

Aus der Chirurgischen Klinik  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Metabolische Rekonditionierung steatotischer Rattenlebern  
mittels ex-vivo-Maschinenperfusion und mTOR-Inhibition

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

David Wyrwal  
aus Berlin

Datum der Promotion: 04.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>3</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Die Lebertransplantation.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Entwicklung der Transplantationszahlen/Spendenbereitschaft und SpenderInnen in Deutschland.....</b>	<b>9</b>
<b>1.3 Ursachen für den Organmangel.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4 Nutzung marginaler Organe.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 Steatosis hepatis .....</b>	<b>12</b>
1.5.1 Definition.....	12
1.5.2 Pathogenese .....	13
1.5.3 Klinik und Diagnostik.....	14
1.5.4 Histologische Einteilung .....	15
<b>1.6 Transplantation steatotischer Lebern.....</b>	<b>16</b>
<b>1.7 Lagerung und Transport der Organe/ Ischämie-Reperfusionsschaden.....</b>	<b>17</b>
<b>1.8 Maschinenperfusion.....</b>	<b>18</b>
1.8.1 Hypotherme Maschinenperfusion (HMP).....	19
1.8.2 Subnormotherme Maschinenperfusion (SMP)/Kontrolliert Oxygenierte Erwärmung.....	20
1.8.3 Normotherme Maschinenperfusion (NMP).....	21
1.8.4 Experimentelle Maschinenperfusion.....	21
<b>1.9 Metabolische Rekonditionierung.....</b>	<b>22</b>
<b>1.10 Autophagie und mTOR-Inhibition.....</b>	<b>23</b>
<b>1.11 Everolimus .....</b>	<b>25</b>
<b>1.12 Versuchsvorhaben und Fragestellung .....</b>	<b>26</b>
<b>2 Methodik.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Versuchsaufbau .....</b>	<b>27</b>
<b>2.2 Tiere, Versuchsgruppen, Verfettungsprotokoll .....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Versuchsdurchführung.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4 Messung von biochemischen Markern, Blutgasanalyse und Galleproduktion</b>	
<b>33</b>	
2.4.1 Laktat-Clearance.....	34
2.4.2 Oxygen Uptake Ratio (OUR).....	34
<b>2.5 Zusammensetzung Perfusat, Erythrozytenlagerung, Everolimus Stock-Solution .....</b>	<b>35</b>
2.5.1 Modified Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland).35	
2.5.2 Erythrozytenkonzentrat.....	35
2.5.3 Perfusat.....	36
2.5.4 Everolimus und DMSO stock solution.....	36

<b>2.6</b>	<b>Analytik</b> .....	<b>37</b>
2.6.1	Triglyceridbestimmung.....	37
2.6.2	Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung.....	37
2.6.3	Oil-Red-O.....	38
2.6.4	Elektronenmikroskopie.....	39
<b>2.7</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung Verfettungsmodell</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Rahmenbedingungen</b> .....	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Perfusionsdrücke</b> .....	<b>41</b>
<b>3.4</b>	<b>Makroskopische Beschaffenheit nach Perfusion</b> .....	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>Blutgasanalyse (BGA)</b> .....	<b>43</b>
3.5.1	Portovenös.....	43
3.5.2	Venös.....	46
3.5.3	Dialyse.....	49
3.5.4	Oxygen Uptake Ratio (OUR).....	50
<b>3.6</b>	<b>Biochemische Marker</b> .....	<b>51</b>
<b>3.7</b>	<b>Galleproduktion</b> .....	<b>53</b>
<b>3.8</b>	<b>Triglyceridanalyse</b> .....	<b>54</b>
<b>3.9</b>	<b>H.E. Färbung</b> .....	<b>55</b>
<b>3.10</b>	<b>Elektronenmikroskopie (EM)</b> .....	<b>58</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>60</b>
<b>4.1</b>	<b>Zusammenfassung des Themas</b> .....	<b>60</b>
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Methodik</b> .....	<b>61</b>
4.2.1	Verfettungsmodell.....	61
4.2.2	Beurteilung der Steatosis hepatis mittels H.E.-Färbung.....	62
4.2.3	Die Maschinenperfusion im Kleintiermodell.....	63
4.2.4	Vor- und Nachteile der verschiedenen Perfusionstemperaturen.....	64
4.2.5	Konzentration von Everolimus im Perfusat.....	65
4.2.6	Limitationen.....	66
<b>4.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>67</b>
4.3.1	Einfluss von Everolimus auf die Perfusion.....	67
4.3.2	Einfluss von Everolimus auf die Steatosis hepatis.....	69
<b>4.4</b>	<b>Molekulare Analyse des mTOR-Signalweges</b> .....	<b>72</b>
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>84</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>86</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>87</b>

# Abkürzungsverzeichnis

<b>NAFLD</b>	Non alcoholic fatty liver disease	<b>HMP</b>	Hypotherme Maschinenperfusion
<b>NASH</b>	Nicht-alkoholische Steatohepatitis	<b>BGA</b>	Blutgasanalyse
<b>MELD</b>	Model of Endstage Liver Disease	<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DSO</b>	Deutsche Stiftung Organtransplantation	<b>HOPE</b>	Hypotherme oxygenierte Maschinenperfusion
<b>DCD</b>	Donation after Circulatory Death	<b>SMP</b>	Subnormotherme Maschinenperfusion
<b>ALT</b>	Alanin-Aminotransferase	<b>NMP</b>	Normotherme Maschinenperfusion
<b>AST</b>	Aspartat-Aminotransferase	<b>GDNF</b>	Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor
<b>PNF</b>	Primary non function	<b>mTOR</b>	mammalian Target of Rapamycin
<b>IPF</b>	Impaired primary function	<b>mTORC</b>	mammalian Target of Rapamycin Complex
<b>HTK</b>	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat	<b>pO2</b>	Sauerstoffpartialdruck
<b>IRI</b>	Ischemia-Reperfusion-Injury	<b>pCO2</b>	Kohlenstoffdioxid- partialdruck
<b>ROS</b>	Reaktive Oxygen Species	<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>HB</b>	Hämoglobin	<b>HCT</b>	Hämatokrit

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Einteilung des Steatosegrades der Lebern.....	15
Abbildung 2 Versuchsaufbau .....	28
Abbildung 3 Etablierung Verfettungsmodell .....	40
Abbildung 4 Fettgehalt Verfettungsmodell .....	40
Abbildung 5 Perfusionsdrücke .....	42
Abbildung 6 Makroskopische Beschaffenheit nach Perfusion.....	43
Abbildung 7 BGA portovenös 1 .....	44
Abbildung 8 BGA portovenös 2 .....	45
Abbildung 9 BGA venös 1 .....	47
Abbildung 10 BGA venös 2.....	48
Abbildung 11 BGA Dialyseflüssigkeit .....	49
Abbildung 12 Laborwerte ALT, LDH, Bilirubin .....	51
Abbildung 13 Laborwerte AST und Harnstoff.....	52
Abbildung 14 Galleproduktion .....	53
Abbildung 15 Triglyceridanalyse.....	55
Abbildung 16 HE-Auswertung .....	56
Abbildung 17 HE-Fotos .....	57
Abbildung 18 Elektronenmikroskopie.....	58

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Mischverhältnis Everolimus-DMSO.....	36
Tabelle 2 Perfusionsdrücke.....	42
Tabelle 3 BGA portovenös .....	46
Tabelle 4 BGA venös .....	48
Tabelle 5 BGA Dialyseflüssigkeit.....	50
Tabelle 6 Allgemeine Informationen, Laborwerte.....	54

# Abstrakt

**Einleitung:** Die Lebertransplantation stellt bis heute das einzige Verfahren zur kurativen Therapie von PatientInnen mit terminalem Leberversagen dar. Demographischer Wandel und eine wachsende Prävalenz des metabolischen Syndroms führen zunehmend zu einer minderen Organqualität der zur Verfügung stehenden Transplantate. Die Transplantation von Lebern mit makrovesikulärer Steatose ist mit einem deutlich erhöhten Risiko für ein Transplantatversagen assoziiert. Ziel dieser Arbeit war es, im Tiermodell ein pharmakologisches Verfahren zur Konditionierung steatotischer Lebertransplantate mittels normothermer Maschinenperfusion zu entwickeln.

**Material und Methoden:** Eine nicht-alkoholinduzierte Fettleber wurde im Kleintiermodell durch Fütterung von Sprague Dawley-Ratten mit einer dreiwöchigen Hochfettdiät induziert. Die Lebern wurden anschließend explantiert und in einer miniaturisierten Perfusionsmaschine über drei Stunden perfundiert. Für eine pharmakologische Konditionierung wurde der mTOR-Inhibitor Everolimus (5-50 ng/ml) eingesetzt. Die Perfusionsleistung des Organs wurde mittels Blutgasanalyse und Untersuchung diverser Laborparameter evaluiert. Im Anschluss an die Versuche wurde eine histologische und elektronenmikroskopische Auswertung sowie eine photometrische Triglyceridanalyse des Gewebes durchgeführt.

**Ergebnisse:** Das Modell einer nicht-alkoholinduzierten Fettleber im Kleintier mit einer gemischt- bis makrovesikulären Steatosis von über 30 % konnte erfolgreich etabliert werden. Die Perfusionsdrücke und Blutgasanalysen während ex vivo Maschinenperfusion zeigten annähernd physiologische Werte. Die Gruppe mit der höchsten Everolimus-Konzentration von 50 ng/ml erreichte im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant niedrigere Werte des Schädigungsparameters Aspartat-Aminotransferase und verbesserte Werte des Syntheseparameters Harnstoff. Eine Reduktion des Fettgehalts konnte in keiner der Gruppen, weder in den histologischen noch in den photometrischen Auswertungen, festgestellt werden.

**Schlussfolgerung:** Das Ergebnis der Perfusion steatotischer Rattenlebern kann durch die Gabe von 50 ng/ml Everolimus signifikant verbessert werden. Eine Fettreduktion nach drei Stunden Perfusion war nicht zu beobachten, jedoch geben die Ergebnisse Anlass zu weiteren experimentellen Arbeiten mit beispielsweise einer längeren Versuchsdauer.

# Abstract

**Introduction:** Liver transplantation is currently the only curative treatment option for patients with end-stage liver failure. Demographic changes and a growing prevalence of the metabolic syndrome increasingly lead to a lower organ quality. The transplantation of liver grafts with macrovesicular steatosis is associated with a significantly increased risk of graft failure. The aim of this work was to establish a pharmacological procedure for conditioning of steatotic liver grafts during normothermic ex-vivo liver machine perfusion in rats.

**Material and methods:** A non-alcohol-induced fatty liver was induced in a small animal model by feeding Sprague Dawley rats a three-week high-fat diet. The livers were then retrieved and perfused in a miniaturized ex-vivo liver perfusion machine for three hours. For pharmacological conditioning, the influence of the mTOR inhibitor everolimus was investigated. The perfusion performance of the organ was evaluated by blood gas analysis and laboratory tests. Following the experiments, histological and electron microscopic evaluation and photometric triglyceride analysis of the tissue was performed.

**Results:** The model of a non-alcohol-induced fatty liver in small animals with a mixed to macrovesicular steatosis of more than 30% was successfully established. Perfusion pressures and blood gas parameters were almost in a physiological range during ex vivo machine perfusion. The group with the highest Everolimus concentration of 50 ng/ml showed significantly lower values of the damage parameter aspartate aminotransferase while the synthesis parameter urea had improved compared to the control group. A reduction in fat content could not be detected in any of the groups, neither by histological nor photometric evaluation.

**Conclusion:** The perfusion outcome of steatotic rat livers was significantly improved by the administration of 50 ng/ml Everolimus. Although no reduction of the fat content could be achieved after three hours of perfusion these results give rise to further experimental work with, for example, a longer test duration.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Lebertransplantation

Die Lebertransplantation stellt bis heute die einzige kurative Behandlungsoption für das terminale Leberversagen dar. Ein Pionier auf diesem Gebiet war der US-amerikanische Chirurg Thomas E. Starzl. Ihm gelang 1967 in Denver, Colorado die weltweit erste erfolgreiche humane Lebertransplantation (1, 2). Auch in Deutschland, an der Universitätsklinik Bonn, konnte bald darauf im Jahr 1969 durch die beiden Chirurgen Jong-Soo Lee und Alfred Gütgemann an diesen Erfolg angeknüpft werden (3). Was zunächst als eine ultima ratio Behandlung für ausschließlich pädiatrische PatientInnen mit kongenitalen Lebererkrankungen wie biliärer Atresie oder juveniles hepatozelluläres Karzinom gedacht war (2), setzte sich bald auch zu einer allgemein anerkannten Behandlungsmethode bei erwachsenen PatientInnen durch.

