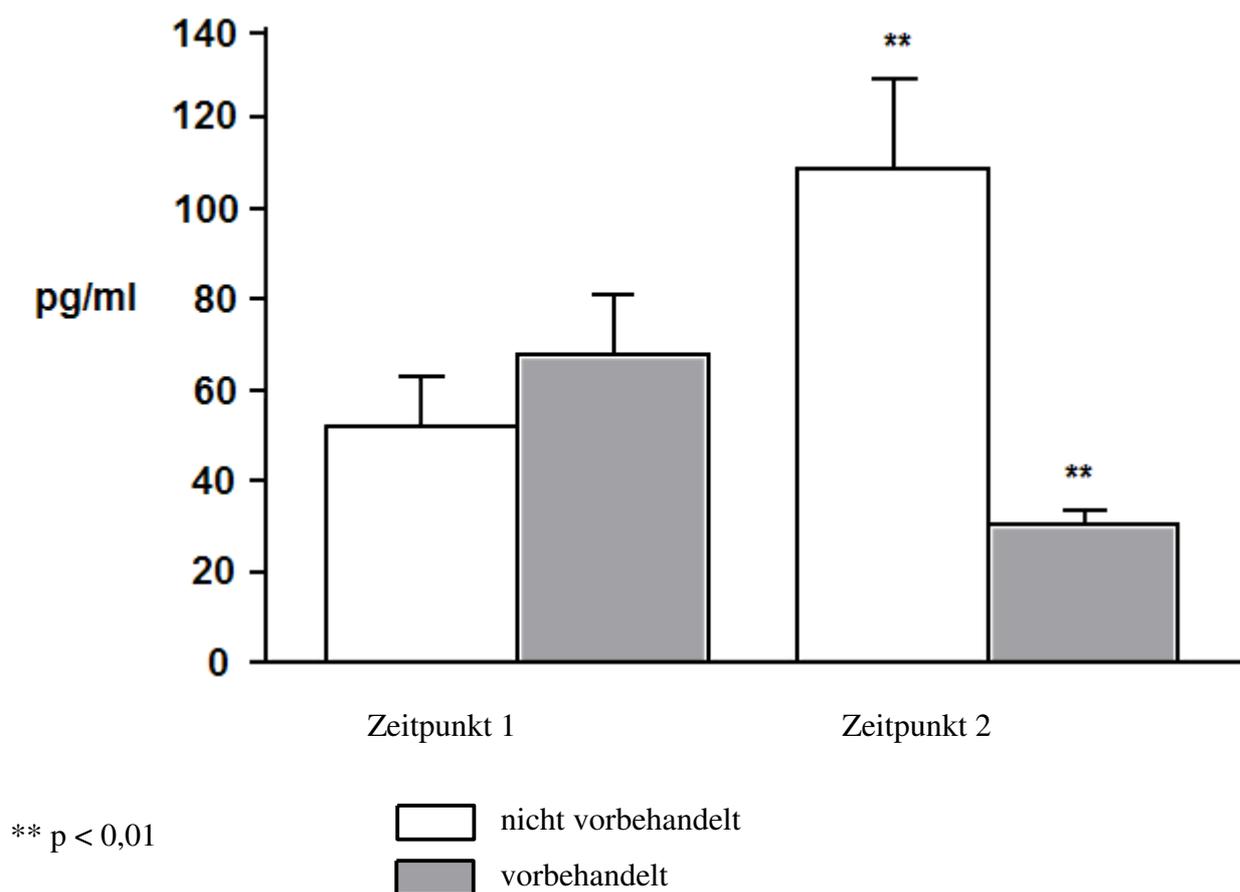


Diagramm 9: Serumkonzentration von IL-2 nach der Ankunft des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) und unmittelbar vor der Laparotomie des Organspenders (Zeitpunkt 2), gemessen durch Cytometric Bead Array System (CBA) (s. Kap. B, Abschnitt 7).

2.2. Interleukin-6

Bei den vorbehandelten Spendern war die Serumkonzentration von Interleukin-6 (IL-6) zum Zeitpunkt 1 höher, als bei den nicht vorbehandelten Spendern. In den Serumproben, die zum Zeitpunkt 2 gewonnen wurden, zeigte sich ein signifikanter Abfall der Serumkonzentration von IL-6 bei den vorbehandelten Spendern im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Spendern. Mit $p < 0,01$ ist das Ergebnis ebenfalls deutlich signifikant (Diagramm 10).

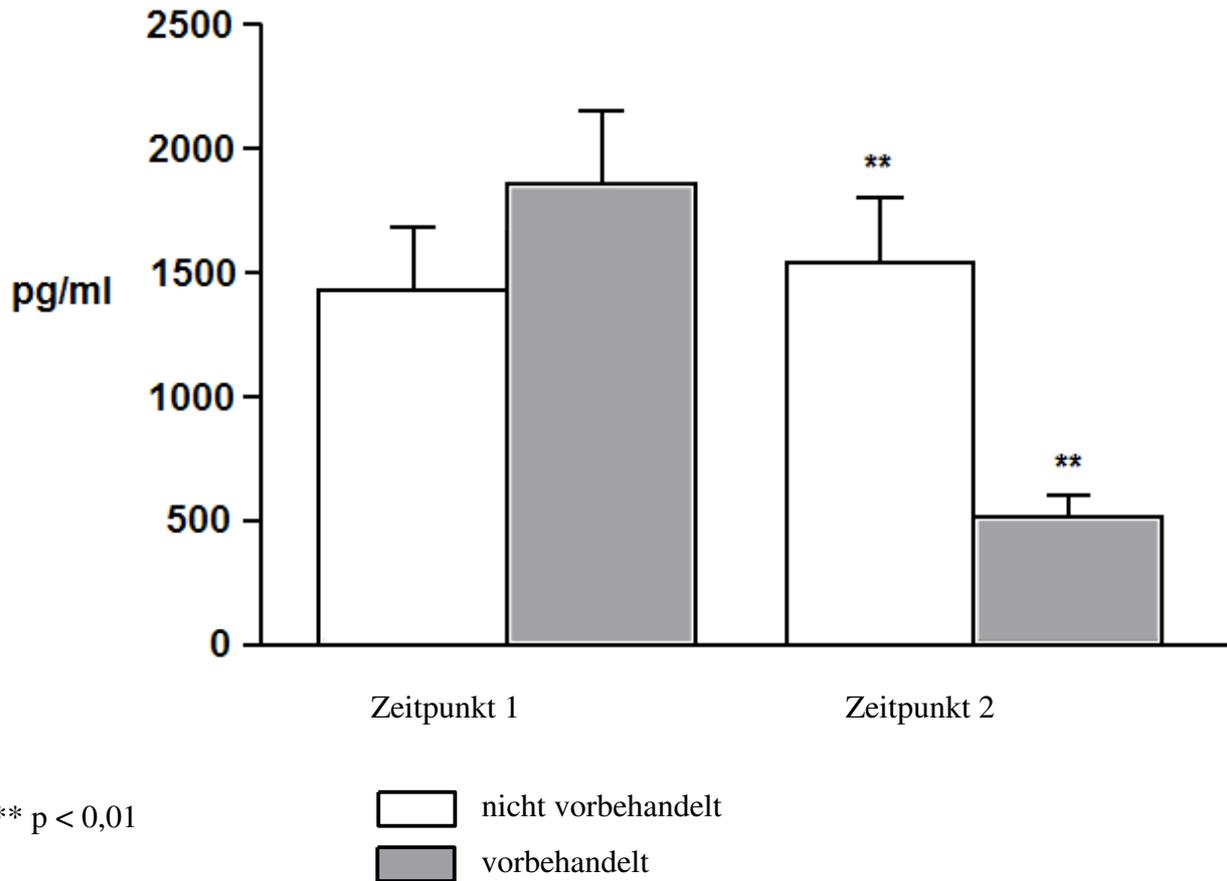


Diagramm 10: Serumkonzentration von IL-6 nach der Ankunft des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) und unmittelbar vor der Laparotomie des Organspenders (Zeitpunkt 2), gemessen durch Cytometric Bead Array System (CBA) (s. Kap. B, Abschnitt 7).

2.3. Tumor-Nekrose-Faktor- α

Auch die Serumkonzentration von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) war zum Zeitpunkt 1 bei den vorbehandelten Spendern erhöht, sank jedoch im weiteren Verlauf (Zeitpunkt 2) signifikant. Bei den nicht vorbehandelten Spendern hingegen war ein Anstieg der Serumkonzentration von TNF- α zu beobachten. Mit $p < 0,01$ sind sowohl der Konzentrationsabfall bei den vorbehandelten Spendern als auch der Konzentrationsanstieg bei den nicht vorbehandelten Spendern deutlich signifikant (Diagramm 11).

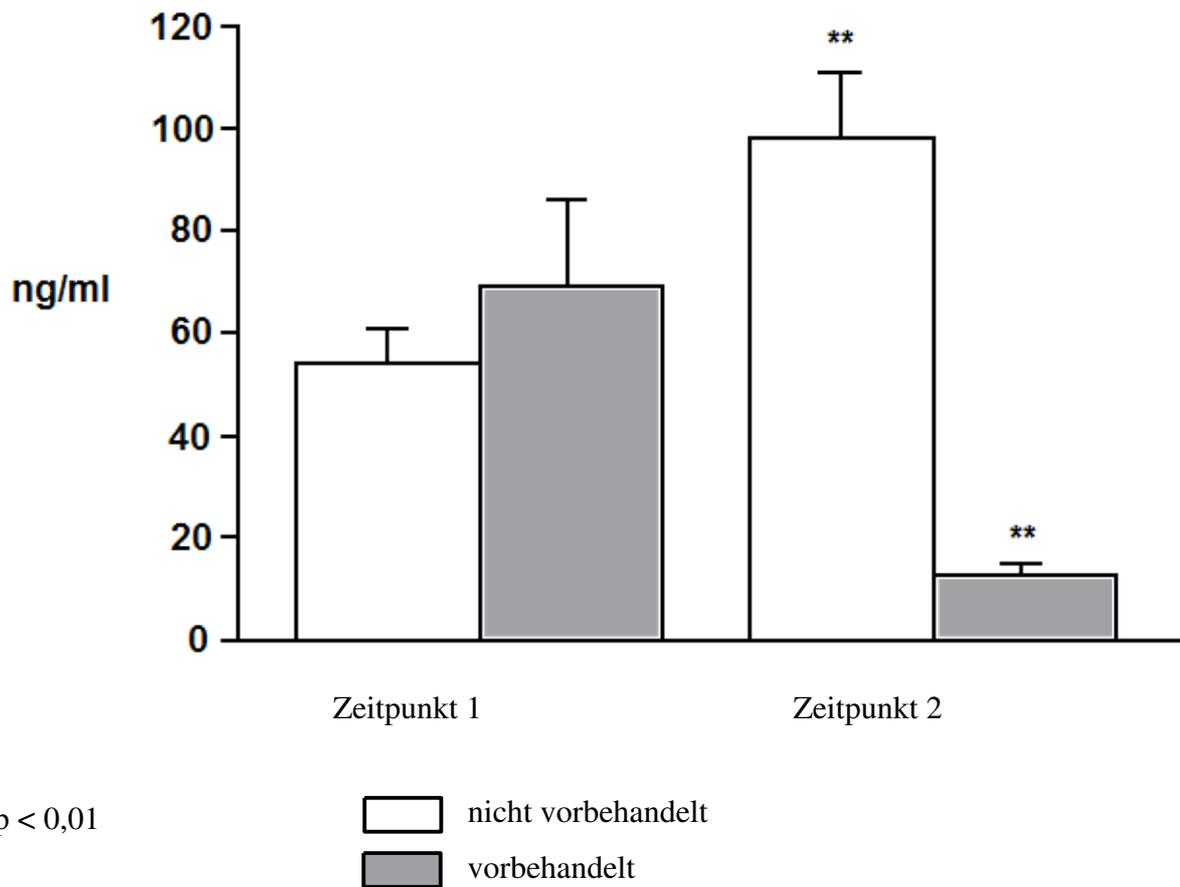


Diagramm 11: Serumkonzentration von TNF- α nach der Ankunft des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) und unmittelbar vor der Laparotomie des Organspenders (Zeitpunkt 2), gemessen durch Cytometric Bead Array System (CBA) (s. Kap. B, Abschnitt 7).

2.4. Monocyte-Chemotactic-Protein-1

Die Serumkonzentration von Monocyte-Chemotactic-Protein-1 (MCP-1) war bei den vorbehandelten Spendern durchgehend niedriger als bei den nicht vorbehandelten Spendern (zum Zeitpunkt 1 und zum Zeitpunkt 2). Die Differenz nahm im Verlauf deutlich zu: Bei den vorbehandelten Spendern zeigte sich ein signifikanter Abfall der Serumkonzentration von MCP-1, wogegen bei den nicht vorbehandelten Spendern eine signifikante Erhöhung der Konzentration beobachtet wurde. Mit $p < 0,01$ sind sowohl der Konzentrationsabfall bei den vorbehandelten Spendern als auch der Konzentrationsanstieg bei den nicht vorbehandelten Spendern deutlich signifikant (Diagramm 12).

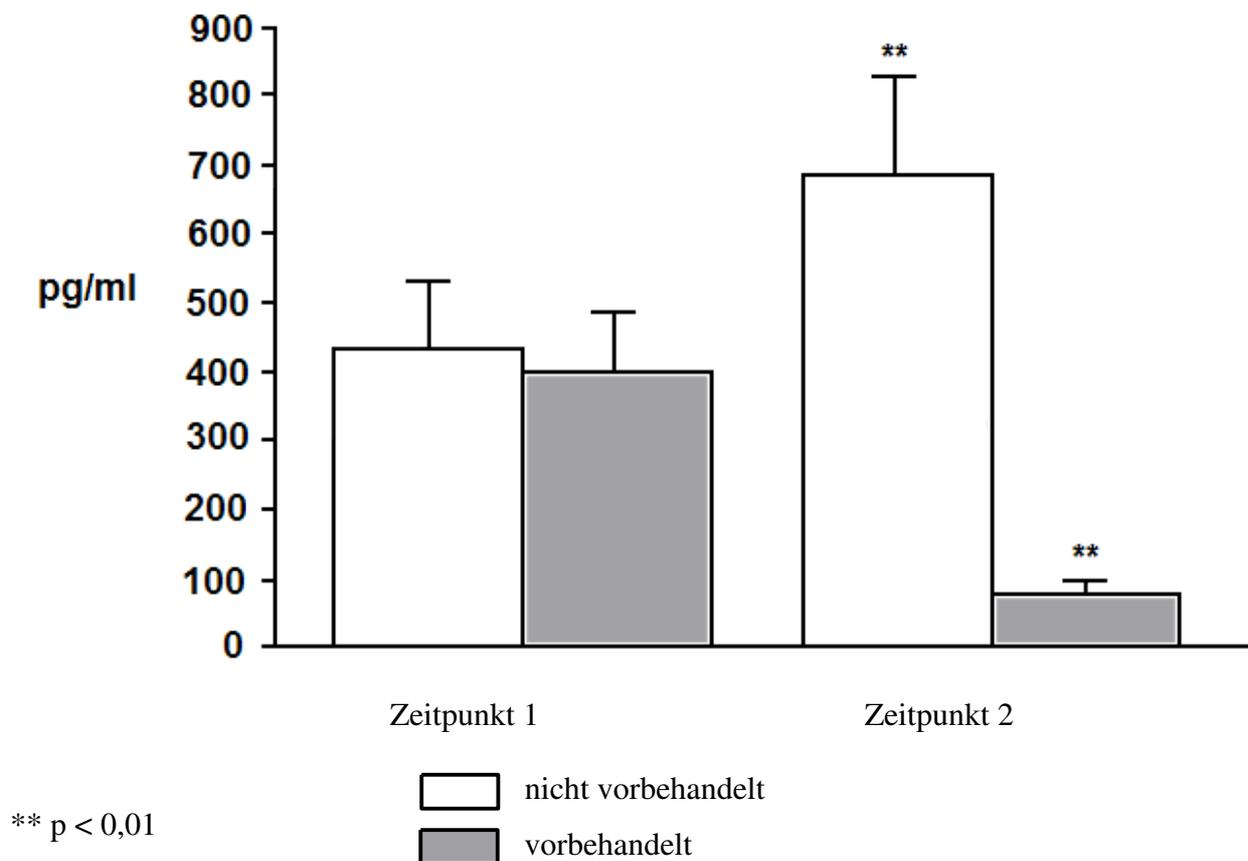


Diagramm 12: Serumkonzentration von MCP-1 nach der Ankunft des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) und unmittelbar vor der Laparotomie des Organspenders (Zeitpunkt 2), gemessen durch Cytometric Bead Array System (CBA) (s. Kap. B, Abschnitt 7).

2.5. Interferon-Protein-10

Die Serumkonzentration von Interferon-Protein-10 (IP-10) war zum Zeitpunkt 1 bei den vorbehandelten Organspendern höher als bei den nicht vorbehandelten Spendern. Im weiteren Verlauf (Zeitpunkt 2) zeigte sich auch hier ein deutlicher Abfall der Serumkonzentration von IP-10 bei den vorbehandelten Organspendern. Bei den nicht vorbehandelten Organspendern konnte ein klarer Anstieg der Serumkonzentration festgestellt werden. Mit $p < 0,01$ sind sowohl der Konzentrationsabfall bei den vorbehandelten Spendern als auch der Konzentrationsanstieg bei den nicht vorbehandelten Spendern deutlich signifikant (Diagramm 13).

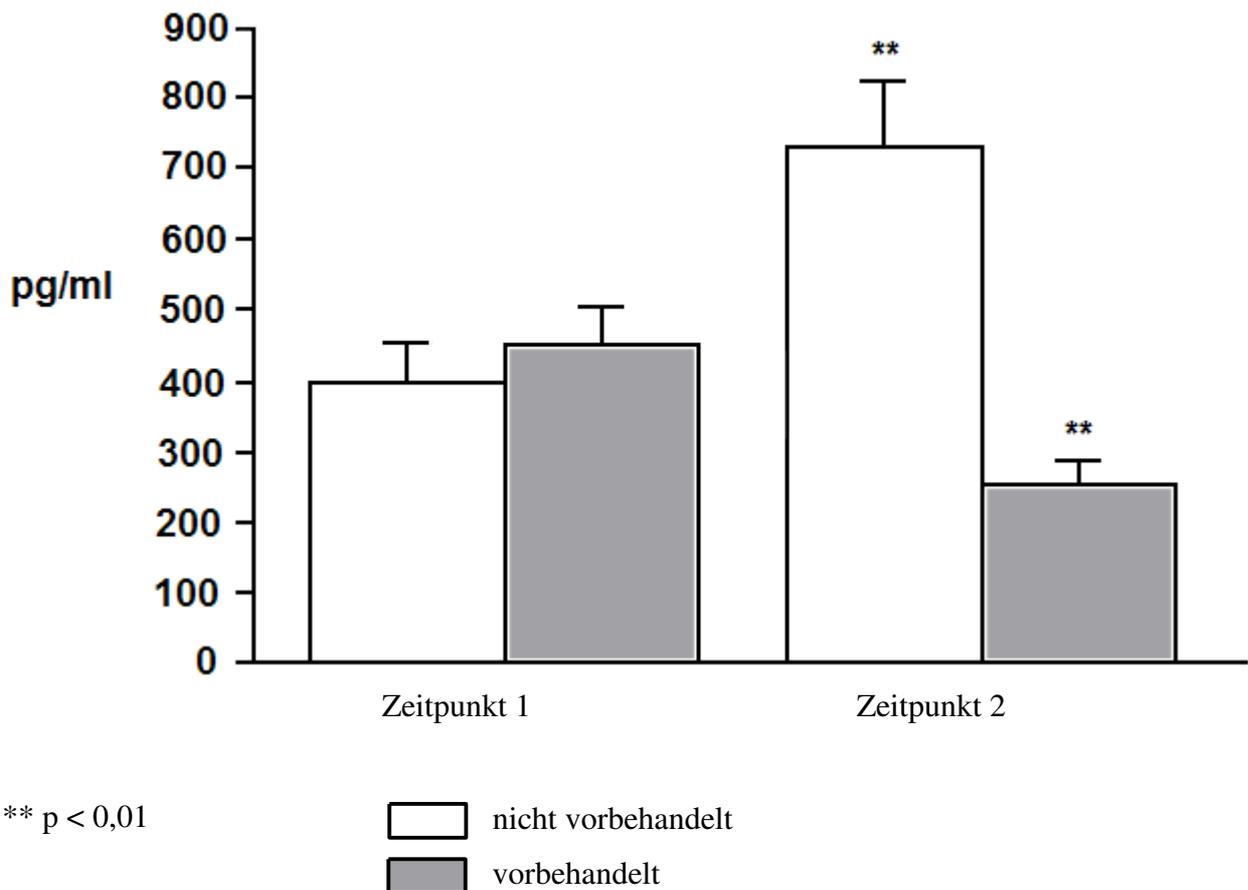


Diagramm 13: Serumkonzentration von IP-10 nach der Ankunft des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) und unmittelbar vor der Laparotomie des Organspenders (Zeitpunkt 2), gemessen durch Cytometric Bead Array System (CBA) (s. Kap. B, Abschnitt 7).

3. Serumkonzentration von Kortisol

Die Serumkonzentration von Kortisol war zum Zeitpunkt 1 bei beiden Gruppen in etwa gleich hoch. Im weiteren Verlauf (Zeitpunkt 2) fiel jedoch die Serumkonzentration von Kortisol bei den nicht vorbehandelten Spendern, während sie bei den vorbehandelten Spendern deutlich anstieg. Mit $p < 0,01$ sind sowohl der Konzentrationsanstieg bei den vorbehandelten Spendern als auch der Konzentrationsabfall bei den nicht vorbehandelten Spendern deutlich signifikant (Diagramm 14).

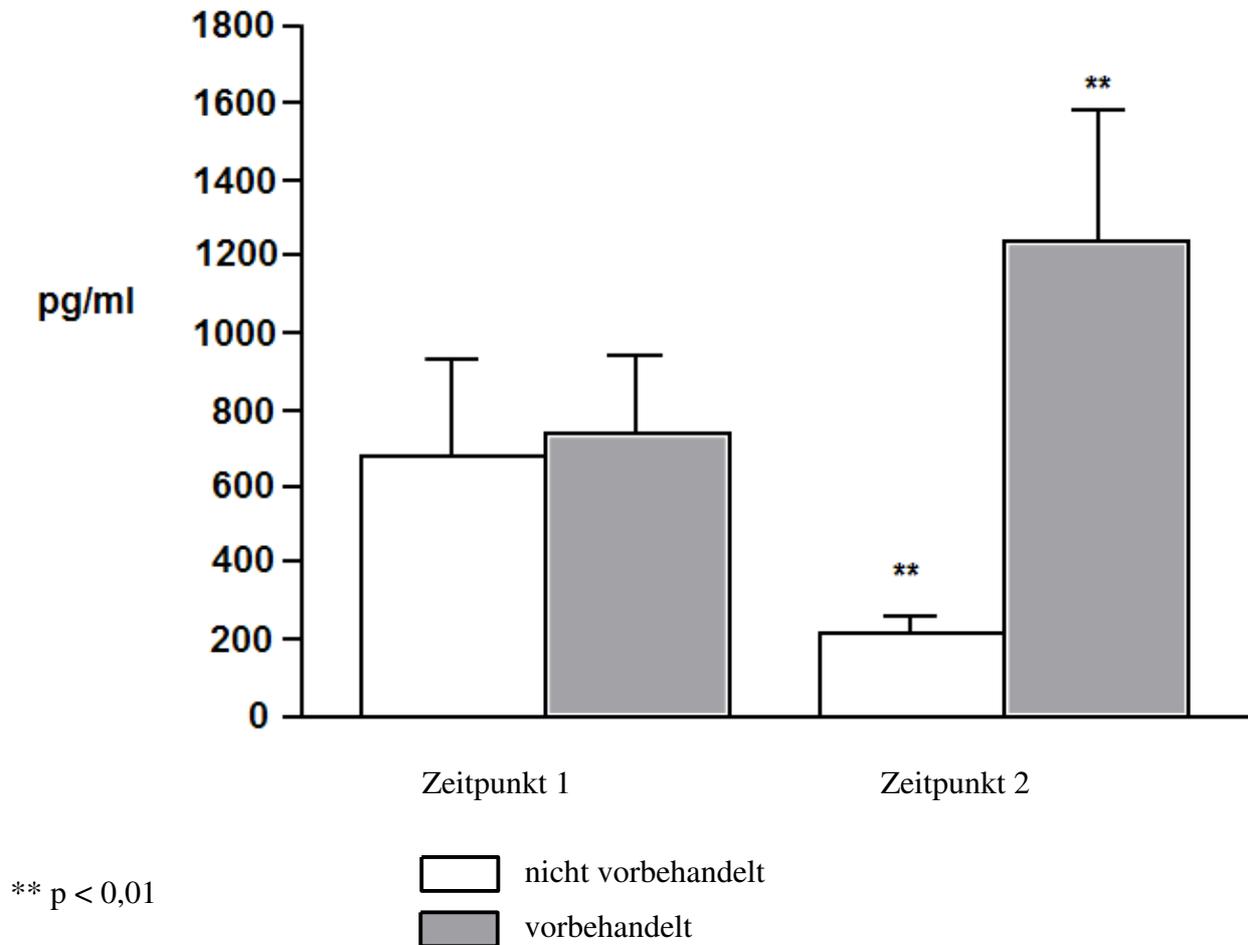


Diagramm 14: Serumkonzentration von Kortisol nach dem Eintreffen des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) sowie unmittelbar vor der Laparotomie des Organspenders (Zeitpunkt 2).