Häufigste Indikation für die Listung zur Lebertransplantation war im Jahr 2018 der alkoholtoxische Leberschaden (4). An zweiter und dritter Stelle stehen die Leberfibrose bzw. -zirrhose und hepatische Malignitäten (4). Hierbei können zahlreiche Ätiologien wie Virushepatitiden aber auch Primär Biliäre Cholangitis und Primäre Sklerosierende Cholangitis ursächlich sein. Jedoch lassen sich in den letzten Jahren aufgrund verbesserter Behandlungsmöglichkeiten im Bereich der virusbedingten Hepatitiden weniger notwendige Transplantationen in einigen dieser Ätiologien beobachten (5). Problematischer ist allerdings eine Zunahme der kardiovaskulären Risikofaktoren vor allem in der westlichen Gesellschaft, welche unter dem Begriff des metabolischen Syndroms zusammengefasst werden (6). Schlechte Ernährung und ein Mangel an Bewegung führen häufig zu Übergewicht und können ursächlich für die nicht-alkoholinduzierte Fettleber (NAFLD) oder auch die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) sein. Die terminale Leberzirrhose als Folge von NAFLD und NASH nimmt daher einen zunehmend größeren Stellenwert als Ursache für eine Lebertransplantation ein (5, 7).

Im Rahmen einer orthotopen Lebertransplantation wird das Spenderorgan im Austausch zum erkrankten Organ des Empfängers an selber Stelle implantiert. Das erkrankte Organ des Empfängers muss zuvor explantiert werden. In Deutschland stammen die meisten Organe von PatientInnen, die an einem irreversiblen Ausfall aller Hirnfunktionen leiden und deshalb für hirntot erklärt werden, ein geringer Anteil stammt von Lebendspendern. In anderen Ländern wie Großbritannien besteht



zudem die Möglichkeit einer Transplantation nach Herztod. Dies ist in Deutschland jedoch gesetzlich verboten (8). Um möglichst vielen PatientInnen durch eine Lebertransplantation helfen zu können, wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte weitere Techniken entwickelt. Das Verfahren der Split-Lebertransplantation stellt beispielsweise eine Option dar. (9). Auch die Teilleber-Lebendspende stellt eine weitere Therapiemöglichkeit dar und machte im Jahr 2018 einen Anteil von 5,9% der Lebertransplantationen in Deutschland aus (10). Bei passender Übereinstimmung von SpenderIn und EmpfängerIn, meist Eltern, die für ihr Kind spenden, kann aufgrund der Regenerationsfähigkeit der Leber ein Teilsegment gespendet werden. Diese innovativen Verfahren machen zwar nur einen kleinen Teil aller Transplantationen aus, tragen jedoch dazu bei, dass immer mehr PatientInnen kurativ geheilt werden können.

Passende Übereinstimmung zwischen SpenderIn und EmpfängerIn sind ebenfalls bei Vergabe der Organe nach dem Hirntod entscheidend, um das Risiko einer Abstoßungsreaktion zu minimieren. Hierbei wird getestet, ob immunologische Voraussetzungen wie Histokompatibilität der Major Histocompatibility Complex (MHC) Moleküle, Cross-Match-Untersuchung oder AB0-Kompatibilität gegeben sind (11). Mit Hilfe des Model of Endstage Liver Disease (MELD) Scores kann außerdem die Dringlichkeit für eine Lebertransplantation bestimmt werden. Unter Einbeziehen der Parameter Serum-Kreatinin, Gesamt-Bilirubin und INR wird ein Wert zwischen 1 und maximal 40 ermittelt, der den Schweregrad der Leberschädigung abbilden soll (12). Obwohl die Aussagekraft des MELD-Scores durchaus kritisch gesehen wird (13), erfolgt eine Einstufung der PatientInnen in die Wartelisten anhand dieses Wertes. Um eine dringende Transplantation oder eine seltene immunologische Kompatibilität auch in kleineren Ländern mit wenigen SpenderInnen zu ermöglichen, wurde die Organisation Eurotransplant gegründet. Die Eurotransplant-Region umfasst die europäischen Länder Deutschland, Österreich, Slowenien, Ungarn, Kroatien und die Benelux-Staaten. Nachdem der Hirntod des Patienten von zwei unabhängigen Ärzten festgestellt wurde, meldet das Krankenhaus, mit Einverständnis der Angehörigen, den potenziellen Organspender bei der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO), welche für die Koordination der Organspende im deutschen Raum zuständig ist. Diese wiederum leitet die Informationen an Eurotransplant weiter, wo der/die passende EmpfängerIn ermittelt wird. Hierbei spielen Blutgruppenkompatibilität, Dringlichkeit der Transplantation und aufgrund der

möglichst geringen Konservierungszeit die Entfernung zum/zur EmpfängerIn eine Rolle (10).

Sowohl Innovationen im Bereich der Operationstechniken als auch Kooperationen deutschland- und europaweit führen zu einem größeren Organangebot und sollen so die kurative Therapie von immer mehr PatientInnen ermöglichen. Die Realität spricht jedoch andere Zahlen.

## **1.2 Entwicklung der Transplantationszahlen/Spendenbereitschaft und SpenderInnen in Deutschland**

Ein stetiger Rückgang der Lebertransplantationszahlen im Eurotransplantraum konnte bis zum Jahr 2017 registriert werden. Auch in Deutschland erreichte die Zahl der Lebertransplantationen im Jahr 2017 einen Tiefpunkt. Hier zeigte sich eine dramatische Abnahme von rund 30 % zwischen den Jahren 2011 (n=1200) und 2016 (n=857)(14). Erst im Jahr 2018 konnte seit 2010 wieder ein leichter Aufwärtstrend vermerkt werden (15). Sinkende Zahlen werden ebenfalls auf den Wartelisten registriert. Dieser Trend lässt sich jedoch durch die Anwendung von strikteren Aufnahmekriterien erklären, was wiederum in den letzten Jahren zu einem konstant steigenden Anteil an schwer erkrankten PatientInnen auf den Wartelisten geführt hat (14, 16). Dennoch stand bis zum Jahr 2017 die Zahl der Organspenden einer deutlich höheren Zahl an wartenden PatientInnen gegenüber. Erstmals seit 2001 konnte 2018 die Zahl an Lebertransplantationen im Eurotransplantraum die Zahl der Wartelistenplätze überschreiten (17). Möglich war dies jedoch nur durch einen weiteren drastischen Abfall an Registrierungen auf der Warteliste. Auch ist unklar wie hoch die Rate an Retransplantationen nach Transplantatversagen war. In Deutschland hingegen ist die Situation 2018 unverändert, den 1301 Neuanmeldungen und insgesamt 1872 wartenden PatientInnen konnten nur 877 vollzogene Transplantationen gegenübergestellt werden. Über 15% der wartenden PatientInnen verstarben in dieser Zeit aufgrund von Mangel an Spenderorganen (4). Auch in anderen Teilen der Welt, wie zum Beispiel den USA, lässt sich ein solcher Trend feststellen, was vermuten lässt, dass sich der Mangel an Organen in den nächsten Jahren noch drastisch verstärken wird (18). Doch wie lässt sich dieser Wandel trotz innovativer Techniken und Kooperationen erklären?

### 1.3 Ursachen für den Organmangel

Deutschland steht mit einer Zahl von knapp 10 realisierten Organspenden pro eine Million Einwohner an unterster Stelle in Europa. Im Vergleich dazu werden in Spanien mit einer Zahl von 46,9 über das Vierfache an Transplantationen pro einer Million Einwohner realisiert (4). Die seit Anfang 2019 politisch viel diskutierte rechtliche Grundlage der Organspende wird im Zusammenhang mit der geringen Zahl an Organspenden häufig genannt. Es handelt sich dabei in Deutschland um eine sogenannte Entscheidungslösung, bei der sich jeder potenzielle Spender aktiv z.B. in Form eines Organspendeausweises oder durch seine Angehörigen für eine Organspende aussprechen kann. Im Gegensatz dazu wird in vielen anderen europäischen Ländern die Widerspruchslösung angewandt, bei welcher der potenzielle Spender sich zu Lebzeiten aktiv gegen eine Organspende aussprechen muss, um nicht zum Spender zu werden. Diese verschiedenen rechtlichen Rahmenbedingungen können für Angehörige im Falle eines fehlenden Organspendeausweises und auf der Suche nach dem mutmaßlichen Willen des Verstorbenen einen wesentlichen Unterschied machen (19).

Als weitere Ursache für die in letzter Zeit sinkenden Zahlen wird der im Jahr 2012 aufgedeckte sogenannte „Organspendeskandal“ gesehen. Hierbei kam es in den Jahren 2010 und 2011 zu systematischen Manipulationen an 4 der 24 Transplantationszentren in Deutschland (20). Dabei wurden vor allem Informationen über die Dialysepflichtigkeit von PatientInnen verändert, um so den MELD-Score und die Transplantationsdringlichkeit zu erhöhen. Der dadurch entstandene Vertrauensverlust der Bevölkerung in die Transplantationsmedizin wird ebenfalls als Ursache für die ab diesem Zeitpunkt sinkenden Organspenden gesehen.

Diese Punkte sind jedoch auf Deutschland beschränkt und können nicht den europa- und weltweiten Rückgang an qualitativ hochwertigen Leberspenden erklären. Der demographische Wandel, also die immer älter werdende Bevölkerung, und die zunehmende Inzidenz des metabolischen Syndroms als Risikofaktor für die Manifestation einer Fettleber (Steatosis hepatis) haben sich in den letzten Jahren als wesentliche Ursachen für die sinkenden Zahlen in der Lebertransplantation herauskristallisiert (21, 22). An der Charité – Universitätsmedizin Berlin wurden in den Jahren 2010 bis 2016 48,9 % (n=500) der aufgrund von Spendereigenschaften abgelehnten Organe wegen des zu hohen Spenderalters nicht akzeptiert (23), da der verstärkte Ischämie-Reperfusionsschaden älterer Spenderorgane mit einem höheren

Risiko postoperativer Komplikationen assoziiert ist (24). Ältere Menschen werden im Jahr 2030 jedoch voraussichtlich einen deutlich größeren Anteil der Gesellschaft (28 %) als im Jahr 2018 (22 %) ausmachen (23). Bereits in einem kurzen Zeitraum von 2010 bis 2016 hat sich das mittlere Spenderalter im Eurotransplant-Raum von 53 auf 55 Jahre erhöht (23). Auch das metabolische Syndrom und das damit verbundene Übergewicht erfahren derzeit in der Bevölkerung einen dramatischen Zuwachs (6). Die dadurch bedingte Steatosis hepatis, auch Nicht-alkohol-induzierte Fettleber, zeigte sich bereits in 3 % bis 24 % der Bevölkerung und bei PatientInnen der bariatrischen Chirurgie sogar in 84 % bis 96 % der Fälle (7). Die Assoziation von Übergewicht und Fettleber lässt eine zunehmende Prävalenz der Steatosis hepatis in den nächsten Jahren vermuten. Die makrovesikuläre Steatosis hepatis stellt durch den verstärkten Ischämie-Reperfusionsschaden und die damit einhergehende eingeschränkte Funktion des Organs ebenso einen wichtigen Risikofaktor für den postoperativen Verlauf nach Lebertransplantation dar (25). Um dem konstant zunehmenden Mangel an qualitativ hochwertigen Organen entgegenzuwirken, wird die Transplantationsmedizin vor der Aufgabe stehen, zunehmend Spenderorgane von nicht optimalen Organspendern zu nutzen.

#### **1.4 Nutzung marginaler Organe**

Unter dem Begriff der marginalen Organe oder „Extended Criteria Donor Organs“ (ECD) versteht man Transplantate, welche suboptimale Bedingungen oder Qualitäten erfüllen. Hierzu gehören sowohl Organe von älteren Spendern als auch Organe nach Tod durch Herzstillstand (Donation after Circulatory Death, DCD), mit möglicher infektiöser Übertragung oder einem erhöhten Fettgehalt. Um der weltweiten Diskrepanz zwischen zur Verfügung stehenden Spenderorganen und wartenden PatientInnen entgegenzuwirken, wurde in den letzten Jahren die Akzeptanzrate dieser marginalen Organe deutlich angehoben (14, 26). Ein größeres Risiko für frühes Transplantatversagen und erhöhte Patientenmorbidity wird hierbei häufig in Kauf genommen. Obwohl die Angaben in der Literatur hinsichtlich des Risikos der Nutzung von älteren Organen divergieren, zeigen neuste Daten, dass die Ergebnisse vergleichbar sind mit jüngeren Organen und daher eine Ausweitung des Spenderpools auf diesen Bereich durchaus sinnvoll ist (23, 27).