4. Klinisch-chemische Parameter im postoperativen Verlauf

4.1. Aspartat-Aminotransferase

Der postoperative Verlauf von Aspart-Aminotransferase (AST) bei den Organempfängern weist deutliche Unterschiede bezüglich der Vorbehandlung der Organspender. Sowohl am dritten als auch am zehnten postoperativen Tag war die Serumkonzentration von AST bei den Organempfängern, die ein vorbehandeltes Organ bekamen, signifikant geringer. Mit mit $p < 0,01$ ist das Ergebnis deutlich signifikant (Diagramm 15).

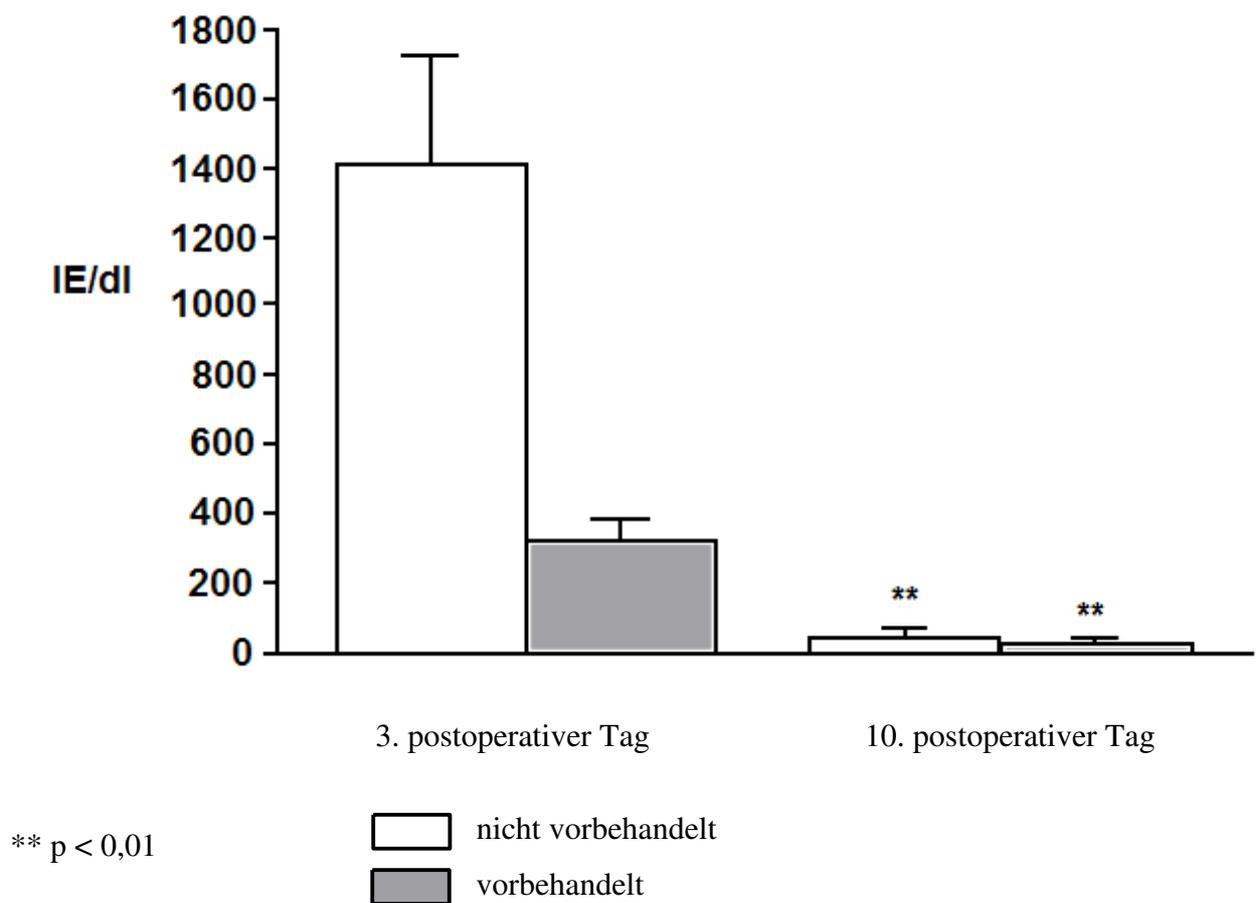


Diagramm 15: Serumkonzentration von AST bei den Organempfängern vorbehandelter und nicht vorbehandelter Organe am dritten und am zehnten postoperativen Tag.

4.2. Bilirubin

Die Bilirubinkonzentration war sowohl am zehnten postoperativen Tag als auch sechs Monate nach der Transplantation bei den Organempfängern mit einem vorbehandelten Organ mit $p < 0,01$ signifikant niedriger (Diagramm 16).

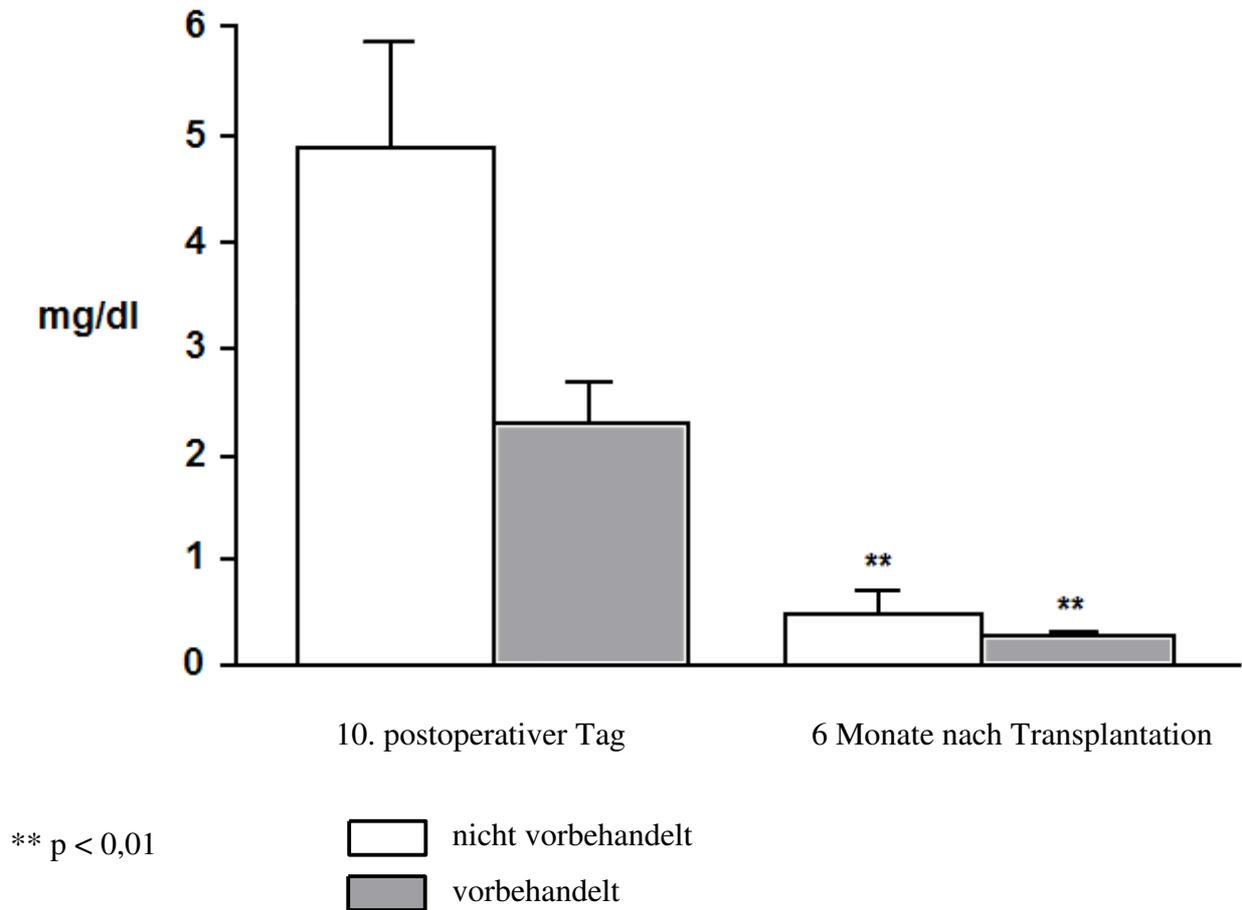


Diagramm 16: Serumkonzentration von Bilirubin bei den Organempfängern vorbehandelter und nicht vorbehandelter Organe am zehnten postoperativen Tag und sechs Monate nach der Transplantation.

5. Ischemic Type Biliary Lesions und Rejektion

Sowohl die Rate von Ischemic Type Biliary Lesions (ITBL) als auch die Rate der Rejektionen war in der Gruppe der Organempfänger mit einem vorbehandelten Organ in den ersten sechs Monaten nach der Transplantation deutlich niedriger. Beide Ergebnisse sind mit $p < 0,01$ deutlich signifikant (Diagramm 17).