Mit der Einführung der Organspende nach Tod durch Herzstillstand (DCD) in den neunziger Jahren konnte in vielen praktizierenden Ländern der Spenderpool deutlich

erweitert werden (28). In Deutschland wird jedoch bis heute diese Art der Organspende von vielen Fachgesellschaften abgelehnt (29). Grund dafür ist vor allem der willkürlich gesetzte Zeitpunkt von 10 Minuten nach Herzstillstand bzw. Beendigung der Reanimation, welcher zwar einen irreversiblen Hirntod vermuten lässt, ihn aber nicht eindeutig beweist (30). Da der Hirntod jedoch eine gesetzliche Voraussetzung für die Organspende darstellt, treten hierdurch ethische und rechtliche Probleme auf, weshalb die Organspende nach Tod durch Herzstillstand in Deutschland gesetzlich verboten ist.

In den Fokus der aktuellen Forschung rückt nun immer weiter der Gebrauch von steatotischen Lebern. An der Charité Universitätsmedizin Berlin stieg zwischen 2010 und 2016 der Anteil der aufgrund von Steatosis hepatis abgebrochenen Lebertransplantationen von 14,7 % auf 63,6 %. Ebenso stieg in diesem Zeitraum der Nachweis von Steatosis hepatis in transplantierten Organen von 22,3 % auf 51,5 % (14). Eine weitere Verschlechterung der Organqualität in nächster Zeit könnte die tatsächliche Verwendung angebotener Spenderlebern von aktuell 78 % auf 44 % im Jahr 2030 sinken lassen (18).

## **1.5 Steatosis hepatis**

### **1.5.1 Definition**

Der Begriff Steatosis hepatis beschreibt einen erhöhten Anteil an Hepatozyten, die Fettvesikel enthalten. Ab einem Anteil von 5 % verfetteter Leberzellen spricht man von einer Fettleber (31). Dabei können verschiedene Ätiologien einen erhöhten Fettgehalt bewirken. Hierbei lässt sich die Steatosis hepatis in eine primäre, mit Insulinresistenz und metabolischem Syndrom assoziierte, und eine sekundäre Form einteilen. Ursache der sekundären Form können unter anderem die Einnahme verschiedener Medikamente (z.B. Amiodaron, Tamoxifen, Methotrexat), parenterale Ernährung, Mangelernährung, abdominelle Chirurgie (z.B. Magen-Bypass) oder diverse Stoffwechselstörungen sein (31). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal lässt sich anhand der Assoziation mit Alkoholkonsum feststellen. Grenzwerte für einen leberschädigenden Alkoholkonsum werden in der Literatur nicht einheitlich definiert (31, 32). Die *American Association for the study of the Liver* geht jedoch von einem alkoholtoxischen Leberschaden bzw. einer alkoholinduzierten Fettleber ab einem

Alkoholkonsum von 21 Standardgläsern pro Woche (1 Standardglas entspricht 14 g Ethanol) beim Mann und von 14 Standardgläsern pro Woche bei der Frau aus (32). Davon abzugrenzen ist die nicht-alkoholinduzierte Fettleber (non-alcoholic fatty liver disease = NAFLD). Hierbei handelt es sich um die primäre Form der Fettleber, welche vor allem mit Insulinresistenz und metabolischem Syndrom assoziiert ist. Sind zusätzlich Inflammation und Hepatozytenschädigungen in Form von Ballooning, Apoptose/Nekrose, Mallory-Körper oder Riesenmitochondrien histologisch nachweisbar spricht man weitergehend von einer nicht-alkoholinduzierten Steatohepatitis (NASH) (31). Diese stellt einen starken Risikofaktor für die Entwicklung einer Leberfibrose bzw. -zirrhose dar.

### **1.5.2 Pathogenese**

Die Pathogenese der Steatosis hepatis beruht im Wesentlichen auf dem Überangebot und der Speicherung von Triglyceriden in der Leber. Hierbei spielen Adipositas und Insulinresistenz eine entscheidende Rolle. Der Pathomechanismus wird häufig auch durch das sogenannte „Two-Hit-Modell“ erklärt(31). Im ersten Schritt kommt es zu einem vermehrte Nahrungsangebot bei adipösen Personen und einer verstärkten Aufnahme energiereiche Produkte im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt), welche dann wiederum für eine gesteigerte Lipidsynthese zur Verfügung stehen. Die mit dem metabolischen Syndrom häufig einhergehende Insulinresistenz des adipösen Gewebes senkt die inhibitorische Wirkung des Hormons und verstärkt wiederum die Entstehung einer Fettleber durch Steigerung von Aufnahme, Synthese und Speicherung von Lipiden(31). Die Akkumulation von Triglyceriden in der Leber ist zunächst einmal nicht toxisch, jedoch entstehen im Zuge des „Second Hit“ durch Abbauprozesse zellschädigende Stoffe (Fettsäuren, reaktive Sauerstoffspezies), die zur sogenannten hepatozytären Lipotoxizität führen(31, 33). Ein weiterer Punkt, der jedoch bislang eine schwache Datenlage aufweist, ist der Einfluss einer genetischen Prädisposition. Eindeutige Studienerkenntnisse zeigen jedoch, dass die Ethnie eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer NAFLD trägt. So wird die Prävalenz der NAFLD in den USA bei schwarzen Personen auf 24 % und bei weißen Personen auf 33 % geschätzt. US-Amerikaner lateinamerikanischer Herkunft zeigen jedoch eine Rate von bis zu 45 % (31).

### 1.5.3 Klinik und Diagnostik

Die NAFLD ist in den meisten Fällen asymptomatisch. Eine Diagnose wird häufig aufgrund von erhöhten Leberwerten, auffälligem Sonographiebefund bei einer Routineuntersuchung oder im Zuge einer Operation im abdominellen Bereich gestellt. Außerdem können leichte Symptome wie Schmerzen im rechten Oberbauch, chronische Müdigkeit oder eine vergrößert tastbare Leber hinweisend sein. Im Falle einer fortschreitenden NASH oder Zirrhose sind typische Leberhautzeichen wie Spider-Naevi und Palmarerythem oder Splenomegalie zu erwarten (33). Das Risiko mit einer NAFLD eine Leberzirrhose zu entwickeln wird mit einer Rate von 1,5 % als relativ gering eingeschätzt. Das Risiko aus einer NASH eine Fibrose zu entwickeln beträgt jedoch 30-50 %. Außerdem entwickeln 15 % der NASH PatientInnen eine Zirrhose und 3 % sogar ein hepatozelluläres Karzinom. Daher haben 13 % der hepatozellulären Karzinome ihren Ursprung in einer Steatohepatitis. Des Weiteren haben NAFLD PatientInnen durch die direkte Assoziation mit dem metabolischen Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2 ein hohes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse (31).

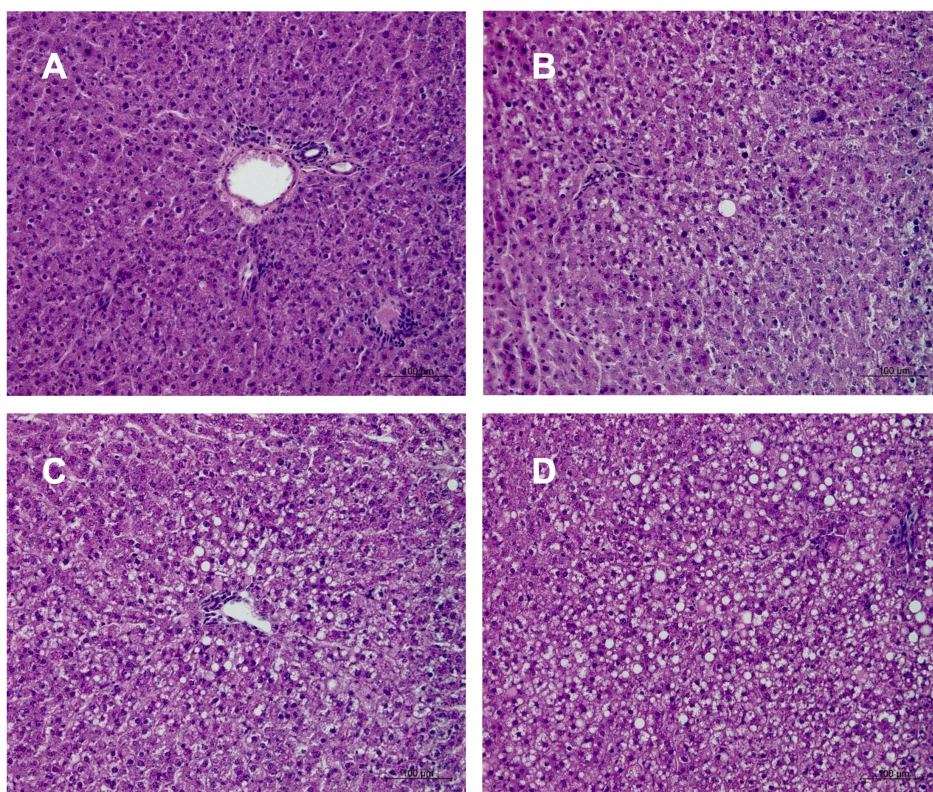
Die Diagnostik der NAFLD stellt sich als uneinheitlich dar. Zunächst können die erhöhten Transaminase-Werte Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) einen Hinweis auf das Vorliegen einer Fettleber geben. Vor allem ALT-Werte sind hierbei erhöht, wobei eine Umkehr des ALT/AST-Quotienten für eine fortschreitende Fibrose sprechen kann (31). Eine weitere wichtige diagnostische Methode stellt die Sonographie dar. Hierbei zeigt sich die Fettleber im Vergleich zum angrenzenden Nierengewebe mit einem homogen aufgehellten Echomuster. Außerdem lässt sich häufig eine vergrößerte Leber mit distalem Schallschatten und abgerundeten Unterrändern feststellen. Es kann sich jedoch auch ein inhomogenes Bild mit fokal verfetteten oder nicht-verfetteten Herden zeigen (34). Eine Unterscheidung zwischen NAFLD und NASH beziehungsweise eine Einschätzung des Grades der Verfettung und der Leberzellschädigung lässt sich hierdurch jedoch nicht treffen. Weitere bildgebende Verfahren wie CT und MRT sind ebenfalls sichere Methoden, um ein NAFLD festzustellen.

Goldstandard in der Diagnostik der Fettleber stellt die Leberbiopsie mit anschließend histologischer Evaluation des Gewebes dar. Dieses ist ein invasives, aber vergleichsweise risikoarmes Verfahren und bietet eindeutige Erkenntnisse über den Grad der Verfettung und Leberzellschädigung. Neuentwicklungen wie der auf

Ultraschall basierende FibroScan® oder die Bestimmung von Keratin18 sind vielversprechende Methoden auch nicht-invasiv ausreichende Informationen zu erhalten (33).

#### 1.5.4 Histologische Einteilung

Als entscheidend für die Auswahl und Verwendung von Organen für die Lebertransplantation haben sich einige histologische Eigenschaften zur Einteilung des Schweregrads der Verfettung etabliert. So wird zunächst anhand der Größe der Fetttropfen in eine mikrovesikuläre (kleine Tropfen) oder eine gemischt bis makrovesikuläre (große Tropfen) Steatosis unterteilt. Weiterhin kann der prozentuale Anteil an verfetteten Hepatozyten auf einem histologischen Leberschnitt in vier Schweregrade eingeteilt: keine Steatose (<5%), milde Steatose (<30%), moderate Steatose (30-60%) und schwere Steatose (>60%) (35). Obwohl sich die Steatose meist im gesamten Lebergewebe ausbreitet, können durchaus lokale Unterschiede in Art und Schweregrad der Verfettung entstehen (32). In Abgrenzung zur NAFLD lassen sich bei der NASH histologisch Leberzellschädigungen in Form von Ballonierung, Nekrose und entzündlichen Zellinfiltraten feststellen.