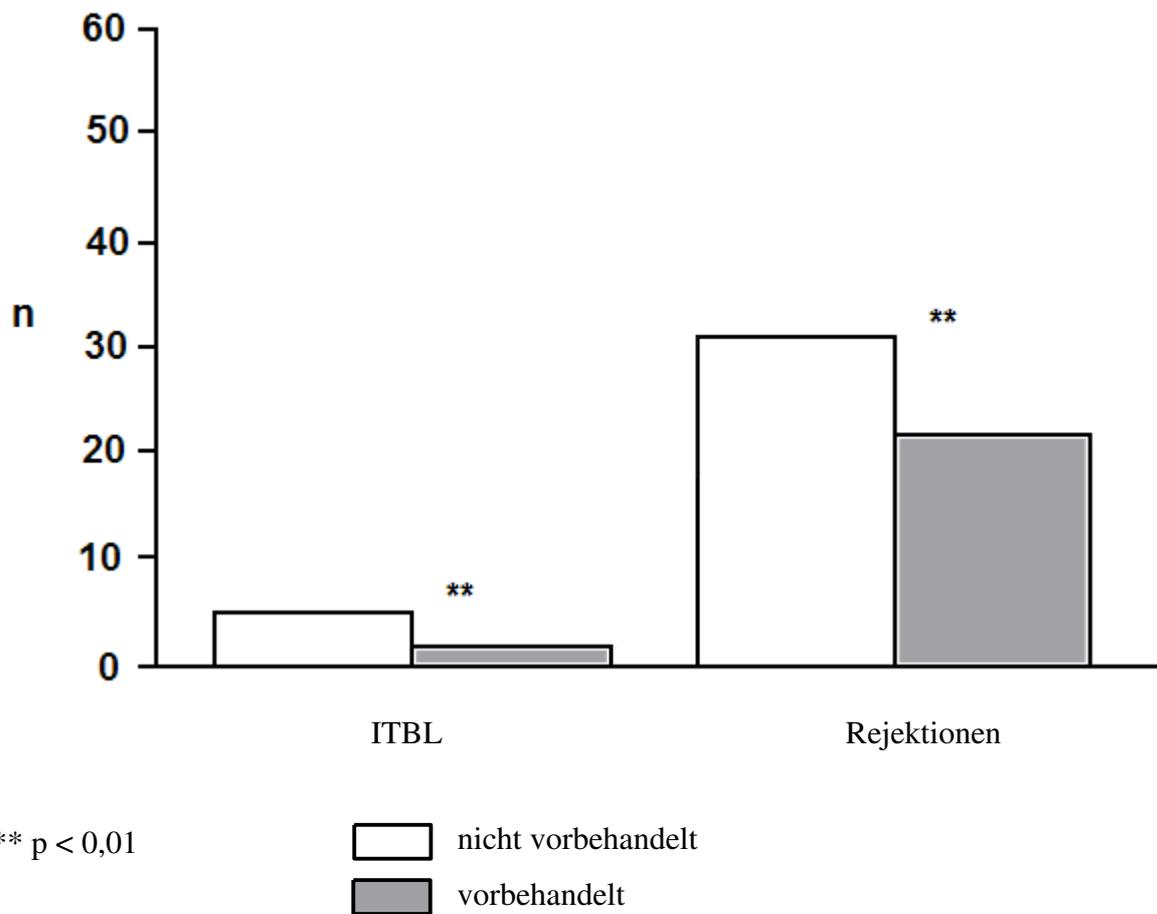


Diagramm 17: Die Rate von ITBL und von Rejektionen bei den Organempfängern vorbehandelter und nicht vorbehandelter Organe sechs Monate nach der Transplantation.

D Diskussion

In den Anfängen der Transplantationsära wurden für die erste erfolgreiche Serie der Nierentransplantationen ausschließlich Organe von Lebendspendern verwendet. Mit dem Fortschreiten der klinischen Etablierung dieser Behandlungsmethode bildete sich eine deutliche Diskrepanz zwischen dem Organbedarf und der zur Verfügung stehenden Organmenge. Es wurden Möglichkeiten zur Vergrößerung des Organpools gesucht. Etwa ab dem Jahre 1950 war die maschinelle Beatmung von Schwerverletzten möglich und damit auch eine vorübergehende intensivmedizinische Stabilisierung der herzschlagenden Leichen. In dieser Zeit entstand die Prägung des Begriffes Hirntod. Inzwischen stammen die meisten transplantierten Organe von hirntoten Organspendern (2).

Lange Zeit wurde der Hirntod als ein statischer Zustand ohne Auswirkung auf die peripheren Organe angesehen. In den 90er-Jahren wurde jedoch bei verschiedenen Nierentransplantationsstudien ein konstant besseres Organüberleben von den Transplantaten der Lebendspender im Vergleich zu den Organen der Leichenspender beobachtet. Diese Beobachtungen führten zur Annahme, dass der Hirntod eine schädigende Wirkung auf die peripheren Organe ausübt (67,120,121).

Die Erhöhung der Immunogenität in den peripheren Organen nach dem Hirntod wurde zum ersten Mal von Tilney et al. beschrieben. Hierbei wurde nach einer explosiven Hirntodinduktion bei Ratten eine massive immunologische Aktivierung im Gewebe der peripheren Organe beobachtet (75). Andere Studien zeigten ebenfalls einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine sowie der korrespondierenden Proteine nach der Hirntodinduktion bei Versuchstieren (52,74,75,79). In den myokardialen Biopsien humaner hirntoter Spender konnte ebenfalls eine erhöhte Transkriptionsrate der Zytokine IL-6 und TNF- α gezeigt werden (122,123). Diese immunologische Antwort fördert unter anderem die Migration von PMNL, T-Zellen und Makrophagen in die peripheren Organe (124,125).

In der Analyse der klinischen Daten der Nierenempfänger in Department of Nephrology in Madrid konnten Barrientos et al. den Hirntod als Risikofaktor für eine akute vaskuläre Rejektion der Transplantate identifizieren (126). Wilhelm et al. konnten zeigen, dass neben einer erhöhten Transkriptionsrate der inflammatorischen Zytokine in den Herzen hirntoter Ratten diese nach der Transplantation auch schneller abgestoßen werden als die Transplantate von den lebenden Spendern (76,127). Auch Segel et al. lieferten vergleichbare Ergebnisse im Rattentransplantationsmodell (128).

Im Jahre 2007 ist es Pratschke et al. gelungen, eine deutlich höhere Zytokinexpression, eine vermehrte Expression von MHC Klasse II sowie eine vermehrte Zellinfiltration von CD3 und CD25 positiven Zellen in den Organen der verstorbenen humanen Spender im Vergleich zu den Organen der lebenden humanen Spender zu belegen. Zusätzlich konnten bei den Empfängern der von den hirntoten Spendern stammenden Organe erhöhte Leberwerte, eine erhöhte Bilirubinkonzentration sowie eine erhöhte Rate von PNF im klinischen Verlauf gezeigt werden (81).

Ausgehend von diesen Daten wurden verschiedene Überlegungen zur Minderung der durch den Hirntod hervorgerufenen Inflammation und somit auch Minderung der durch sie hervorgerufenen Organschädigung angestellt. Hierzu existierten bereits mehrere Ansätze.

Einer dieser Ansätze war die Applikation des P-Selektin Glucoprotein Ligand (sPSGL) und somit Antagonisierung von P-, E- und L-Selektin. Hierdurch konnte eine Verbesserung der Nierentransplantate sowie die Reduzierung der Rejektion bei Ratten erreicht werden (129,130).

Ein anderer Weg zur Minderung der durch den Hirntod hervorgerufenen Organschädigung ist die Steigerung der Expressierung von Hämoxxygenase-1 (HO-1), zum Beispiel durch die Applikation von Cobalt Protoporphyrin (CoPP). Pratschke et al. gelang es, eine erhöhte Expressierung von HO-1 sowie eine signifikant bessere Überlebensrate bei Ratten nach einer Nierentransplantation durch die Applikation von Cobalt Protoporphyrin (CoPP) zu erreichen (131).

Ein weiterer Ansatz ist die Spendervorbehandlung mit Kortikosteroiden. Diese Vortherapie hat den Vorteil, dass sie ungefährlich ist und sich bei Menschen leicht durchführen lässt. Durch die Vorbehandlung der Schweine mit Glukokortikoiden konnte eine Verbesserung der Funktion der Herztransplantate bei Schweinen erzielt werden (132,133). Tilney et al. konnten eine deutliche Verbesserung der Überlebensrate bei Ratten nach einer Nierentransplantation durch die Vorbehandlung mit Kortikosteroiden erzielen, die bei den humanen Lebendspendern ähnlich wie die der Ratte ausfiel (129). Auch Novitzki et al. konnten in einer retrospektiven Auswertung der OPTN/UNOS Database eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate der Leber- und Herztransplantate durch die Vorbehandlung der potentiellen Organspender mit Kortikosteroiden zeigen (134). Babcock et al. konnten eine verbesserte Funktion des Lungentransplantats nach der hochdosierten Applikation von Methylprednisolon vor der Organentnahme belegen (135).

In unserer Studie entschieden wir uns für die Vorbehandlung der Organspender mit Methylprednisolon (Urbason®), um der durch den Hirntod hervorgerufenen Inflammation entgegen zu wirken.

Das Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob die Expression inflammatorischer Faktoren im Lebergewebe sowie die Serumkonzentration löslicher inflammatorischer Zytokine durch die

Methylprednisolon-Stoßtherapie der hirntoten Organspender signifikant gesenkt werden kann. Ferner sollte untersucht werden, ob eine Korrelation dieser Ergebnisse mit der Organfunktion nach Transplantation, der Frequenz akuter Abstoßungsepisoden und der ITBL-Rate besteht.

1. Expression der Zytokine in den peripheren Organen

Takada et al. gelang zum ersten Mal der Nachweis einer signifikant erhöhten mRNA-Expression für Makrophagen- und T-Zell-assoziierten Zytokine (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ) in den Gewebeproben von Rattenherzen nach einer 6-stündigen Dauer des Hirntodes (75). Auch in anderen Organen gelang bereits der Nachweis einer erhöhten Transkriptionsrate der Zytokine, hervorgerufen durch den Hirntod. Mehrere Studien zeigten einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine sowie der korrespondierenden Proteine in den peripheren Organen nach der Hirntodinduktion bei Kaninchen und Ratten (52,74,75,79). Plenz et al. konnten in den myokardialen Biopsien der humanen hirntoten Spender eine erhöhte Transkriptionsrate der Zytokine IL-6 und TNF- α zeigen (122,123). Jochum et al. zeigten eine erhöhte Zytokinkonzentration in den Lungentransplantaten nach dem Hirntod in einem Rattenmodell (136). Die Schädigung des Organs bei einer Lungentransplantation erfolgt zum einen direkt über die Ausbildung eines neurogenen pulmonalen Ödems (NPO) und zum anderen über einen inflammatorisch ausgelösten akuten Lungenschaden (ALI). Insbesondere die Zytokine TNF- α und IL-1 spielen hierbei eine Rolle, die endotheliale Zellen zur vermehrten Expressierung von Adhäsionsmolekülen stimulieren (137,138). Zusätzlich wird hierdurch die IL-8 Produktion von endothelialen und epithelialen Zellen der kapillären alveolären Membran stimuliert, was mit dem Auftreten eines frühen Transplantatversagens assoziiert ist (139,140).

Verschiedene Leberzelltypen, unter anderem die sinusoidalen Endothelzellen, vaskuläre Endothelzellen, Ito-Zellen, Hepatozyten, hepatischen Fibroblasten und Kupffer-Zellen exprimieren Zytokin-Gene (141-146). Colombo et al. zeigten weiterhin erhebliche Veränderungen im Transkriptionsprofil der Leber, hervorgerufen durch den Hirntod. Unter anderem zeigte sich hierbei eine signifikante Steigerung der Genexpression für immunologische Genkategorien, unter anderem für die Akute-Phase-Reaktion, Komplemente sowie die Reaktion auf den oxidativen Stress (147).

Im Jahre 2007 gelang es Pratschke et al., eine signifikant höhere Expressionsrate der proinflammatorischen Zytokine in den humanen Leberbiopsien hirntoter Spender zu zeigen (81). Zusätzlich zur erhöhten Zytokinexpression sind die peripheren Organe bei Leichenspendern nicht in der Lage, adäquat auf die Schädigungen durch die Expressierung zytoprotektiver

Enzyme zu reagieren. Unter anderem sind die Zellen durch die Begleitumstände des Hirntodes nicht in der Lage, die HO-1 als Schutz vor den zerstörenden Stimuli in ausreichendem Maß zu exprimieren. Denn trotz der erhöhten Expression der antiapoptotischen Gene induziert der Hirntod im Spenderorgan den Anstieg der Apoptoserate der Hepatozyten (148).

Die erhöhte Expression von Fas und Fas-Ligand (FasL) zeigt die erhöhte Aktivität der durch den Todesrezeptor regulierten Kaskade. Es wurde gezeigt, dass TLR4 eine Rolle hinsichtlich des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) im Maus- und Rattenmodell spielt. Der primäre zelluläre IRI Mediator in der Leber ist die Kupffer-Zelle. Die Kupffer-Zellen werden durch die große Menge der Endotoxine, die durch den Portalkreislauf nach Ischämie-Reperfusion (IR) zirkulieren, aktiviert. Das führt zu deren Reifung und einem deutlichen Anstieg der Expression von TNF- α und TLR4 (149,150). Durch die Vorbehandlung der hirntoten Organspender mit Methylprednisolon konnten wir eine signifikante Senkung der Expression von TNF- α (Diagramm 1) und FasL (Diagramm 5) in dem Lebergewebe der Organspender erreichen.