**Abbildung 1 Einteilung des Steatosegrades der Lebern**  
(A) Normale Leber, (B) milde Steatose, (C) moderarte Steatose, (D) schwere Steatose



## 1.6 Transplantation steatotischer Lebern

Die NAFLD stellt ein zunehmendes Problem in der Transplantationsmedizin dar. NASH als Grund für eine Lebertransplantation erfuhr im Eurotransplantraum in den Jahren 2002 bis 2016 einen Zuwachs von 1,2 % auf 8,4 % (36). In den USA liegt der Anteil bereits bei 18 % (36). Obwohl die Transplantation aufgrund von NASH beim Empfänger vergleichbare Ergebnisse wie die Transplantation aufgrund anderer Pathologien liefert, ergeben sich bei dem Nachweis von Steatosis beim Spender deutliche Einschränkungen (36). Laut einem Review von Chu et al. konnten diverse Studien signifikant schlechtere Ergebnisse der Outcome-Parameter Primäres Organversagen (Primary non function, PNF), beeinträchtigte primäre Funktion (Impaired primary function, IPF), Transplantat- und Patientenüberleben von verfetteten im Vergleich zu nicht-verfetteten Spenderorganen zeigen (25). Hierbei ist jedoch wesentlich das Ausmaß der Verfettung entscheidend. Eine milde Steatose von <30% zeigte kaum Einfluss auf die Parameter, wohingegen eine moderate bis schwere Steatose mit signifikant häufigerem PNF und IPF sowie einem geringeren Transplantat- und Patientenüberleben einherging (25). Kulik et al. zeigten in ihrer Studie, dass 70% der PNFs im Zusammenhang mit verfetteten Lebertransplantaten auftraten (37). Zusätzlich konnte in der Gruppe mit steatotischen Lebertransplantaten im Falle einer Retransplantation ein Patientenüberleben von nur 0,5 Jahren im Vergleich zu 5,1 Jahren in der Gruppe der Transplantation nicht-verfetteter Organe gezeigt werden (37). Wichtig ist jedoch eine weitere histologische Unterteilung in mikrovesikuläre und makrovesikuläre Steatose. Eine mikrovesikuläre Verfettung zeigte nämlich unabhängig von dem Ausmaß der Verfettung keinen Einfluss auf die oben genannten Ergebnisparameter nach Lebertransplantation (22). Aufgrund des erhöhten Risikos der Transplantation werden steatotische Lebertransplantate von vielen Transplantationszentren ab einem Fettgehalt von 30% abgelehnt. Entscheidend für die Ablehnung eines Organes ist jedoch nur das Ausmaß der gemischt bis makrovesikulären Verfettung. Ob die aktuelle histologische Einteilung des Steatosegrades eine ausreichende Einschätzung der Funktionalität des Organs und des Risikos der Transplantation darstellt, ist jedoch fraglich, da beispielsweise in der Studie von Kulik et al. 50% der verfetteten Lebern mit Transplantatversagen eine Steatose von <30% aufwiesen (37). Dies mag unter anderem durch die limitierte Aussagekraft von den präoperativ erhobenen feingeweblichen Untersuchungen bedingt sein, welche häufig als sogenannte Schnellschnittuntersuchungen

durchgeführt werden und nicht den Ansprüchen einer umfassenden Analytik entsprechen (38).

### **1.7 Lagerung und Transport der Organe/ Ischämie-Reperfusionsschaden**

Derzeitiger Goldstandard zu Lagerung und Transport des zu transplantierenden Organs stellt die statische Kältelagerung (static cold storage) dar. Das Organ befindet sich dabei in einer Konservierungslösung wie University of Wisconsin Lösung oder Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) und wird unter hypoxischen und hypothermen Bedingungen bei 4°C gelagert.

Eine befürchtete Komplikation bei der Lebertransplantation und wesentlicher Pathomechanismus des akuten Transplantatversagens ergibt sich hieraus: der Ischämie-Reperfusionsschaden (Ischemia-Reperfusion-Injury, IRI). Aufgrund des Mangels an ATP und Sauerstoff kommt es in der ischämischen Phase zunächst zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies. Zelluläre Bestandteile wie zum Beispiel Lipidmembranen können dabei stark beschädigt werden (39). Die akkumulierenden toxischen Metabolite und der damit einhergehende Gewebeschaden führen im Falle einer Reperfusion zu einer starken Inflammationsreaktion (40). Paradoxe Weise kommt es daher während der Reperusionsphase unter einem erneuten Angebot an Sauerstoff zu einer deutlich stärkeren Schädigung als während der ischämischen Phase (40).

Steatotische Lebern sind aufgrund von zellulären Veränderungen hierfür deutlich anfälliger als nicht-steatotische Lebern. Eine erhöhte Kupfferzellaktivität und die übermäßige Produktion von Reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species, ROS) in den Mitochondrien führen nach der ischämischen Phase der Kältelagerung zu einer starken Schädigung der Hepatozyten bei Reperfusion des Transplantates. Ein Zelluntergang findet hier vor allem in Form von Nekrose statt im Gegensatz zu einer kontrollierten Apoptose bei nicht-steatotischen Lebern (41). Eine weitere Beeinträchtigung stellt die schlechte Mikrozirkulation in steatotischen Lebern dar. Sowohl makrovesikuläre Fetttropfen als auch eine erhöhte Aktivität der Stellatzellen bewirken eine sinusoidale Vasokonstriktion und beeinträchtigen so die Perfusion und Versorgung des Gewebes (39).

Obwohl die Verwendung marginaler Organe, insbesondere steatotischer Lebern, in den letzten Jahren deutlich zugenommen hat, lässt sich ebenfalls eine zunehmende Rate an Ablehnungen feststellen (14). Im Jahr 2016 war an der Charité Universitätsmedizin Berlin die Diagnose Steatosis hepatis in 42 Fällen Grund für die Ablehnung einer Leber. Eine Verwendung dieser abgelehnten Organe hätte in besagtem Jahr insgesamt 63,6% mehr Lebertransplantationen ermöglichen können und besitzt daher ein hohes Potenzial den Spenderpool zu erweitern (14). Da die statische Kältelagerung besagte Probleme besonders bei steatotischen Lebern erzeugt, wird aktuell nach Lösungen gesucht die Zeit zwischen Explantation und Implantation möglichst schonend für das Organ zu überbrücken. Einen Ansatz marginale Lebern zu transportieren und gleichzeitig eine Einschätzung und Verbesserung der Organqualität durchzuführen stellt die Maschinenperfusion dar. Die Leber wird bei diesem Verfahren an ein System angeschlossen, bei dem durch die Verwendung von Pumpen eine dynamische Versorgung des Organs mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet wird. Außerdem sind der Abtransport von entstehenden Abbauprodukten und die Regulation des physiologischen Milieus beispielsweise mithilfe eines Dialysekreislaufes möglich.

## **1.8 Maschinenperfusion**

Die Maschinenperfusion stellt ein vielversprechendes Verfahren für einen schonenderen Transport und eine optimierte Behandlung von Organtransplantaten dar. Dieses Verfahren, welches schon seit längerem in der Nierentransplantation etabliert ist, kommt zunehmend auch in der Lebertransplantation zur Anwendung (42). Kommerziell verfügbare und für die klinische Anwendung zugelassene Perfusionssysteme wie Organ Assist® oder metra® von OrganOx wurden bereits erfolgreich in klinischen Studien getestet (43). Für die Lebermaschinenperfusion stehen verschiedene Perfusionssysteme und -konzepte zur Verfügung, welche sich im Hinblick auf Perfusionstemperatur und Behandlungsdauer sowie das erforderliche Perfusat unterscheiden. Hierbei lassen sich im Wesentlichen die hypotherme, subnormotherme und normotherme Maschinenperfusion unterscheiden. Als wesentliche weitere Anwendungsmöglichkeit der MP neben der optimierten Konservierung muss die Konditionierung marginaler Organe in Betracht gezogen werden. Es handelt sich dabei um die Idee, die Organqualität von suboptimalen

Spenderorganen wie beispielsweise steatotischen oder sehr alten Lebern im Zeitraum von Organentnahme bis -transplantation zu verbessern.

### **1.8.1 Hypotherme Maschinenperfusion (HMP)**

Ausgehend von der statischen Kältelagerung der Organe ist eine sogenannte hypotherme Maschinenperfusion bei Temperaturen zwischen 0 und 12°C naheliegend. Dieses Verfahren basiert auf der Überlegung, die konservierende Wirkung der Kälte zu nutzen und gleichzeitig anfallende schädliche Produkte abzutransportieren. Auch hierbei haben sich in den letzten Jahren verschiedene Techniken entwickelt. So kann grundsätzlich zwischen einer portovenösen Perfusion, ausschließlich über die Pfortader, und einer dualen Perfusion, zusätzlich über die Leberarterie, unterschieden werden. Einen wesentlichen Unterschied stellt auch die Oxygenierung der Perfusionslösung dar. Nach ersten Versuchen durch Guarrera et al. 2010 ohne zusätzliche Sauerstoffzufuhr wurde von der Gruppe um Dutkowski et al. in Zürich die Hypotherme Oxygenierte Maschinenperfusion (HOPE) entwickelt (44, 45). Bei dem HOPE-Verfahren findet eine ein- bis zweistündige Perfusion ausschließlich über die Pfortader am Ende der ischämischen Phase kurz vor Transplantation statt (46). Dabei wird das Organ in einer Perfusionsmaschine von Organ Assist® bei 10°C mit University-of-Wisconsin-Glukonat-Lösung (KPS®) perfundiert (46). Eine Weiterentwicklung dieser Technik stellt das D-HOPE Verfahren aus Groningen dar, bei dem eine duale Perfusion über Pfortader und Arteria hepatica stattfindet. Die Versorgung vor allem des biliären Systems über die Arteria hepatica soll so weiterhin gewährleistet werden (47). Bislang wurde die HMP hauptsächlich im Bereich der Konservierung von DCD Organen verwendet, wobei erste vorklinische Untersuchungen an steatotischen Rattenlebern vielversprechende Ergebnisse zeigten (48).

Die HMP stellt ein relativ sicheres Verfahren dar, da im Falle eines Ausfalls der Maschine die Kältelagerung weiterhin stattfinden kann. Außerdem ist sie vergleichsweise kostengünstig, da ein Transport der Maschinen zum Entnahmeort nicht nötig ist und sich die Maschinen stationär im Transplantationszentrum befinden. Zusätzlich werden keine Sauerstoff-Träger wie Erythrozyten benötigt (49). Nachteil dieser Methode ist jedoch die geringe metabolische Aktivität des Organs. Hierdurch kann weder eine metabolische Rekonditionierung in Form einer Reduktion des

Fettgehalts noch eine Überprüfung der Funktionalität der Leber stattfinden (48, 49). Vor allem in Hinblick auf eine Konditionierung von verfetteten oder anderweitig vorgeschädigten Organen stellen diese Punkte einen entscheidenden Aspekt der Maschinenperfusion dar.

### **1.8.2 Subnormotherme Maschinenperfusion (SMP)/Kontrolliert Oxygenierte Erwärmung**

Eine Alternative zur hypothermen stellt die subnormotherme Maschinenperfusion dar. Ursprünglich wurde hiermit ein Temperaturbereich von 12-35°C beschrieben. Hiervon wird jedoch zunehmend abgewichen und stattdessen eine weitere Unterteilung zwischen *midtherm* (13-24°C) und *subnormotherm* (25-34°C) angewendet. Grund dafür ist der deutliche Unterschied in der metabolischen Aktivität der Leber zwischen diesen beiden Bereichen. Durch die wärmeren Temperaturen kann sowohl eine geringere vaskuläre Resistenz als auch eine niedrigere Viskosität des Perfusats erreicht werden und somit zu einer verbesserten Mikrozirkulation des Organs führen. Auch die Funktionalität der Leber lässt sich in geringem Maße aufgrund von verbesserter Stoffwechsellistung der Zellen bei höheren Temperaturen des subnormothermen Bereichs anhand von Galleproduktion und Sauerstoffaufnahme testen (49).

Vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf Organpräservierung und -funktion konnten bislang nur im Tierversuch gezeigt werden. Hierbei ist zwar eine Konservierung von steatotischen Lebern und Erhalt der histologischen Strukturen sehr gut möglich (50), eine Reduktion des Fettgehalts konnte jedoch nicht erreicht werden (51). Daten zur Transplantation dieser Organe liegen bislang nicht vor, daher ist fraglich, ob hierbei eine ausreichende metabolische Rekonditionierung stattfand.

Eine Verbindung von HMP, SMP und normothermer Maschinenperfusion (NMP) könnte die kontrolliert oxygenierte Erwärmung (Controlled oxygenated rewarming, COR) sein. Hierbei findet nach kurzzeitiger Kältelagerung ein gradueller Anstieg von hypothermen über subnormotherme bis hin zu normothermen Temperaturen statt. Dabei soll der schädliche Effekt des plötzlichen Temperaturanstieges verhindert und zusätzlich die Möglichkeit einer funktionellen Überprüfung des Organs gegeben werden (52). Erste positive Ergebnisse konnten bereits sowohl am Tiermodell als auch in einer ersten klinischen Studie gezeigt werden (53, 54). Effekte auf marginale

humane Organe wie steatotische Lebern sind bislang jedoch noch nicht untersucht worden.

### **1.8.3 Normotherme Maschinenperfusion (NMP)**

Bei der normothermen Maschinenperfusion wird das Organ bei 35-37°C perfundiert. Es soll so ein annähernd physiologisches Milieu fortbestehen, um die Lagerung und Transport der Leber möglichst schonend zu gestalten. Ravikumar et al. konnte bereits zeigen, dass NMP ähnliche Ergebnisse bei Transplantation von nicht-marginalen Organen wie die statische Kältelagerung liefert (55). Ziel ist es jedoch mit Hilfe von NMP den Spenderpool durch die optimierte Lagerung und gegebenenfalls Konditionierung marginaler Organe wie z.B. steatotischer Lebern zu erweitern. Die schnelle Wiederaufnahme der Oxygenierung und eine verkürzte Phase der statischen Kältelagerung sollen die anfälligen marginalen Organe vor dem IRI schützen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil der NMP gegenüber HMP und SMP ist die metabolische Aktivität des Organs. Hierdurch könnte zum einen eine metabolische Rekonditionierung stattfinden, bei der durch pharmakologische Einwirkung und Aktivierung des Fettstoffwechsels der Leber, eine Reduktion des Fettgehalts erreicht werden könnte. Auf der anderen Seite lässt sich hieran die Funktionalität und Beschaffenheit steatotischer oder alter Organe bestimmen und das Risiko einer nicht-erfolgreichen Transplantation abschätzen (56).

Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch ein deutlich höherer logistischer und finanzieller Aufwand. Auch die Durchführung und Technik der Perfusion ist deutlich komplizierter als beispielsweise eine hypotherme Perfusion. Um eine zeitnahe Perfusion des Organs am Ort der Explantation durchzuführen und somit einen maximalen Nutzen der Behandlung zu gewährleisten, braucht es außerdem für dieses Verfahren transportable und benutzerfreundliche Geräte.

### **1.8.4 Experimentelle Maschinenperfusion**

Trotz der weit fortgeschrittenen Technik der Maschinenperfusion ist eine experimentelle Forschung in diesem Themengebiet, insbesondere im Kleintiermodell nötig. Eine Optimierung der Perfusion und erste Ansätze zur pharmakologischen Behandlung und Verbesserung der Organqualität lassen sich hierbei in

standardisierten Verfahren mit hohen Fallzahlen untersuchen. Jedoch stellt sich die Entwicklung einer passenden Perfusionsmaschine zur normothermen Perfusion und anschließenden Transplantation als kompliziertes Verfahren dar. Bislang konnte dies nur mit gesunden Rattenlebern von wenigen Arbeitsgruppen durchgeführt werden (57, 58). Durch Forschungen in unserer Arbeitsgruppe konnte ein System entwickelt werden, welches die Organintegrität über einen Zeitraum von 6 Stunden aufrechterhält (59). Es kristallisierten sich dabei in einem mehrstufigen Etablierungsprozess die wesentlichen Faktoren zur erfolgreichen normothermen Perfusion heraus. Entscheidend für das Überleben des Organs erwies sich die Zufuhr von Erythrozyten als Sauerstoffträger. Um eine ausreichende Konzentration der Erythrozyten zu gewährleisten musste ebenfalls das Volumen des Kreislaufes auf ein Minimum reduziert werden. Letztlich zeigte die Verwendung eines Dialysekreislaufes zum Erhalt des physiologischen Milieus eine zusätzliche Verbesserung der Perfusionsleistung (60).

## **1.9 Metabolische Rekonditionierung**

Unter einer metabolischen Rekonditionierung wird eine durch pharmakologische oder nicht-pharmakologische Behandlung verbesserte metabolische Aktivität des Organs verstanden. Im Falle der steatotischen Lebern wird vermutet, dass durch eine Reduktion des Fettgehalts das Organ in einen besseren Zustand versetzt wird und so zum einen metabolisch aktiver ist und zum anderen Folgen der Transplantation wie den Ischämie-Reperfusionsschaden eher verkraften kann. Bisherige Versuche der Entfettung fanden hauptsächlich in der Zellkultur oder im Tierversuch statt. Zufriedenstellende Ergebnisse, welche als sicheres Verfahren in den klinischen Alltag übertragen werden könnten, wurden bislang noch nicht gezeigt.

Erste Versuche zur Entfettung ausschließlich durch NMP wurden von Jamieson et al. am Schweinemodell untersucht (61). Hierbei wurden Lebern mit milder Steatose von <30 % normotherm perfundiert. Es konnte eine Reduktion des Fettgehalts nach 24 bzw. 48 Stunden gezeigt werden. Interessanterweise wurde gleichzeitig eine Zunahme des Fettgehalts in der nicht-steatotischen Kontrollgruppe festgestellt. Auch Nagrath et al. konnten bei Rattenlebern nach nur 3 Stunden NMP eine 30-prozentige Verringerung des Triglyceridgehalts registrieren (62). Die Gruppe um Boteon aus

Birmingham postuliert daher, dass eine 3-stündige Perfusion einen zufriedenstellenden Entfettungseffekt erreichen kann (63). Im humanen Modell konnte dieser Effekt allerdings auch nach 24 Stunden Maschinenperfusion nicht gezeigt werden. Bei zehn abgelehnten steatotischen Lebern wurde keine relevante histologisch sichtbare Veränderung des Verfettungsgrades erreicht (64).

Um in dem geringen Zeitfenster der MP einen möglichen Entfettungseffekt zu verstärken, rückt die pharmakologische Beeinflussung des perfundierten Organs immer weiter in den Fokus der Forschung. Hierbei werden verschieden Ansätze verfolgt, wie beispielsweise ein „Entfettungscocktail“, bestehend aus verschiedenen fettreduzierenden Substanzen, L-Carnithin oder dem Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (62, 65, 66). Die Tatsache, dass die Wirkung sowohl eines Entfettungscocktails als auch von GDNF auf den gesamten menschlichen Organismus unklar ist, legt den Nutzen einer bereits klinisch pharmakologisch anerkannten Substanz nahe. Auch die Übertragung von Dosierungen aus dem Tiermodell auf den Menschen stellt ein schwieriges Hindernis dar. Erkenntnisse über Funktion und Wirkung von GDNF durch die Gruppe um Mwangi et al. zeigten eine Beeinflussung der zellulären Autophagie im Sinne einer Verstärkung und eine damit einhergehende erhöhte  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren (67). Autophagie, ein für die Zelle wichtiger Fettstoffwechselprozess, wird auch von dem klinisch angewandten mammalien Target of Rapamycin (mTOR)-Inhibitor Rapamycin positiv beeinflusst (68). Diese pharmakologische Stellschraube hat daher ebenfalls das Potenzial einen Entfettungseffekt an steatotischen Lebern zu zeigen und gleichzeitig eine umfassend getestete Sicherheit für den menschlichen Organismus zu bieten. Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Transplantation nach metabolischer Rekonditionierung ist ein intaktes und funktionales Organ. Ein Mangel dieser Bedingungen könnte Ursache für die bislang erfolglosen Transplantationen der vergangenen Forschungsarbeiten sein.

### **1.10 Autophagie und mTOR-Inhibition**

Autophagie wird bereits seit einiger Zeit als wesentlicher Prozess des Fettmetabolismus der Zelle gesehen. Beeinflusst wird dieser Stoffwechselprozess durch den mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signalweg. Durch eine Inhibition des Signalweges findet hier eine Verstärkung der Autophagie statt (69).



Grundsätzlich lassen sich zwei Pfade des mTOR-Signalweges unterscheiden: mTORC1 und mTORC2. mTORC1 kann auf viele verschiedene zelluläre Prozesse Einfluss nehmen und ist für Stoffwechsellhomöostase und Zellwachstum des Körpers verantwortlich (70). mTORC2 hingegen ist für Zellproliferation und -überleben zuständig (70). Durch Nahrungsaufnahme, Glukose und Insulin stimuliert führt eine Aktivität des mTORC1-Signalweges zu einer anabolen Stoffwechsellage mit gesteigerter Protein-, Nukleotid- und Lipidsynthese (70). Gleichzeitig werden katabole Stoffwechselprozesse wie Lipolyse,  $\beta$ -Oxidation und Autophagie unterdrückt (70). Fehlregulationen und verstärkte Aktivität des mTOR-Signalweges in Leber- und Muskelgewebe adipöser Ratten konnte bereits gezeigt werden (71). Hierin könnte ein wesentlicher Pathomechanismus in der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Übergewicht und Insulinresistenz liegen (72). Die Beeinflussung der katabolen Stoffwechselprozesse, welche durch Inhibition des mTORC1-Signalweges verstärkt werden, ist daher von großem Interesse für die Forschung. So konnten Soliman et al. zeigen, dass eine vierstündige Behandlung von Adipozyten mit dem mTOR-Inhibitor Sirolimus (Rapamycin) eine deutlich erhöhte Lipolyseaktivität bewirkte (73). Die Gruppe um Brown et al. konnte außerdem bei Rattenhepatozyten eine bis zu 100 % verstärkte  $\beta$ -Oxidation und eine um 60 % verminderte de novo-Lipidsynthese erreichen (74).

Autophagie spielt eine wesentliche Rolle in der Beeinflussung des katabolen Fettstoffwechsels (75). Aus dem Griechischen übersetzt mit „Selbst essen“ beschreibt dieser Prozess den durch die Zelle kontrollierten Abbau eigener Organelle wie Mitochondrien zum Zweck der Energiegewinnung (69). Im Falle des Abbaus von Fetttropfen wird auch von Lipophagie gesprochen (75). Umgeben von einer Lipiddoppelschicht bildet sich um das Zellorganell ein sogenanntes Autophagosom. Dieses verbindet sich anschließend mit einem Lysosom und ermöglicht den Abbau und die Bereitstellung von Energiesubstraten. Die Gruppe um He et al. konnte bei verfetteten Mäusen und humanen hepatischen L-O2 Zellen durch die Gabe des Glucagon-like-peptides-1 (GLP-1) Liraglutid Autophagie induzieren und eine Reduktion des Fettgehalts erreichen (76).

Neben dem positiven Einfluss auf den Fettstoffwechsel hat die mTOR-Inhibition weitere vorteilhafte Effekte in Bezug auf die Lebertransplantation. Boteon et al. gehen von einer Elimination geschädigter Zellorganelle und einer Unterstützung des Gewebes mit Nährstoffen durch den Prozess der Autophagie aus (77). Eine

Verbindung aus normothermer Maschinenperfusion und induzierter Autophagie soll daher eine protektive Wirkung auf hepatische Endothelzellen haben und dadurch das Risiko eines IRI mindern. Auch die Gruppe um Lee et al. konnte durch den mTOR-Inhibitor Everolimus nach Ischämie und Reperfusion eine verstärkte Autophagieaktivität wahrnehmen und eine damit einhergehende verbesserte Leberfunktion und –histologie erreichen (78).

Einen weiteren Punkt stellt der Einfluss des mTOR-Signalweges auf den Alterungsprozess dar. Rapamycin scheint bisher die einzige Substanz zu sein, die einen lebensverlängernden Effekt auf bestimmte Organismen wie Mäuse hat und könnte so ebenfalls zu einer Rekonditionierung von alten Spenderorganen beitragen (70).

### **1.11 Everolimus**

Everolimus ist ein seit 2013 zugelassenes Derivat des mTOR-Inhibitors Rapamycin (Sirolimus). Es besitzt im Vergleich zu Sirolimus eine leicht verbesserte orale Bioverfügbarkeit und wird klinisch zum einen als Immunsuppressivum nach Transplantation und zum anderen als wirkungsvolles antineoplastisches Medikament bei diversen Tumorerkrankungen angewendet (79, 80). Die immunsuppressive Wirkung entsteht vor allem durch Inhibition der T-Zell Proliferation. In Gegensatz zu anderen immunsuppressiven Medikamenten wie Cyclosporin und Tacrolimus besteht bei Everolimus eine geringere nephrotoxische Wirkung (81). Als häufige Nebenwirkung wird eine Dyslipidämie beschrieben. Laut den Erkenntnissen der Forschung mit mTOR-Inhibitoren ist jedoch nicht eine gesteigerte Lipidsynthese ursächlich dafür, sondern eine vermehrte Lipolyse und ein damit einhergehende verzögerter Lipidabbau (74). Therapeutisch wirksame Serumkonzentrationen werden mit 3 bis 8 ng/mL angegeben (80). Die Perfusion eines isolierten Organs ermöglicht jedoch eine pharmakologische Behandlung mit wesentlich höheren Dosierungen, ohne den gesamten Körper zu beeinflussen. Metabolische Prozesse können dadurch möglicherweise stärker aktiviert werden, ohne therapielimitierende systemische Reaktionen zu erzeugen.