Der IP-10 fördert unter anderem die Chemotaxis der Monozyten und der T-Zellen und unterstützt die Adhäsion von T-Zellen an den Endothelzellen. Der chemotaktische Effekt wird durch die Bindung am chemokinen Rezeptor CXCR3 erreicht (88). Die erhöhte Expression von IP-10 wurde als Risikofaktor für eine akute Rejektion bei Nierentransplantaten identifiziert (91). Auch die Expression von IP-10 konnte durch die Vorbehandlung der Organspender mit dem Methylprednisolon in unserer Studie signifikant gesenkt werden (Diagramm 8).

Cluster of Differentiation 54 (CD54) ist in geringen Konzentrationen immer an den Zellmembranen der Leukozyten und der Endothelzellen präsent. Durch die Zytokinstimulation (IL-1, TNF- α) wird die Konzentration von CD54 erheblich erhöht. CD54 spielt eine wichtige Rolle in der Adhäsion sowie in der Migration von Leukozyten zu den Inflammationsgebieten. Es wurde bereits der Zusammenhang zwischen der Expression von CD54 und dem erhöhten Grad der Apoptosenrate sowie der erhöhten Rate der Rejektionen beschrieben (151,152). Die Expression von CD54 konnte in den Spenderorganen ebenfalls durch die Vorbehandlung der Organspender mit Methylprednisolon signifikant gesenkt werden (Diagramm 2).

Cluster of Differentiation 80 (CD80) fungiert als Ligand für CD28 an den aktivierten B-Zellen. CD80 ist ein wichtiger Kostimulator der ruhenden T-Zellen. Seine Interaktion mit CTLA-4 an kürzlich aktivierten Zellen kann die Antwort der T-Zellen drosseln (104,105). Auch bei CD80 konnte durch die Vorbehandlung der Organspender mit Methylprednisolon eine verminderte Expression erreicht werden (Diagramm 4).

Im Jahre 1989 wurde von Bahram und Spies die MIC-Familie entdeckt, zu der auch MICA gehört (113). MICA wird im Gegensatz zu den sogenannten klassischen Genen der MHC-I Gruppe nicht ubiquitär exprimiert. Während MICA in Fibroblasten und epithelialen Zelllinien gefunden werden kann, fehlt MICA in der lymphohämatopoetischen Linie. Seine Expression wird durch Zytokine nicht beeinflusst (114). Die Transkription von MICA wird unter anderem durch einen Hitzeschock, oxidativen Stress oder virale Infektionen gesteigert (115-117). Die Erkennung von MICA durch den NKG2D-Rezeptor, der an den NK-Zellen, $\alpha\beta$ - und $\lambda\delta$ -T-Lymphozyten exprimiert wird, führt zur Zellyse (118,119). Die Vorbehandlung der Spender mit Methylprednisolon führte entgegen unseren Erwartungen zur Steigerung der Expression von MICA (Diagramm 6).

Mit Hilfe von HLA Klasse II Komplexes erfolgt die Antigenpräsentation durch die antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie B-Lymphozyten, Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten (109). Jeder HLA Klasse II Komplex besteht aus einer α - und einer β -Kette, die miteinander nicht kovalent verbunden sind (110). HLA-DRB kodiert die β -Kette für den HLA Klasse II Komplex. In der heutigen Nomenklatur werden mehrere verschiedene Loci von HLA-DRB beschrieben (111,112). Der Einfluss des HLA Klasse II Komplexes auf eine Immunantwort hängt nicht nur von der Antigenpräsentation ab, sondern auch von dem Expressionsgrad des Komplexes und demzufolge von dem Expressionsgrad des HLA-DRB als deren Bestandteil (112). Mit der Vorbehandlung der Organspender mit Methylprednisolon konnte die Expression von HLA-DRB supprimiert werden (Diagramm 7).

CD68 ist ein 110 kDa schweres O-glykosiertes Membranprotein (98). Es wird in erster Linie an den Monozyten und Makrophagen exprimiert und dient als deren klassischer Marker (99,100). Seine Funktion ist in diesen Zellen unbekannt. Es wird postuliert, dass CD68 in der Zelladhäsion und in der Antigenpräsentation beteiligt ist (101). Jassem et al. beschrieben eine signifikant erhöhte Expression von CD3-Lymphozyten, CD68-Makrophagen sowie eine signifikant intensivere FasL-Färbung bei den Organen toter Spender (153). Bei der Expression von CD68 konnten wir entgegen unseren Erwartungen eine signifikante Steigerung der Expression durch die Vorbehandlung mit Methylprednisolon zeigen (Diagramm 3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon die Expression von TNF- α , CD54, CD80, FasL, IP-10 und HLA-DRB signifikant gesenkt wird, was auf die Minderung der durch den Hirntod hervorgerufenen Inflammation und demzufolge auf die bessere Qualität der Organe deutet. Bei der Expression

von CD68 und MICA konnte jedoch eine signifikante Steigerung unter der Vortherapie mit Methylprednisolon festgestellt werden.

Unsere Ergebnisse stützen die bereits durch Novitzki et al. durchgeführte retrospektive Auswertung der OPTN/UNOS Database, die eine signifikante Besserung der Überlebensrate der Leber- und Herztransplantate durch die Vorbehandlung der Organspender mit Kortikosteroiden ergab (134). Ferner stützen unsere Daten die aus den Tiermodellen bereits bekannte Besserung der Transplantatfunktion der Kadaverspender durch die Therapie mit Kortisol (129,132,133).

2. Systemische Inflammation

In diesem Teil der Studie wurde der Einfluss der Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon auf die Konzentration der löslichen Zytokine sowie die des Kortisons im Serum untersucht.

In den Serumproben, die unmittelbar nach dem Eintreffen des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) gewonnen wurden, zeigte sich zwar eine etwas höhere Serumkonzentration von IL-2, IL-6, TNF- α und IP-10 bei den vorbehandelten Organspendern (Diagramme 9-11, 13). Unmittelbar vor der Laparotomie (Zeitpunkt 2) lag bei den vorbehandelten Organspendern jedoch eine signifikant geringere Serumkonzentration bei allen aufgezählten Zytokinen vor (Diagramme 9-11, 13). Die Serumkonzentration von MCP-1 war bei den vorbehandelten Organspendern sowohl unmittelbar nach dem Eintreffen des DSO-Teams (Zeitpunkt 1) als auch unmittelbar vor der Laparotomie (Zeitpunkt 2) geringer (Diagramm 12). Somit konnte die systemische Inflammation insbesondere im Verlauf durch die Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon signifikant gesenkt werden.

In der Gruppe der vorbehandelten Organspender zeigte sich eine signifikant höhere Serumkonzentration von Kortisol. Vor allem unmittelbar vor der Laparotomie (Zeitpunkt 2) war die Serumkonzentration von Kortisol deutlich erhöht. (Diagramm 14).

Diese Ergebnisse stützen ebenfalls die bereits durch Novitzki et al. durchgeführte retrospektive Auswertung der OPTN/UNOS Database mit einer signifikanten Besserung der Überlebensrate der Leber- und Herztransplantate durch die Vorbehandlung mit Kortikosteroiden sowie verschiedene Tiermodelle zur Besserung der Transplantate durch die Kortisontherapie (129,132-134).

3. Einfluss der Kortikosteroidtherapie auf die initiale Transplantatfunktion

In den vergangenen Jahrzehnten entwickelte sich die Lebertransplantation zu einer etablierten Therapie bei Lebererkrankungen im Endstadium. Insbesondere durch die Entwicklung und den

Einsatz neuer immunsuppressiver Substanzen sowie durch ein verbessertes Management konnten die Überlebensraten der Empfänger und der Transplantate signifikant gesteigert werden. Jedoch stellt die Primäre Dysfunktion (PDF) eine schwere Komplikation nach der orthotopen Lebertransplantation dar und beeinflusst signifikant die Morbidität und Mortalität der Organempfänger (154,155). Die Primäre Nicht-Funktion (PNF) des Transplantates stellt eine besonders schwerwiegende Komplikation nach einer Lebertransplantation dar und führt ohne einer Retransplantation rasch zum Tod des Empfängers. Die schnell ansteigenden Serum-Transaminasen, eine geringe Galleproduktion sowie das Auftreten schwerer Koagulopathien sind für PDF und PNF kennzeichnend (156).

Zur Beurteilung der initialen Transplantatfunktion wurden als laborchemische Parameter die Serumkonzentrationen von AST und ALT am 3. und am 10. postoperativen Tag sowie die Serumkonzentration von Bilirubin am 10. postoperativen Tag von den Organempfängern ausgewertet.

ALT und AST sind etablierten laborchemischen Parameter zur quantitativen Einschätzung des ischämischen Konservierungsschadens und der initialen Funktion des Organs nach Lebertransplantation (157,158). Höhere Konzentrationen sind Zeichen eines größeren hepatozellulären Schadens und einer schlechteren Organfunktion nach Reperfusion (159). AST kommt insbesondere in den Mitochondrien in hohen Konzentrationen vor. Die Serumkonzentration von AST korreliert mit dem Ausmaß der Lebernekrose (160,161). Die Serumkonzentration von AST war bei den Organempfängern der vorbehandelten Spender sowohl am 3. als auch am 10. postoperativen Tag signifikant geringer, was auf einen niedrigeren frühen postoperativen Organschaden bei den Empfängern vorbehandelter Organe hinweist (Diagramm 15). Die Serumkonzentration von ALT wies bei den Organempfängern keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf.

Bilirubin wird als Abbauprodukt von Hämoproteinen von der Leber über die Gallenflüssigkeit eliminiert. Eine Funktionsstörung der Leber ergibt einen Anstieg der Serumkonzentration von Gesamtbilirubin bei ungenügender bzw. ausbleibender Elimination über die Gallenflüssigkeit. Somit ist mithilfe der Serumkonzentration des Gesamtbilirubins eine Abschätzung der Leberfunktion möglich. Die Serumkonzentration von Bilirubin war am 10. postoperativen Tag ebenfalls signifikant geringer bei den Empfängern der vorbehandelten Organe, was für eine bessere Transplantatfunktion in dieser Gruppe spricht (Diagramm 16).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich durch die Vortherapie mit Methylprednisolon sowohl ein geringerer Organschaden als auch eine bessere initiale Transplantatfunktion bei den Empfängern erzielen lässt. Diese Ergebnisse decken sich mit den bereits von den Tiermodellen

bekanntem Daten (129,132,133). Ferner decken sich diese Ergebnisse mit den Daten von Nowitzki et al. sowie mit den Ergebnissen von Rosengard et al., die ebenfalls eine signifikant bessere Überlebensrate der Leber- und Herztransplantate durch die Vorbehandlung mit Kortikosteroiden in retrospektiven Analysen belegten (134,168).

4. Einfluss der Kortikosteroidtherapie auf die Rate von Ischemic Type Bile Lesions

Die Ischemic Type Bile Lesions (ITBL) ist eine gefürchtete Gallengangskomplikation nach einer orthotopen Lebertransplantation. Hierbei kommt es zur Zerstörung der Gallengänge der Spenderleber. Die Inzidenz von ITBL variiert von 1 bis 19 Prozent (162). Der genaue pathologische Mechanismus der ITBL ist bis heute unklar. Einige Autoren vermuten, dass immunologische Effekte zu Spasmen der hepatischen Arterien führen, die wiederum Hypoxämie und Nekrosen des biliären Systems verursachen (163). Die beschriebenen Risikofaktoren sind die kalte Ischämiezeit und die AB0-Inkompatibilität (163,164). In der Regel tritt die ITBL drei bis sechs Monate nach der Lebertransplantation auf und führt zur Destruktion der Gallengänge sowie deren entzündlichen Stenosen (165). Eine frühe Retransplantation ist im Falle von ITBL indiziert (166). In unserer Studie wiesen die Empfänger der vorbehandelten Organe eine signifikant niedrigere Rate von ITBL in den ersten sechs Monaten nach der Transplantation auf (Diagramm 17).