## 1.12 Versuchsvorhaben und Fragestellung

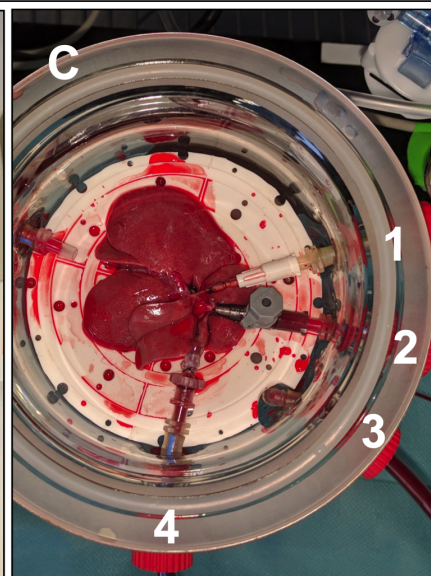
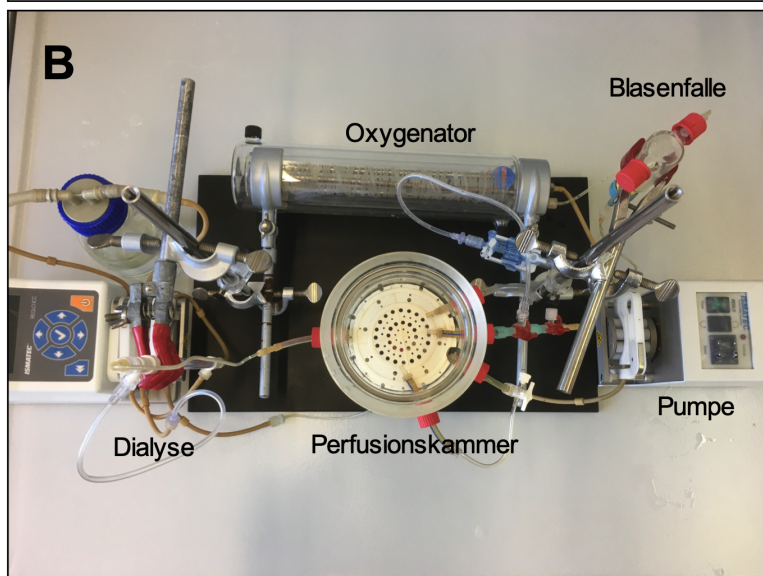
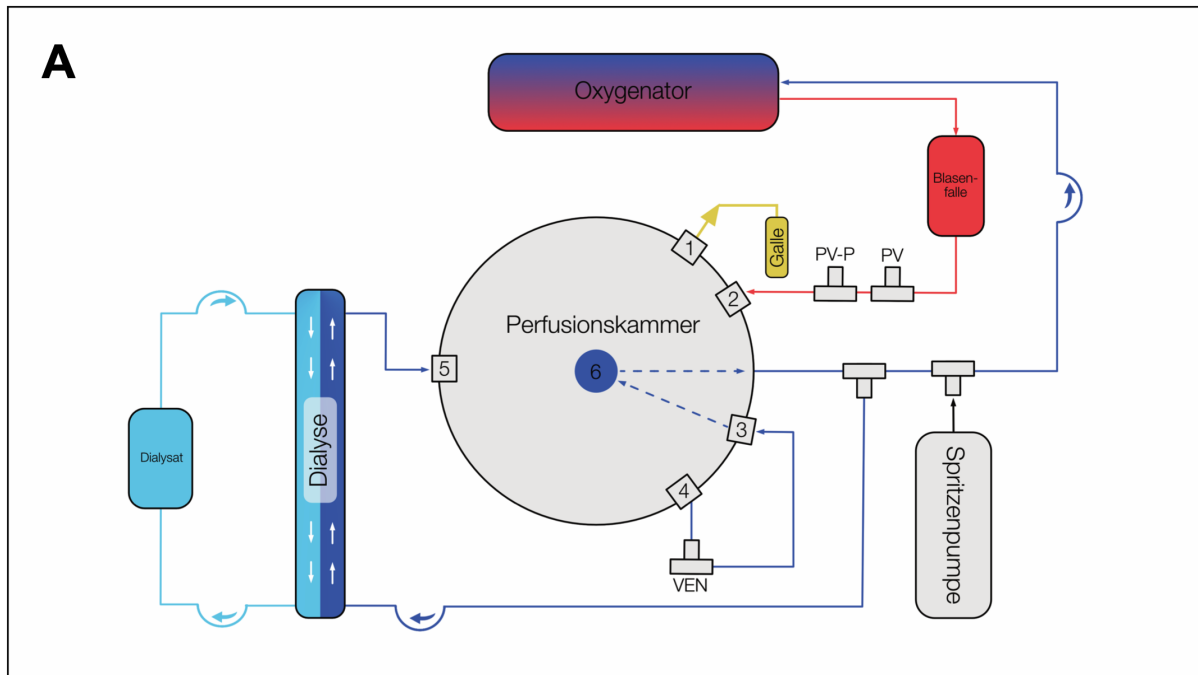
Mit dem Versuchsvorhaben dieser Doktorarbeit wurde das Konzept der pharmakologischen Beeinflussung steatotischer Rattenlebern mittels ex-vivo-Maschinenperfusion im Kleintiermodell untersucht. Steatotische Rattenlebern wurden über einen Zeitraum von drei Stunden mit Hilfe des in unserer Arbeitsgruppe etablierten miniaturisierten Perfusionskreislaufes perfundiert. Hierbei wurde die Vitalität des Organs anhand von Syntheseparametern, Labordiagnostik und histologischer Beschaffenheit gemessen. Wesentlicher Kernpunkt dieser Arbeit stellte der Einfluss des mTOR-Inhibitors Everolimus auf den Fettgehalt des Lebergewebes und den histologischen Steatosegrad als Zeichen einer metabolischen Rekonditionierung dar. Auch eine mögliche Verbesserung der Perfusionsqualität durch die pharmakologische Beeinflussung wurde getestet. Aus besagtem Versuchsvorhaben ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Ist eine normotherme Maschinenperfusion steatotischer Rattenlebern unter Erhalt der Vitalität des Organs über 3 Stunden möglich?
2. Nimmt der mTOR-Inhibitor Everolimus positiven Einfluss auf den Verlauf und die Ergebnisse der Perfusion?
3. Ist durch den mTOR-Inhibitor Everolimus eine Reduktion des Fettgehalts und des histologischen Steatosegrades im Sinne einer metabolischen Rekonditionierung möglich?

## 2 Methodik

### 2.1 Versuchsaufbau

Zur Perfusion einer Rattenleber wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Kreislaufsystem entwickelt (60). Zentraler Bestandteil des Kreislaufs war ein speziell angefertigter Glasreaktor mit insgesamt 6 Zugängen (Flanschgefäß DN 100, Glas Gaßner GmbH, München, Deutschland). Mithilfe von geöffneten Schraubkappen und Dichtungsringen GL14 (Glas Gaßner GmbH, München, Deutschland) ließen sich an diesen Zugängen Silikonschläuche befestigen, welche die Verbindung von Organ und System herstellten. Innerhalb dieses Perfusionsreaktors wurde das Organ auf eine Silikonmatte platziert, die wiederum auf einem Silikonring lag. Unterhalb dieses Ringes konnte sich so ein Reservoir bilden, welches über einen konisch zulaufenden Ausgang im Boden ablief. Über Heidelberger Silikonschläuche (30 cm, Ø 1.2 mm, B. Braun, Melsungen, Deutschland), Dreiweghähne (B. Braun, Melsungen, Deutschland) und Pumpenschläuche wurde die Verbindung zu einer flusskontrollierten Rollerpumpe (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) hergestellt. Eine Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min/g Lebergewicht wurde darüber erzeugt. Anschließend folgte die Verbindung zu einem Oxygenator (Radnoti, Dublin, Irland), über welchen der Gasaustausch stattfand. Dafür verlief ein 300 cm langer Silikonschlauch mit einem Füllvolumen von 10ml durch eine Glaskammer, welche über ein Gasmischgerät (DASGIP, Dasgip Technology, Jülich, Deutschland) mit 90 % Sauerstoff angereichert wurde. Es schloss sich eine gläserne Luftblasenfalle (Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus, March-Hugstetten, Germany) an. In diese ebenfalls nach unten konisch zulaufende Glaskammer gelangte das Perfusat von oben und bildete am Boden ein Reservoir. Unerwünschte Luftblasen stiegen in diesem Reservoir nach oben und wurden somit nicht innerhalb des Systems weitergetragen. Hierdurch konnten für das Organ kritische Luftembolien verhindert werden. Nun verlief das System weiter in Richtung des portalvenösen Zugangs der Leber. Ein vorgeschalteter Drucksensor (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) ermöglichte eine kontinuierliche Druckmessung und Aufzeichnung über die BDAS 2.0 Software (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Der Einfluss in die Leber und die Versorgung mit oxygeniertem Blut wurde über die kanülierte Pfortader (am Zugang 2 des Reaktors) gewährleistet. Der Ausfluss des Perfusates erfolgte über die infrahepatische Vena cava abdominalis.



**Abbildung 2 Versuchsaufbau**

(A) Schematische Zeichnung, (B) Foto Versuchsaufbau, (C) Leber in Reaktor angeschlossen an Kreislauf; es lassen sich von oben gegen den Uhrzeigersinn die fünf Leberlappen Links-lateral, Links-medial, Rechts-medial, Rechts-lateral und Caudatus erkennen

Diese wurde an einen Kreislauf angeschlossen, in dem das Perfusat in Zugang 4 aus dem Reaktor hinausgeführt und in Zugang 3 wieder in den Reaktor hineingeführt wurde. Durch einen zwischengeschalteten Dreiwegehahn konnte an dieser Stelle die venöse Probenentnahme ermöglicht werden. Der von Zugang 3 weiterführende Silikonschlauch verlief direkt zum konisch zulaufenden Bodenausgang. Hierbei handelte es sich um einen durchlöcherten Schlauch, welcher eine Durchmischung mit dem im Reservoir befindlichen Perfusat sicherstellte.

Ein weiterer Bestandteil des Systems stellte der Dialysekreislauf dar. Zur Aufrechterhaltung von nahezu physiologischen Perfusionsparametern wie Kalium und pH konnte in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe die Notwendigkeit der Dialyse gezeigt werden (59, 60). Hierfür wurde ein separater Kreislauf zum Hauptkreislauf parallelgeschaltet. Ein Teil des Perfusats wurde unterhalb des Reaktorausgangs umgeleitet und über eine Multi-Channel-Pumpe (Cole-Parmer, Wertheim, Germany) von unten nach oben durch die Dialysekartusche (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) gepumpt. Anschließend gelangte das frisch dialysierte Blut über einen offenen Eingang zurück in das Reservoir des Reaktors, wo aufgrund des zuvor erwähnten durchlöcherten Schlauchs eine Durchmischung mit dem venösen Blut ermöglicht wurde. CiCa Dialyseflüssigkeit (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Deutschland) wurde im Sinne des Gegenstromprinzips mithilfe derselben Multi-Channel-Pump von oben nach unten durch die Dialysekartusche geleitet.

## **2.2 Tiere, Versuchsgruppen, Verfettungsprotokoll**

Männliche Sprague Dawley Ratten wurden im Alter von 4 Wochen mit einem Gewicht von ca. 75 g von der Firma Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) erworben und artgerecht bei einem 12 stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Genehmigung zur Ausführung der Versuche durch die zuständigen Behörden lag vor (LaGeSo Berlin, G0185/17). Allen Tieren wurde eine Eingewöhnungsphase von mindestens einer Woche ermöglicht, um übermäßige Stressreaktionen während des Versuchssettings aufgrund von Transport und ungewohnter Umgebung zu vermeiden. Während dieser Zeit fand eine Fütterung mit normalem Futter und Wasser ad libitum statt.

Ein geeignetes Verfettungsprotokoll zur Erzeugung einer Nicht-Alkohol-induzierten-Fettleber musste zunächst über mehrere Schritte etabliert werden. Bei der Wahl des Spezialfutters wurde sich für die Hochfettdiät der Firma Altromin entschieden (DIO, C1090, 10 mm Pellets, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland). Dieses besitzt einen Fettanteil von 70 % und soll so dem Induktionsmechanismus des humanen Krankheitsbildes der NAFLD am nächsten kommen (82). Im Hinblick auf die spätere Transplantation der perfundierten Organe mussten folgende Kriterien für die Wahl des Rattenstamms eingehalten werden: 1) Es musste eine Hepatosteatose von >30 % vorliegen 2) Die Steatose musste vom Typ gemischt- bis makrovesikulär sein 3) Ein Tiergewicht von 350 g durfte nicht überschritten werden. Die Wahl des Rattenstamms fiel zunächst auf männliche Wistar-Ratten, da in der Arbeitsgruppe langjährige Erfahrung im Umgang und der operativen Behandlung dieser Tiere bestand. Hier zeigte sich jedoch eine deutliche Gewichtüberschreitung nach drei Wochen Fütterung mit der Fettdiät. Eine weitere Option stellten männliche Lewis inbreed Ratten dar. Hierbei handelt es sich um einen häufig verwendeten Rattenstamm für die Lebertransplantation im Kleintiermodell, da eine Immunsuppression nach Operation nicht notwendig ist. Es zeigte sich jedoch nach drei Wochen Fütterung eine mikrovesikuläre Steatose mit weniger als 30 % Fettgehalt. Männliche Sprague Dawley (SD)-Ratten stellten in weiterer Etablierung ein passendes Modell dar. Es konnte bereits in vorangegangenen Studien ein gutes Ansprechen auf das ausgewählte Fettfutter und eine geeignete Wachstumskurve gezeigt werden (83). Nachteil dieses Rattenstamms ist jedoch, dass eine leichte Immunsuppression nach Transplantation notwendig ist.