Diese Ergebnisse stimmen ebenfalls mit der bereits durch Novitzki et al. durchgeführten retrospektiven Auswertung der OPTN/UNOS Database, die eine signifikante Besserung der Überlebensrate der Leber- und Herztransplantate durch die Vorbehandlung mit Kortikosteroiden ergab, überein (134). Die aus den Tiermodellen bereits bekannte Besserung der Transplantatfunktion der Kadaverspender durch die Therapie mit Kortisol wird durch unsere Studie ebenfalls gestützt (129,132,133). Auch die Daten von Rosengard et al., bei denen das gleiche Therapieprotokoll zur Senkung der Transplantatdysfunktionen führte und das frühe Überleben bei 4,543 Herzempfängern erhöhte, decken sich mit unseren Ergebnissen (167).

5. Einfluss der Kortikosteroidtherapie auf die Rejektionsrate

Der Grad der HLA-Übereinstimmung ist ein allgemein anerkannter Alloantigen-abhängiger Faktor, der die Frequenz und Intensität akuter Rejektionen nach Transplantation in großem Maße beeinflusst (168). Die Rate der akuten Abstoßungsperioden ist ein Hauptrisikofaktor bei der Entwicklung der chronischen Transplantatdysfunktion und ist somit von großer Bedeutung für den Langzeitverlauf (169). Gillingham et al. konnten eine enge Korrelation zwischen der Anzahl akuter Abstoßungen und der Entwicklung einer chronischen Rejektion belegen (170). Durch die

akuten Abstoßungen wird ein progredienter Verlust des funktionellen Parenchyms mit der folgenden funktionellen Überlastung des verbleibenden Restparenchyms im transplantierten Organ verursacht (168). Das führt zu einer progredienten Destruktion luminärer Strukturen und kann als proliferative Reaktion auf eine vorausgegangene Inflammation im Sinne eines Reparaturmechanismus gedeutet werden. Pathophysiologisch kann der Vorgang als eine zytokinvermittelte Proliferation und Fibrose angesehen werden (171).

In unserer Studie zeigte sich eine signifikant niedrigere Rate der Rejektionen bei den Empfängern der vorbehandelten Organe. Das spricht für die bessere Transplantatfunktion der vorbehandelten Transplantate in den ersten sechs Monaten nach der Transplantation (Diagramm 17).

Auch diese Ergebnisse stützen die bereits durch Novitzki et al. durchgeführte retrospektive Auswertung der OPTN/UNOS Database, die eine signifikante Besserung der Überlebensrate der Leber- und Herztransplantate durch die Vorbehandlung mit Kortikosteroiden ergab (134). Ferner stützen unsere Daten die aus den Tiermodellen bereits bekannte Besserung der Transplantatfunktion der Kadaverspender durch die Therapie mit Kortison (129,132,133).

E Zusammenfassung

Die traumatischen pathophysiologischen Ereignisse während des Hirntodes haben einen negativen Einfluss auf die Qualität und spätere Funktionalität der periphereren Organe, unter anderem durch die gesteigerte Expression der proinflammatorischen Zytokine in den peripheren Organen sowie der höheren Spiegel zirkulierender proinflammatorischer Zytokine im Serum hirntoter Spender. Diese Zytokine generieren eine proinflammatorische Aktivierung der Organe, haben einen Anteil an der Leukozyten-Endothelaktivierung, der T-Zell-Stimulierung, der Sekretion weiterer Zytokine, der Induktion von Zellapoptosen und der Antigenprozessierung. Durch die chirurgische Manipulation sowie die folgende Ischämie/Reperfusion-Phase werden die zu transplantierenden Organe beeinträchtigt. Durch die frühe Expression proinflammatorischer Zytokine erfahren die Organe einen intensiveren I/R-Schaden. Die Empfänglichkeit für eine nachfolgende Immunreaktion wird dadurch erhöht.

In dieser Studie wurden die Organspender einer Methylprednisolon-Stoßtherapie vor der Organentnahme unterzogen. Es wurde untersucht, ob sich die durch den Hirntod hervorgerufene Inflammation der peripheren Organe sowie die systemische Inflammation supprimieren lässt. Hierzu wurde die Expression proinflammatorischer Zytokine in den Lebertransplantaten sowie deren Serumkonzentration bei Organspendern gemessen. Ferner wurde untersucht, ob eine Korrelation dieser Ergebnisse mit der Organfunktion und der Frequenz akuter Abstoßungsepisoden im weiteren klinischen Verlauf besteht. Für die Beurteilung des frühen postoperativen Verlaufs wurden die Serumkonzentrationen der Organempfänger von ALT, AST und Bilirubin bestimmt. Für die Beurteilung des klinischen Verlaufs in den ersten sechs Monaten nach der Transplantation wurde die ITBL- und die Rejektionsrate während dieses Zeitabschnitts ausgewertet.

Passend zu den bereits vorliegenden experimentellen Daten konnte mittels der Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon sowohl die Expression proinflammatorischer Zytokine in den Lebertransplantaten als auch die Serumkonzentration der proinflammatorischen Zytokine bei den Organspendern signifikant gesenkt werden. Somit kann die Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon die durch den Hirntod hervorgerufene Inflammation der Peripherie supprimiert werden.

Passend zu den bereits vorliegenden klinischen Daten konnte mittels der Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon eine signifikante Verbesserung der Transplantatfunktion sowie eine signifikante Senkung von postoperativen Transplantatschäden bei Organempfängern erreicht werden. Die ITBL- sowie die Rejektionsraten bei Organempfängern konnten durch die

Vortherapie der Organspender ebenfalls signifikant gesenkt werden, ebenfalls in Übereinstimmung mit den bisher klinisch erhobenen Daten. Somit ist es möglich, mit der Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon eine bessere Qualität und eine bessere Funktionalität der Transplantate zu erreichen.

Insbesondere die Empfänger marginaler Organe würden von der Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon profitieren. Zudem ist die Vortherapie der Organspender mit Methylprednisolon in der Durchführung bei Menschen ungefährlich und einfach.

Die Frage nach dem klinischen Langzeitverlauf der Empfänger der vorbehandelten Organe kann mit dieser Studie jedoch nicht beantwortet werden und bleibt offen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung sind weitere Folgestudien erforderlich.

F Literaturverzeichnis

- 1 Organspende: Daten und Grafiken. Deutsche Stiftung Organtransplantation. (Accessed April 1, 2009, at www.dso.de).
- 2 Jährliche Zahlen in Eurotransplant. Eurotransplant International Foundation. (Accessed April 4, 2009, at <http://www.eurotransplant.nl/?id=jaehrliche>).
- 3 Tilney NL. Transplantation and its biology: from fantasy to routine. *J Appl Physiol* 2000; 89(5): 1681-1689.
- 4 Homer. *Odyssee*. Reclam Ditzingen 1986.
- 5 Edwards WS, Edwards PD, Carrel A: *Visionary Surgeon*. Thomas 1974, p 25.
- 6 Müller-Ruchholtz W. Glances at the history of transplantation immunology. *Transplant Proc* 1999; 31: 1443-1451.
- 7 Woodle ES. A history of living donor transplantation: from twins to trades. *Transplant Proc* 2003; 35: 901-902.
- 8 Padgett EC. Is iso-skin grafting practicable? *South Med J* 1932; 25: 895.
- 9 Gibson T, Medawar PB. The fate of skin homografts in man. *J Anat* 1943; 77(4): 299-310.
- 10 Dausset J. The HLA adventure. *Transplant Proc* 1999; 31(1-2): 22-24.
- 11 Merrill JP, Murray JE, Harrison JH, Guild WR. Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *JAMA* 1956; 160: 277-282.
- 12 Hardy JD, Webb WR, Dalton MR. Lung homotransplantation in man. *JAMA* 1963; 186: 1065-1074.
- 13 Hardy JD. The first lung transplant in man (1963) and the first heart transplant in man (1964). *Transplant Proc* 1999; 31(1-2): 25-29.
- 14 Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I et al. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Annals of surgery* 1968; 168(3): 392-415.
- 15 Bismuth H, Houssin D. Reduced-size orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children. *Surgery* 1984; 95: 367-372.
- 16 Pichmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H. Transplantation of a donor liver to 2 recipients (splitting transplantation) – a new method in the further development of segmental liver transplantation. *Langenbecks Arch Chir* 1988; 373: 127-130.
- 17 Bismuth H, Morino M, Castaing D et al. Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. *BJS* 1989; 76(7): 722-724.
- 18 Schwartz R, Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. *Nature* 1959; 183: 1682-1683.

- 19 Murray JE, Merrill JP, Harrison JH, Wilson RE, Dammin GJ. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N Engl J Med* 1963; 268: 1315-1323.
- 20 Calne RY, White DJG, Thiru S et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 Pancreases and 2 livers. *Lancet* 1979; 2(8151): 1033-1036.
- 21 Greig PD, Forster J, Superina RA et al. Donor specific factors predict graft function following liver transplantation. *Transplant Proc* 1990; 22(4): 2072-2073.
- 22 Chertow GM, Milford EL, Mackenzie HS, Brenner BM. Antigen independent determinants of cadaveric kidney transplant failure. *JAMA* 1997; 276(21): 1732-1736.
- 23 Busson M, N'Doye P, Benoit G, et al. Donor factors influencing organ transplant prognosis. *Transplant Proc* 1995; 27(2): 1662-1664.
- 24 Strominger JL. Human histocompatibility proteins: Past and future: a memoir. *Immunol Rev* 2002; 185: 69-77.
- 25 Male D. In: Roitt I Brostoff J Male D (eds). T-cell receptors and the major histocompatibility complex molecules. Immunology, Harcourt publishers limited 2001; 5: 87.
- 26 Dausset J, Rapaport FT. In: Tilney NL, Storm TB, Paul LC (eds). The fundamental role of human leucocyte antigen (HLA) in transplantation biology: cellular and molecular aspects. Lippincott- Raven publishers, Philadelphia 1996; 29: 307-310.
- 27 Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc* 1998; 30(8): 4217-4223.
- 28 Laskowski I, Pratschke J, Wilhelm MJ, Tilney NL. Molecular and cellular events associated with ischemia/reperfusion injury. *Ann Transplant* 2000; 5(4): 29-35.
- 29 Tilney NL, Paz D, Gasser M, Laskowski I, Hancock WW. Ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2): 843-844.
- 30 Mariot J, Sadoune LO, Jacob F et al. Hormone levels, hemodynamics and metabolism in brain dead organ donors. *Transplant Proc* 1995; 27(1): 793-794.
- 31 Novitzky D, Cooper DKC, Reichart B. Hemodynamic and metabolic responses to hormonal therapy in brain-dead potential organ donors. *Transplantation* 1987; 43(6): 852-854.
- 32 Szabo G, Hackert T, Buhmann V, et al. Downregulation of myocardial contractility via intact ventriculo-atrial coupling in the brain dead organ donor. *Eur J Cardiothorac Surg* 2001; 20: 170-176.

- 33 White M, Wichmann RJ, Roden RL et al. Cardiac beta-adrenergic neuroeffector systems in acute myocardial dysfunction related to brain injury. Evidence for catecholamine-mediated myocardial damage. *Circulation* 1995; 15: 2183-2189.
- 34 Darby JM, Stein K, Grenvik A, Stuart SA. Approach to management of the heartbeating „brain-dead“ organ donor. *JAMA* 1989; 261(15): 2222-2228.
- 35 Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death models? *Transpl Int* 2005 Jan; 18(1): 15-21.
- 36 Morallet P, Goulon M. The depassed coma (preliminary memoir). *Reviued Neurol (Paris)* 1959; 101: 3-15.
- 37 Beecher HK. (Chairman) et al. A definition of irreversible coma. Report of the ad hoc committee of the Harvard Medical School to examine the definition of brain death. *JAMA* 1968; 205: 337-340.
- 38 Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer. Kriterien des Hirntodes. Entscheidungshilfen zur Feststellung des Hirntodes. Dritte Fortschreibung 1997. *Dtsch Arztebl* 1997; 94(19): 1296-1303.
- 39 Wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer. Richtlinien zur Feststellung des Hirntodes. Dritte Fortschreibung 1997 mit Ergänzung gemäß Transplantationsgesetz (TPG). *Dtsch Arztebl* 1998; 95(30): 1861-1868.
- 40 Sinner B, Graf BM. Anaesthesie zur Organentnahme. *Anaesthesist* 2002; 51(6): 493-513.
- 41 Power BM, van Heerden PV. The physiological changes associated with brain death – current concepts and implications for the treatment of the brain dead organ donor. *Anaesth Intensive Care* 1995; 23(1): 26-36.
- 42 Marshall VC. Pathophysiology of brain death: effects on allograft function. *Transplant Proc* 2001; 33(1-2): 845-846.
- 43 Black PM. Pathophysiology of brain death: intracranial aspects. *Transplant Proc* 1988; 5(7): 21-24.
- 44 Urasaki E, Tokimura T, Kumai J-L, Wada S-I, Yokota A. Preserved spinal dorsal horn potentials in a brain-dead patient with Lazarus' sign. *J Neurosurg* 1992; 76(4): 710-713.
- 45 Lagiewska B, Pacholczyk M, Szostek M, Walaszewski J, Rowinski W. Hemodynamic and metabolic disturbances observed in brain-dead organ donors. *Transplant Proc* 1996; 28(1): 165-166.
- 46 Novitzki D. Detrimental effects of brain death on the potential organ donor. *Transplant Proc* 1997; 29(8): 3770-3772.

- 47 Herinjgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, Mubagwa K, Flameng W. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. *Transplantation* 1996; 62(3): 330-335.
- 48 Mertes PM, Burtin P, Carteaux JP et al. Changes in hemodynamic performance and oxygen consumption during brain death in the pig. *Transplant Proc* 1994; 26(1): 229-230.
- 49 Cooper DKC, Novitzky D, Wicomb WN. The pathophysiological effects of brain death on the potential donor organs, with particular reference to the heart. *Ann R Coll Surg Engl* 1989; 71(4): 261-266.
- 50 Avlonitis VS, Fisher AJ, Kirby JA, Dark JH. Pulmonary transplantation: the role of brain death in donor lung injury. *Transplantation* 2003; 75(12): 1928-1933.
- 51 Salim A, Martin M, Brown C, Belzberg H, Rhee P, Demetriades D. Complications of brain death: frequency and impact on organ retrieval. *Am Surg* 2006; 72(5): 377-381.
- 52 Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M et al. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation* 1999; 67(3): 343-348.
- 53 Finkelstein I, Toledo-Pereyra LH, Castellanos J. Physiologic and hormonal changes in experimentally induced brain dead dogs. *Transplant Proc* 1987; 19(5): 4156-4158.
- 54 Macoviak JA, McDougall IR, Bayer MF, Brown M, Tazelaar H, Stinson EB. Significance of thyroid dysfunction in human cardiac allograft procurement. *Transplantation* 1987; 43(6): 824-826.
- 55 Masson F, Thicoipe M, Latapie MJ, Maurette P. Thyroid function in brain-dead donors. *Transpl Int* 1990; 3(4): 226-233.
- 56 Howlett TA, Koegh AM, Perry L, Touzel R, Rees LH. Anterior and posterior pituitary function in brain-stem-dead donors. *Transplantation* 1989; 47(5): 828-834.
- 57 Gramm HJ, Meinhold H, Bickel U et al. Acute endocrine failure after brain death? *Transplantation* 1992; 54(5): 851-857.
- 58 Masson F, Thicoipe M, Gin H et al. The endocrine pancreas in brain dead donors. A prospective study in 25 patients. *Transplantation* 1993; 56(2): 363-367.
- 59 Harms J, Isemer FE, Kolenda H. Hormonal alteration and pituitary function during course of brain-stem death in potential organ donors. *Transplant Proc* 1991; 23(5): 2614-2616.
- 60 Outwater KM, Rockhoff MA. Diabetes insipidus accompanying brain death in children. *Neurology* 1984; 34(9): 1243-1246.
- 61 Fiser DH, Jimenez JF, Wrape V, Woody R. Diabetes insipidus in children with brain death. *Crit Care Med* 1987; 15(6): 551-553.
- 62 Novitzky D. Donor management: state of art. *Transplant Proc* 1997; 29(8): 3773-3775.

- 63 Novitzki D, Cooper DKC, Wicomb WN. Pathophysiology of brain death in the experimental animal: extracranial aspects. Endocrine changes and metabolic responses. *Transplant Proc* 1988; 20: 33.
- 64 Backwill F. In: Roitt I, Brostoff J, Male D (eds). *Cytokines and cytokine receptors*. Immunology, Harcourt publishers limited 2001; 7: 119-130.
- 65 Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, Roake JA, Morris PJ, Fuggle SV. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int* 1999; 56(4): 1551-1559.
- 66 Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Cadaveric versus living-donor livers: differences in inflammatory markers after transplantation. *Transplantation* 2003; 76(11): 1599-1603.
- 67 Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med* 1995; 333(6): 333-336.
- 68 Farmer DG, Yersiz H, Ghobrial RM et al. Early graft function after pediatric liver transplantation: comparison between in situ split liver grafts and living-related grafts. *Transplantation* 2001; 72(11): 1795-1802.
- 69 Wicomb WN, Cooper DK, Lanza RP, Novitzky D, Issacs S. The effects of brain death and 24 hours storage by hypothermic perfusion on donor heart function in the pig. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 91(6): 896-909.
- 70 Wicomb WN, Novitzky D, Cooper DK, Rose AG. Forty-eight hours hypothermic perfusion storage of pig and baboon hearts. *J Surg Res* 1986; 40(3): 276-284.
- 71 Novitzky D, Rose AG, Cooper DK. Injury of myocardial conduction tissue and coronary artery smooth muscle following brain death in the baboon. *Transplantation* 1988; 45(5): 964-966.
- 72 Cushing H. Some experimental and clinical observations concerning states of increased intracranial tension. *Am J Med Sci* 1902; 124: 373-400.
- 73 Mertes PM. Physiology of brain death. In: *Transplantation Biology: Cellular and Molecular Aspects*, Tilney NL, Strom TB, Paul LC, eds. Philadelphia, Lippincott, 1996; 275-290.
- 74 Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Hancock WW, Tilney NL. Activation of donor proinflammatory genes in somatic organs as a consequence of brain death. *Transplant Proc* 1999; 31(1-2): 1003-1005.

- 75 Takada M, Nadeau KC, Hancock WW et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation* 1998; 65(12): 1533-1542.
- 76 Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, et al. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation* 2000; 102(19): 2426-2433.
- 77 Shivalkar B, Van Loon G, Wieland W et al. Various effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure und function. *Circulation* 1993; 87(1): 230-239.
- 78 Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Laskowski I, Tilney NL. A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats. *Transplantation* 2000; 69(3): 427-430.
- 79 Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski I, Paz D, Tilney NL. Brain death and its impact on the donor heart – lessons from animal models. *J Heart and Lung Transplant* 2000; 19(5): 414-418.
- 80 Okamoto S, Corso CN, Nolte D et al. Impact of brain death on hormonal homeostasis and hepatic microcirculation of transplant organ donors. *Transpl Int* 1998; 11(1): 404-407.
- 81 Weiss S, Kotsch K, Francuski M et al. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. *Am J Transplantat* 2007; 7(6): 1584-1593.
- 82 Nistico G. Communications among central nervous system, neuroendocrine and immune systems: Interleukin 2. *Prog Neurobiol* 1993; 40(4): 463-475.
- 83 Smith KA. Interleukin 2: inception, impact, and implications. *Science* 1988; 240(4856): 1169-1176.
- 84 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 2nd Edition, Saunders (1993), Philadelphia.
- 85 H Ibelgauft. COPE: Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. (Accessed April 2, 2009, at <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>).
- 86 Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315(6021): 672-676.
- 87 O'Donovan N, Galvin M, Morgan JG. Physical mapping of the CXC chemokine locus on human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet* 1999; 84(1-2): 39-42.
- 88 Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol* 2002; 168(7): 3195-3204.

- 89 Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995; 182(1): 155-162.
- 90 Booth V, Keizer DW, Kamphuis MB, Clark-Lewis I, Sykes BD. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry* 2002; 41(33): 10418-10425.
- 91 Matz M, Beyer J, Wunsch D et al. Early post-transplant urinary IP-10 expression after kidney transplantation is predictive of short- and long-term graft function. *Kidney Int* 2006; 69(9): 1683-1690.
- 92 Boring L, Gosling J, Chensue SW et al. Impaired Monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest* 1997; 100(10): 2552-2561.
- 93 Mehrabian M, Sparkes RS, Mohandas T, Fogelman AM, Lusic AJ. Localization of monocyte chemoattractant protein-1 gene (SCYA2) to human chromosome 17q11.2-q21.1. *Genomics* 1991; 9(1): 200-203.
- 94 Charo IF, Myers SJ, Hermann A et. al. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxylterminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(7): 2752-2756.
- 95 Ichibashi T, Zhao H, Kawabe K et. al. Blocking of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) activity attenuates the severity of acute pancreatitis in rats. *J Gastroenterol* 2008; 43(1): 79-85.
- 96 Pietruczuk M, Pietruczuk A, Pancewicz S, Hermanowska-Szpakowicz T. ICAM-1: structure, biological role and clinical significance, *Pol Merkur Lekarski* 2004; 17(101): 507-511.
- 97 Slish JE Jr, Ballantyne CM, Rich SS et al. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(18): 8529-8533.
- 98 Holness CI and Simmons DL. Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins. *Blood* 1993; 81(6): 1607-1613.
- 99 Strobl H, Scheinecker C, Csmarits B et al. Flow cytometric analysis of intracellular CD68 molecule expression in normal and malignant haemopoiesis. *Br. J. Haematol* 1995; 90(4): 774-782.
- 100 Scheinecker C, Strobl H, Fritsch G et. al. Granulomonocyte-associated lysosomal protein expression during in vitro expansion and differentiation of CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1995; 86(11): 4115-4123.

- 101 Kurushima H, Ramprasad M, Kondratenko N, Foster DM, Quehenberger Q, Steinberg D. Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol* 2000; 67(1): 104-108.
- 102 Abbas AK, Sharpe AH. T-cell stimulation: an abundance of B7s. *Nat Med* 1999; 5(12): 1345-1346.
- 103 Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(2): 116-126.
- 104 Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104(4): 487-501.
- 105 Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002; 296(5573): 1635-1636.
- 106 Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 1995; 14(22): 5579-5588.
- 107 Green DR. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunol Rev* 2003; 193: 5-9.
- 108 Campbell RD, Trowsdale J. Map of the human MHC. *Immunol Today* 1993; 14(7): 349-352.
- 109 Rammensee HG, Falk K, Röttschke O. MHC molecules as peptide receptors. *Curr Opin Immunol* 1993; 5(1): 35-44.
- 110 Fan X, Lan D, Lin B et. al. Single nucleotide polymorphisms in the regulatory regions of the HLA-DRB-expressed genes. *Hum Immunol* 2005; 66(3): 290-294.
- 111 Andersson G, Andersson L, Larhammer D, Rask L, Sigurdardottir S. Simplifying genetic locus assignment of HLA-DRB genes. *Immunol Today* 1994; 15(2): 58-62.
- 112 Vincent R, Louis P, Gongora C, Papa I, Clot J, Eliaou JF. Quantitative analysis of the expression of the HLA-DRB genes at the transcriptional level by competitive polymerase chain reaction. *J Immunol* 1996; 156(2): 603-610.
- 113 Bahram S, Spies T. Nucleotid sequence of a human MHC class I MKB cDNA. *Immunogenetics* 1996; 43(4): 230-233.
- 114 Bahram S, Bresnan M, Geraghty DE, Spies T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(14): 6259-6263.
- 115 Bahram S, Spies T. The MIC gene family. *Res Immunol* 1996; 147(5): 328-333.