Die Tiere wurden nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase über 21 Tage mit der Fett-Diät und Wasser ad libitum gefüttert. Anschließend fand eine zufällige Einteilung in die verschiedenen Versuchsgruppen statt:

- 1) Steatotische Leber, 3 Stunden Perfusion, 0 ng/ml Everolimus (n=6)
- 2) Steatotische Leber, 3 Stunden Perfusion, 5 ng/ml Everolimus (n=6)
- 3) Steatotische Leber, 3 Stunden Perfusion, 25 ng/ml Everolimus (n=6)
- 4) Steatotische Leber, 3 Stunden Perfusion, 50 ng/ml Everolimus (n=6)
- 5) Steatotische Leber, keine Perfusion (n=5)
- 6) Nicht-steatotische Leber, keine Perfusion (n=3)

## **Chirurgisches Vorgehen: Leberexplantation**

Das Tier wurde zunächst in einer Narkosekammer durch ein fünf prozentiges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch bei einem Fluss von 2 l/min narkotisiert. Zusätzlich wurden über eine Depotinjektion in die Nackenfalte 100 mg/kg KG Metamizol (Winthrop Arzneimittel GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 12 mg/kg KG Ketamin (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) zur analgetischen und anästhetischen Wirkung appliziert. Der weitere Verlauf der Narkose wurde durch Inhalation von Isofluran über eine Atemmaske gesteuert.

Die Operation wurde in einem sterilen Umfeld durchgeführt, um spätere Keimbelastung während der Maschinenperfusion zu minimieren. Zunächst wurde ein venöser Femoraliskatheter gelegt, um hierüber eine 300 mmol Glycin-Ringergemisch zu applizieren. Glycin als einfache Aminosäure hat eine inhibierende Wirkung auf die Kupferzellen der Leber, welche als wesentlicher Initiator des Ischämie-Reperfusionsschadens gelten (60, 84). Zur Katheterisierung der Vena femoralis wurde an der medialen Seite des Oberschenkels ein Hautschnitt durchgeführt und die Femoralisgefäße stumpf freipräpariert. Nach Anschlingen der Gefäße wurde mittels 14G Kanüle (B. Braun Vasofix Safety Kanüle 14G 50 mm) ein Zugang zur Vena femoralis gelegt. Anschließend erfolgte eine initiale Bolusgabe von 1ml und eine kontinuierliche Zufuhr von 1 ml/h über einen Perfusor® (B. Braun Melsungen, Deutschland).

Das Abdomen wurde nun mittels U-förmiger Laparotomie eröffnet. Eine Mobilisierung der Leber fand durch Lösen der ligamentären Strukturen Ligamentum falciforme, coronarium, hepatoduodenale und hepatogastricum statt. Nun wurde die Leber nach kranial geklappt, um die Leberpforte sichtbar zu machen. Das Auslagern des gesamten Gastrointestinaltrakts und das Ankleben des Duodenums machten das Operationsfeld besser erreichbar. Nun wurden Vena (V.) und Arteria (A.) gastrica dextra, V. und A. suprarenalis dextra und V. oesophagealis mittels 7/0 Seidenfäden (Resorba, 90475 Nürnberg, Deutschland) ligiert. Der Gallengang wurde über eine Strecke von 0,5 cm mithilfe einer, in der Arbeitsgruppe entwickelten, 10 cm langen Kanüle kanüliert. 500 IE Heparin (Rotexmedica, Trittau, Deutschland) auf 1 ml Ringerlösung wurden über die abdominelle V. cava injiziert. Nach Kanülierung der abdominellen Aorta mittels 16G Kanüle (B. Braun Vasofix Safety Kanüle 16G 1,7 x 50 mm) wurde das Blut entzogen und für spätere Zwecke kühl gelagert. Das Zwerchfell wurde nun eröffnet, die thorakale V. cava angeschnitten und die thorakale



Aorta abgeklemmt. Anschließend wurde die Leber mit 20 ml 4 °C kaltem HTK, welches mit 12 mM Glycin versetzt wurde, gespült. Mit einer zugeschnittenen 20G Kanüle (B. Braun Vasofix Safety Kanuele 20G) wurde die Pfortader kanüliert und ebenfalls mit 20 ml HTK gespült. Mit Kanülierung der Pfortader fand ebenfalls eine Ligatur der A. hepatica propria statt. Des Weiteren wurde eine Kanülierung der infrahepatischen V. cava abdominalis mittels eigenangefertigter 10F Kanüle durchgeführt. Um einen einseitigen Ausfluss zu gewährleisten wurde die suprahepatische V. cava abdominalis mit einem 3-0 Faden (Resorba, 90475 Nürnberg, Deutschland) ligiert und durchtrennt. Nach Lösen der restlichen bindegewebigen Strukturen konnte die Leber in einen mit 60 ml HTK und 12 mM Glycin gefüllten vorgewogenen Behälter transferiert und auf Eis gelagert werden.

### **2.3 Versuchsdurchführung**

Die Leber wurde zunächst gewogen und anschließend aus dem Behälter entnommen, um auf Unversehrtheit und Sitz der Kanülen zu prüfen. Auch hierbei wurde in einem sterilen Umfeld gearbeitet. Es wurde mit 20ml Ringerlösung über die Pfortader gespült, um das Organ vom HTK zu befreien. Die Leber wurde nun über die Kanüle der Pfortader an das bereits laufende System angeschlossen. Die homogene Reperfusion aller Leberlappen musste beobachtet werden. Bei stetigem Ausfluss aus der V. cava Kanüle konnte diese mit dem System verbunden werden. Zuletzt musste geprüft werden, ob ein Gallefluss erkennbar war, um auch diese Kanüle mit dem Reaktorausgang zu verbinden und in ein externes vorgewogenes Kryoröhrchen (CryoPure Gefäß, 1,6 ml weiß, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) zu leiten. Der Reaktor wurde abschließend mit einem Deckel und einer Metallzwinde luftdicht verschlossen.

Das Perfusionssystem wurde anschließend in einen auf 37 °C vorgeheizten Wärmeschrank transferiert und an eine extern kontrollierbare Pumpe und Druckmessung angeschlossen. Um eine verlässliche Druckaufzeichnung zu gewährleisten, musste der Druck des Systems zum äußeren Druck kalibriert werden. Die Flussgeschwindigkeit wurde nun langsam kontinuierlich erhöht, bis das Ziel von 1ml/min/g Lebergewicht erreicht wurde. Das Erreichen der endgültigen Flussgeschwindigkeit stellte den Zeitpunkt T0 dar. Einfluss, Ausfluss und Fluss des Perfusats durch die Dialysekartusche wurden zunächst bei jedem Versuch auf 10

ml/min eingestellt. Diese mussten jedoch individuell je nach Volumenverschiebung über die Dauer des Versuches adaptiert werden. Eine kontinuierliche Volumengabe von 0,5 ml 1,2 M Glycin und 500 I.E. Heparin auf 0,1 ml Ringerlösung pro Stunde erfolgte über eine Perfusor® (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland).

Nach Beenden des Versuchs wurde die Leber über die Pfortader mit 20ml 4 °C kalter Ringerlösung gespült. Anschließend wurde es in einem mit 4 °C kalter Ringerlösung gefülltem Behältnis gelagert. Proben von jedem der fünf Lappen wurden sowohl in 4%iger Formaldehydlösung (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) als auch in flüssigem Stickstoff fixiert. Zusätzlich erfolgte die Fixierung einer Probe des rechten medialen Lappens mittels 2,5%iger Glutaraldehyd in 0,1M Natrium-Cacodylatpuffer (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) zur späteren elektronenmikroskopischen Auswertung. Die Kryo-fixierten Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert. Die in Formaldehyd gelagerten Proben wurden nach einer 48 stündigen Fixierung mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet.

## **2.4 Messung von biochemischen Markern, Blutgasanalyse und Galleproduktion**

Proben für die Blutgasanalysen von sowohl portovenösem und venösem Perfusat als auch vom Dialysat wurden zu Beginn (T0) und Ende (T3) der Perfusion abgenommen und mit dem ABL800 FLEX (Radiometer GmbH, Berlin, Deutschland) gemessen. Es wurden dabei pH, Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid-Partialdruck, die Elektrolyte Natrium, Kalium, Kalzium und Chlorid, Glukose, Laktat, Hämoglobin (Hb) und der Hämatokrit (Hct) untersucht. Venöse Labor- und Rückstellproben wurden ebenfalls zu den Zeitpunkten T0 und T3 entnommen. Diese wurden über 10 Minuten bei 4 °C und 3200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand der Proben zur photometrischen Messung von ALT, AST, Harnstoff, Bilirubin und Laktatdehydrogenase (LDH) durch das Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH verwendet. Zusätzlich erfolgten ein stündlicher Wechsel und anschließendes Wiegen der Galleröhrchen.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Unterstützung bei Versuchsaufbau, Durchführung und Probenentnahme durch Felix Claussen, Joseph Gaßner, Simon Moosburner, Maximilian Nösser, Lara Wegener

### 2.4.1 Laktat-Clearance

Folgende Formel zur Berechnung der Laktat-Clearance wurde aus „Diagnostik im Dialog der Rocher Diagnostic Deutschland GmbH“ entnommen (85):

$$\text{Laktat-Clearance} = \frac{\text{LaktatStart} - \text{LaktatAktuell}}{\text{LaktatStart}} \times \frac{100}{\text{Zeitdifferenz [h]}}$$

Bei LaktatStart handelte es sich hier um den zum Zeitpunkt T0 gemessenen portovenösen Laktat-Wert. Als LaktatAktuell wurde der portovenöse Laktat-Wert zum Zeitpunkt T3 am Ende der Perfusion gewählt. Die Zeitdifferenz entsprach dementsprechend 3 Stunden. Um eine stündliche Laktat-Clearance zu erreichen, wurde der berechnete Wert wiederum durch 3 geteilt.

### 2.4.2 Oxygen Uptake Ratio (OUR)

Die Oxygen Uptake Ratio wurde anhand der von Nagrath et al. verwendeten Formel berechnet (62):

$$\text{OUR} = \frac{V[C_{O_2, \text{inflow}} - C_{O_2, \text{outflow}}]}{\text{liver weight}}$$

Hierbei stellte  $V$  den Perfusionsfluss in Milliliter pro Minute dar.  $C_{O_2}$  entsprach der Sauerstoff-Konzentration in nM für jeweils inflow (portovenös) und outflow (venös). Diese wurde mithilfe der Formel  $C_{O_2} = 0,0031 \times PO_2$ , bei der 0,0031 die Sauerstofflöslichkeit in wässriger Lösung bei 37 °C darstellt und  $PO_2$  den Sauerstoffpartialdruck (62). Die OUR wurde jeweils für die Zeitpunkte T0 und T3 berechnet.

## **2.5 Zusammensetzung Perfusat, Erythrozytenlagerung, Everolimus Stock-Solution**

### **2.5.1 Modified Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland)**

Als Grundlage für das Perfusat wurde ein mit Zusätzen versehenes Zellkulturmedium verwendet. Das verwendete DMEM enthielt mit 1 g/L nur wenig Glukose und zusätzlich Pyruvat, jedoch kein L-Glutamin oder Phenolred. Es wurden außerdem folgende Stoffe auf 500 ml DMEM hinzugefügt:

- L-Alanine, L-Glutamine (Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland) 1 mmol
- Penicillin/Streptomycin (Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland) 500 U
- Glukagon (Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz, Deutschland) 7 µg
- Insulin human (Lilly GmbH, Gießen, Deutschland) 6 I.E.
- Heparin 500 I.E.
- Dexamethason (Merck Serono GmbH, Darmstadt, Deutschland) 80 µg
- Hapes Puffer(Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland) 7,5 mmol

Abschließend wurde eine sterile Filtration mittels Thermo Scientific Rapid Flow Filter (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) und VacuSafe (Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz) durchgeführt.