- 116 Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 2001; 1526(1): 10-12.
- 117 Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J et al. Co-stimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 2(3): 255-260.
- 118 Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science* 1998; 279(5357): 1737-1740.
- 119 Li P, Morris DL, Willcox BE, Steinle A, Spies T, Strong RK. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat Immunol* 2001; 2(5): 443-451.
- 120 Cecka JM, Terasaki PI. The UNOS scientific renal transplantation registry. *Clin Transpl* 1993; 1-18.
- 121 Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342(9): 605-612.
- 122 Plenz G, Eschert H, Erren M et al. The interleukin-6/interleukin-6-receptor system is activated in donor hearts. *J Am Coll Card* 2002; 39(9): 1508-1512.
- 123 Birks EJ, Burton PBJ, Owen V et al. Elevated tumor necrosis factor- α and interleukin-6 in myocardium and serum of malfunctioning donor hearts. *Circulation* 2000; 102(19): 352-358.
- 124 Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ et al. Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation* 2000; 69(3): 405-410.
- 125 Van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int* 2003; 64(5): 1874-1882.
- 126 Sanchez-Fructuoso AI, Prats D, Marques M et al. Does donor brain death influence acute vascular rejection in the kidney transplant? *Transplantation* 2004; 78(1): 142-146.
- 127 Wilhelm MJ, Pratschke J, Kusaka M et al. Donor brain death affects tempo and intensity of acute rejection of rat cardiac allografts. *Transplant Proc* 1999; 31(1): 1008-1009.
- 128 Segel LD, von Haag DW, Zhang J, Folette DM. Selective overexpression of inflammatory molecules in hearts from brain-dead rats. *J Heart Lung Transplant* 2002; 21(7): 804-11.
- 129 Pratschke J, Kofla G, Wilhelm MJ et al. Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor. *Ann Surg* 2001; 234(6): 732-740.

- 130 Gasser M, Waaga AM, Kist-Van Holthe JE et al. Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(7): 1937-1945.
- 131 Kotsch K, Francuski M, Pascher A. Improved long-term graft survival after HO-1 induction in brain-dead donors. *Am J Transplant* 2006; 6(3): 477-486.
- 132 Lyons JM, Pearl JM, McLean KM et al. Glucocorticoid administration reduces cardiac dysfunction after brain death in pigs. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24(12): 2249-2254.
- 133 McLean KM, Duffy JY, Pandalai PK et al. Glucocorticoids Alter the Balance Between Pro- and Anti-inflammatory Mediators in the Myocardium in a Porcine Model of Brain Death. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26(1): 78-84.
- 134 Novitzki D, Cooper DKC, Rosendale JD, Kaufmann HM. Hormonal therapy of the brain-dead organ donor: experimental and clinical studies. *Transplantation* 2006; 82(11): 1396-1401.
- 135 Follette DM, Rudich SM, Babcock WD. Improved oxygenation and increased lung donor recovery with high-dose steroid administration after brain death. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 423-429.
- 136 Zweers N, Petersen AH, van der Hooven JA et al. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation* 2004; 78(9): 1251-1258.
- 137 Lentsch AB, Ward PA. Regulation of experimental lung inflammation. *Respir Physiol* 2001; 128(1): 17-22.
- 138 Chiu JJ, Wung BS, Shyy JY, Hsieh HJ, Wang DL. Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(12): 3570-3577.
- 139 Fisher AJ, Donnelly SC, Hirani N et al. Elevated levels of interleukin-8 in donor lungs is associated with early graft failure after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163(1): 259-265.
- 140 Strieter RM, Kunkel SL. Acute lung injury: the role of cytokines in the elicitation of neutrophils. *J Investig Med* 1994; 42(4): 640-651.
- 141 Ferguson D, McDonagh PF, Biewer J, Paidas CN, Clemens MG. Spatial relationship between leukocyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia. *Int J Microcirc Clin Exp* 1993; 12(1): 45-60.
- 142 Feder LS, Todaro JA, Laskin DL. Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 1993; 53(2): 126-132.

- 143 Maher JJ, Friedman SL. Parenchymal and non-parenchymal interactions in the liver. *Semin Liver Dis* 1993; 13: 13-20.
- 144 Hoffman R, Grewe M, Estler H-C, Schulze-Specking A, Decker K. Regulation of tumor necrosis factor- α -mRNA synthesis and distribution of tumor necrosis factor- α -mRNA synthesizing cells in rat liver during experimental endotoxemia. *J Hepatol* 1994; 20: 122-128.
- 145 Emilie D, Navratil E, Devrgne O et al. Monokine gene expression in normal human liver: selective involvement of the portal compartment. *Liver* 1992; 12(1): 34-41.
- 146 Rieder H, Meyer zum Büschenfelde KH, Ramadori G. Functional spectrum of sinusoidal endothelial liver cells. *J Hepatol* 1992; 15(1-2): 237-250.
- 147 Colombo G, Gatti S, Turcatti F et al. Alteration in the transcriptional profile of livers from brain-dead organ donors. *Transplantation* 2006; 82(1): 69-79.
- 148 Van Der Hoeven JA, Moshage H, Schuurs T, Nijboer M, Van Schilfgaarde R, Ploeg RJ. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. *Transplantation* 2003; 76(8): 1150-1154.
- 149 Tsoulfas G, Takahashi Y, Ganster RW et al. Activation of the lipopolysaccharide signaling pathway in hepatic transplantation preservation injury. *Transplantation* 2002; 74: 7-13.
- 150 Peng Y, Gong J, Liu C, Li X, Gan L, Li S. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004; 10(19): 2890-2893.
- 151 Navarro-Zorraquino M, Güemes A, Pastor C et. al. Apoptosis and CD8 and CD54 cell expression in rat small bowel transplantation. *J Surg Res* 2002; 103(1): 37-40.
- 152 Haug CE, Colvin RB, Delmonico FL et al. A phase I trial of immunosuppression with anti-ICAM-1 (CD54) mAb in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55(4): 766-773.
- 153 Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. *Transplantation* 2003; 75(12): 2001-2007.
- 154 Gordon RD, Iwatsuki S, Espuivel CO, et al. In: Cerilli GJ (ed). *Organ Transplantation and Replacement*. Philadelphia: Lippincott 1987, p 511.
- 155 Demitris AJ, Sheahan DG. The role of the pathology department in a liver transplant program. *Gastroenterol Clin North Am* 1998; 17(1): 93-104.
- 156 Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB et al. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation* 1989; 48(3): 447-453.

- 157 Gubernatis G, Pichlmayr R, Lamesch P et al. HTK-solution (Bretschneider) for human transplantation. *Langenbecks Arch Chir* 1990; 375(2): 66-70.
- 158 Lerut J, Gertsch Ph, Luder P et al. University of Wisconsin-Lösung und elektive humane Lebertransplantation. *Helv Chir Acta* 1990; 57(1): 87-91.
- 159 Ontell SJ, Makowka L, Ove P, Starzl TE. Improved hepatic function in the 24hour preserved rat liver with UW-lactobionate solution and SRI 63-441. *Gastroenterology* 1988; 95(6): 1617-1624.
- 160 Bao YM, Adam R, Samuel D, Castaing G, Bismuth H. Influence of high aminotransferase levels on rejection in liver transplantation. *Transpl Proc* 1994; 26(1): 259-260.
- 161 Rauen U, Erhard J, Kühnhenrich P et al. Nonparenchymal cell and hepatocellular injury to human liver grafts assessed by enzyme-release into the perfusate. *Langenbecks Arch Chir* 1994; 379(4): 241-247.
- 162 Thethy S, Thomson BNJ, Pleass H et al. Management of biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. *Clin Transplant* 2004; 18(6): 647-653.
- 163 Nakamura K, Murase N, Becich MJ et al. Liver allograft rejection in sensitized recipients: observations in a clinically relevant small animal model. *Am J Pathol* 1993; 142(5): 1383-1391.
- 164 Fischer A, Miller CH. Ischemic-type biliary strictures in liver allografts: the Achilles heel revisited? *Hepatology* 1995, 21(2): 589-591.
- 165 Hinze RE, Abou-Rebyeh H, Adler A et al. Endoscopic therapy of ischemic-type biliary lesions in patients following orthotopic liver transplantation. *Z Gastroenterol* 1999; 37(1): 13-20.
- 166 Schlitt HJ, Meier PH, Nashan B et. al. Reconstructive surgery for ischemic-type lesions at the bile duct bifurcation after liver transplantation. *Ann Surg* 1999; 229(1): 137-145.
- 167 Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA et al. Hormonal resuscitation yields more transplanted hearts, with improved early function. *Transplantation* 2003; 75(8): 1336-1341.
- 168 Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, Belger MA, Briggs JD. Analysis of factors that affect the outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. *Lancet* 1999; 354(9185): 1147-1152.
- 169 Tullius SG, Nieminen M, Bechstein WO et al. Early acute rejection episodes are reversible following retransplantation into a syngeneic donor and do not progress to chronic rejection. *Transplant Proc* 1997; 29: 29.

- 170 Almond PS, Matas A, Gillingham K et al. Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation* 1993; 55(4): 752-757.
- 171 Tiney NL, Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm M. Chronic rejection. *Transplant Proc* 1998; 30(4): 1590-1594.

F Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
ACTH	Adreno-Kortikotropes-Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-Amino-Transferase
ALI	Acute Lung Injury, akuter Lungenschaden
AMPPD	Adamanthyldioxethanphosphat
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APC	Antigenpräsentierende Zellen
AR	Akute Abstossung
ASAT	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Brain Death
CBA	Cytometric Bead Array
CCD-Kamera	Charge-coupled-Device Camera
CCR	Chemokine Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CHAK-Zellen	Chemokin-aktivierte-Killer-Zellen
CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
CoPP	Kobalt-Protoporphyrin
CTLA	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen
CVK	Campus Virchow klinikum
CXCR	CXC Chemokin Rezeptor
CyA	Cyclosporin A
DD	Death Domain
DISC	Death inducing signaling Complex
D.i.	Diabetes insipidus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ET	Eurotransplant
FADD	Fas-associated Protein with Death Domain
FasL	Fatty Acid Synthetase Ligand
FRET	Fluoreszenz-Energie-Transfer
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HO	Hämoxxygenase
HVL	Hypophysenvorderlappen
IFN	Interferon
ICAM	Intercellular adhesion Molecule
ICB	Intracerebrale Blutung
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Interferon (Inducible) Protein
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRI	Ischemia-reperfusion injury
ITBL	ischemic type bile lesions
kDa	kilo Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte-Killer-Zellen
Lig	Ligamentum
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	Monocyte chemotactic Protein
MELD	Model for End-stage Liver Disease
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
MICA	MHC Class I Polypeptide-related Sequence A
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NPO	Neurogenes pulmonales Ödem
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PDF	Primäre Dysfunktion

PDGF	plateled derived growth factor
PGF	primary graft failure, primäres Transplantatversagen
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
PNF	Primäre-Nicht-Funktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SAB	Subarachnoidale Blutung
sPSGL	P-Selektin glucoprotein Ligand
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
UV	Ultraviolett
V	Vena

2. Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Johann Pratschke für die Überlassung des interessanten Themas, für die stetige Betreuung und Unterstützung zu jedem Zeitpunkt der Umsetzung sowie auch für die Korrektur und die kritischen Anregungen bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Danken möchte ich weiterhin allen anderen, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben:

Herrn Prof. Dr. P. Neuhaus, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité, allen Oberärzten und Explantationschirurgen dieser Klinik sowie den Mitarbeitern der Deutschen Stiftung Organtransplantation für die Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Leberbiopsien und Serumproben.

Den Mitarbeitern des Transplantationsbüros im Virchow-Klinikum danke ich für Ihre organisatorische, fachliche und moralische Unterstützung über weite Strecken dieses Projektes.

Allen Freunden und Verwandten für Geduld und Hilfe.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinen Eltern und insbesondere bei meiner Frau Linna Faber, ohne deren jahrelanger, liebevoller und geduldiger Unterstützung der Weg bis hierhin nicht möglich gewesen wäre.

3. **Publikationen**

Faber W, Hirner A, Kaminski M. Unusual cause of pneumomediastinum. Der Chirurg 2008; 79 (Suppl. 7): 680-681.

Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P, Hoffmann S, Francuski M, Kunert C, Kuecuk O, Schumacher G, Wesslau C, Lun A, Kohler S, Weiss S, Tullius SG, Neuhaus P, Pratschke J. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. Annals of Surgery 2008; 248 (Suppl. 6): 1042-1050.

Francuski M, Reutzel-Selke A, Weiss S, Pascher A, Jurich A, Ulrich F, Schumacher G, Faber W, Kohler S, Volk HD, Neuhaus P, Tullius SG, Pratschke J. Donor brain death significantly interferes with tolerance induction protocols. Transplantation International 2009; 22 (Suppl. 4): 482-493

4. Lebenslauf

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

5. **Selbstständigkeitserklärung**

„Ich, Wladimir Faber, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Transplantatconditionierung durch die Vortherapie der hirntoten Organspender mit Methylprednisolon (Urbason®)“ 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.“