### **2.5.2 Erythrozytenkonzentrat**

Das Rattenblut wurde bei 4 °C und 3200 rpm über 15 Minuten zentrifugiert. Hierbei wurde sowohl das während der Operation entnommene Blut als auch Blut, welches im Zuge von Gewebeentnahmen wie Leber, Knochen und Pankreas (LaGeSo, Berlin, T0301/17) gewonnen wurde, verwendet. Das Blut wird während der Zentrifugierung in drei Phasen aufgeteilt. Die unteren zwei Phasen stellen den korpuskulären Anteil des Blutes dar. Die untere Phase enthält im Wesentlichen Erythrozyten, wohingegen die mittlere weißliche Schicht, der sogenannte Buffy-Coat, hauptsächlich aus Leukozyten und Thrombozyten besteht. Das Plasma als oberste Schicht wurde nun separiert und bei -20 °C für die spätere Herstellung des Perfusats gelagert. Anschließend konnte der Buffy-Coat mittels VacuSafe entfernt und verworfen werden, um so eine möglichst geringe Zahl an immunogenen Zellen im

Perfusionssystem zu haben. Das Erythrozytenkonzentrat wurde nun 1:1 mit dem modifizierten DMEM gemischt und bei 4 °C maximal 72 Stunden gelagert.

### 2.5.3 Perfusat

Das Perfusionssystem wurde mit insgesamt 50ml Perfusat gefüllt. Grundlage hierfür stellte mit 35ml das wie zuvor beschriebene modifizierte DMEM dar. Hiermit wurde zunächst das 1:1000 verdünnte Everolimus gemischt. Je nach Gruppe wurden unterschiedliche Mengen der Verdünnung hinzugefügt. Um eine Vergleichbarkeit aller Gruppen zu gewährleisten wurde das Perfusat der Kontrollgruppe mit der maximalen Dosis 1:1000 verdünntem Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt. Um den gleichen DMSO Gehalt in allen vier Gruppen zu erreichen, wurde das Perfusat der 5 ng und der 25 ng Gruppe mit zusätzlichem 1:1000 verdünntem DMSO angereichert. Entscheidend war hierbei ein anschließendes gründliches Mischen, um mögliche Mikrothromben durch nicht gelöste Rückstände des Everolimus zu verhindern.

**Tabelle 1 Mischverhältnis Everolimus-DMSO**

Gruppen	0 ng	5 ng	25 ng	50 ng
Everolimus working solution	0 µl	25 µl	125 µl	250 µl
DMSO stock solution	250 µl	225 µl	125 µl	0 µl

Weitere Bestandteile des Perfusats waren 5ml Plasma und 10 ml Erythrozytenkonzentrat von männlichen Sprague Dawley Ratten. Zusätzlich wurden 500 I.E. Heparin und 500 µl 1,2 M Glycin hinzugefügt.

### 2.5.4 Everolimus und DMSO stock solution

5 mg Everolimus wurden in 500 µl DMSO gelöst, um so eine stock solution von 10 mg/ml zu erhalten. Diese wurde bei -80 °C gelagert. Um einem Ausfall des Everolimus während des Versuches vorzubeugen, wurde eine working solution in 1:1000 Verdünnung mittels Natriumchlorid (NaCl) hergestellt.

Für die DMSO stock solution wurde ebenfalls eine 1:1000 Verdünnung mittels NaCl angesetzt.

## **2.6 Analytik**

### **2.6.1 Triglyceridbestimmung**

Die Triglyceridanalyse (TGA) basierte auf einer photometrischen Messung des aus dem Lebergewebe gewonnenen Glycerols. Zur Bestimmung wurde das ab65336 Triglyceride Quantification Assay Kit vom Hersteller Abcam genutzt. Die Vorbereitung der Proben wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurden zunächst 100 mg jeder Probe in 1 ml 5% NP-40/ddH<sub>2</sub>O Lösung homogenisiert. Anschließend wurden sie auf 80 °C für 2-5 Minuten erhitzt. Nach zweiminütigem Zentrifugieren bei höchster Geschwindigkeit, wurden die Proben 10-fach mit destilliertem Wasser verdünnt. Von jeder Probe wurden zwei Wells der 96-Well Platte mit 2 µl befüllt und auf 50 µl pro Well mit Triglyceride Assay Puffer komplettiert. Zur Standard-Messung wurden 2x6 Wells mit jeweils 50 µl eines aufsteigend-konzentrierten Triglycerid-Standards befüllt. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurden 50µl eines Triglyceride Reaction Mix bestehend aus 46 µl Triglyceride Assay Puffer, 2 µl Triglyceride Probe und 2 µl Triglyceride Enzyme Mix zu jedem Well hinzugefügt. Nach weiteren 60 Minuten Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung mit Hilfe des Fluostar Optima von BMG Labtech bei einer optischen Dichte (OD) von 570 nm.<sup>2</sup>

### **2.6.2 Hämatoxylin-Eosin (H.E.) Färbung**

Zur Entwässerung der in Formaldehyd fixierten Proben wurden diese zunächst für eine Stunde in PBS gewaschen. Anschließend wurde eine aufsteigende Alkoholreihe mit 50 %, 70 %, 80 %, 96 % und 99 % für jeweils zwei Stunden durchlaufen. Abschließend wurden die Proben drei Stunden in Xylol und weitere drei Stunden in warmem Paraffin belassen. Die Einbettung erfolgte mittels warmen Paraffins und anschließender Aushärtung auf einer Kühlplatte. Zur weiteren Färbung wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und mit H.E. gefärbt. Hierfür durchliefen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe mit Xylol über 10 Minuten, Ethanol 99 % über

---

<sup>2</sup> Unterstützung bei Triglyceridmessung durch Joseph Gaßner und Simon Moosburner

4 Minuten und Ethanol 96 %, 80 %, 70 % und 50 % über jeweils 2 min. Nach kurzem Waschen in destilliertem Wasser erfolgte die erste Färbung mit Hämatoxylin nach Meyer (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) über 10 Minuten. Anschließend wurde eine 5 bis 10-minütige Spülung mit lauwarmem Wasser durchgeführt, bevor die zweite Färbung mit Eosin (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) über 30 Sekunden erfolgte. Beendet wurde die Färbung mit kaltem Wasser über 5 Sekunden, dann Ethanol 96 % für 30 Sekunden, Ethanol 99 % für 2 Minuten und Xylol für 5-10 Minuten. Das Abdeckglas wurde abschließend mittels Eukitt (Sigmar-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) fixiert.

Zur Etablierung des Verfettungsmodells und Auswertung der Oil-Red-O-Schnitte erhielten wir freundliche Unterstützung von Frau Dr. Ruza Arsenic. Die Auswertung der H.E. Schnitte erfolgte in freundlicher Kooperation mit dem Institut für Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte (Dr. Edward Michaelis). Der prozentuale Anteil von steatotischen und geschädigten Hepatozyten wurde im Verhältnis zum gesamten histologischen Schnitt betrachtet. Vesikel, die aufgrund ihrer Größe den Zellkern an den Rand der Zelle drückten, wurden als makrovesikuläre Fettvakuolen gewertet. Des Weiteren erfolgte eine Einteilung der sinusoidalen Dilatation nach Rubbla-Brandt in vier Schweregrade (0-3), wobei 0 keiner Dilatation und 3 einer schweren Dilatation entsprach (86).

### **2.6.3 Oil-Red-O**

Für die Oil-Red-O-Färbung wurden 8 µm dicke Kryoschnitte angefertigt und in 4 °C kaltem Formalin fixiert. Die Schnitte wurden zunächst zwei Mal in destilliertem Wasser von Formalin befreit und anschließend für 2 Minuten in 100%iges Propylen Glykol transferiert. Nun wurden die Schnitte in die auf 60 °C erhitzte Oil-Red-O-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) überführt und dort für 10 Minuten belassen. Weitere Schritte waren die Transferierung in 85 % Propylen Glykol für 3 Minuten und 50% Propylen Glykol für 2 Minuten. Nach viermaligem Waschen mit destilliertem Wasser fand eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin nach Gill (Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) für 30 Sekunden statt. Nach erneutem Waschen der Schnitte in lauwarmem Wasser. Abschließend wurden die Deckgläser mit Hilfe eines wässrigen Mediums (Aquatex, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

#### **2.6.4 Elektronenmikroskopie**

Es wurde exemplarisch von jeder Versuchsgruppe eine Probe zur elektronenmikroskopischen Auswertung verwendet. Nach Fixierung der Proben in einer Lösung aus 3%igem Glutaraldehyd und 0,1M Natrium Cacodylatpuffer wurden diese durch das Institut für Anatomie der Charité weiterverarbeitet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „Systematic Uniform Random Sampling“ (SURS) (87). Hierbei wurde ein zufällig gewählter Punkt auf dem Schnitt als Startpunkt bestimmt. Hiervon ausgehend wurde die Probe in gleichmäßigen Abständen von 150 µm bei einer 1670-fachen Vergrößerung auf Auffälligkeiten im Hinblick auf Autophagosomen oder strukturelle Veränderungen untersucht. Insgesamt wurden jeweils 27 Ausschnitte jeder Probe betrachtet und fotografiert. Auffällige Strukturen konnten durch weitere Vergrößerung eindeutig identifiziert werden.

#### **2.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Berechnung und die Erstellung der Graphen wurden mit GraphPad Prism, Version 6.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA) durchgeführt. Die Normalverteilung der Daten wurde zunächst mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Anschließend wurde eine 2-way-Anova Analyse durchgeführt. Je nach Abhängigkeit der Normalverteilung wurden zusätzlich 1-way-Anova bzw. Kruskal-Wallis-Test angewendet. Die hier gezeigten Daten werden als Median und Interquartilsabstand aufgeführt. Weiterhin werden die Daten mit einem Konfidenzintervall von 95% gezeigt. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als signifikant gewertet.

3

---

<sup>3</sup> Unterstützung bei statistischer Auswertung und Erstellung der Graphiken durch Anja Reutzel-Selke und Simon Moosburner



# 3 Ergebnisse

## 3.1 Etablierung Verfettungsmodell

Der pathologische Befund der mit Oil-Red-O und Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten ergab bei allen mit dem Fettfutter gefütterten Tieren eine gemischt bis makrovesikuläre Steatose von über 40 %, was dem Marginalitätskriterium von Eurotransplant entspricht (88). Es wurden keine Anzeichen von Steatohepatitis wie Entzündungszellen oder Hepatozytenballooning festgestellt. Außerdem zeigte das Gewebe keinen fibrotischen bzw. zirrhotischen Umbau.

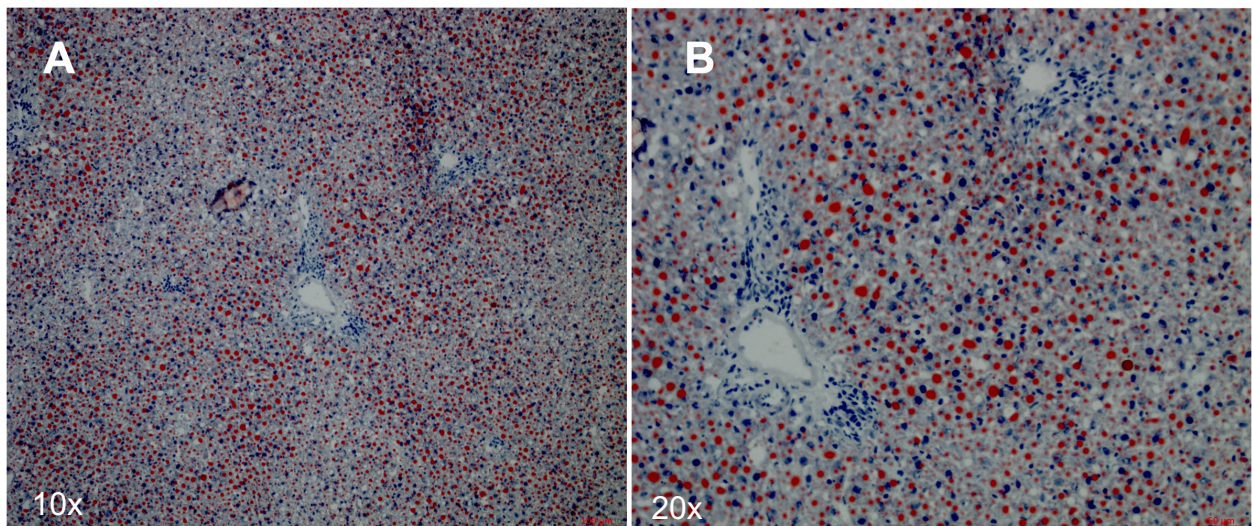


Abbildung 3 Etablierung Verfettungsmodell  
(A) Oil-Red-O Caudatus-Lappen, (B) Oil-Red-O Caudatus-Lappen

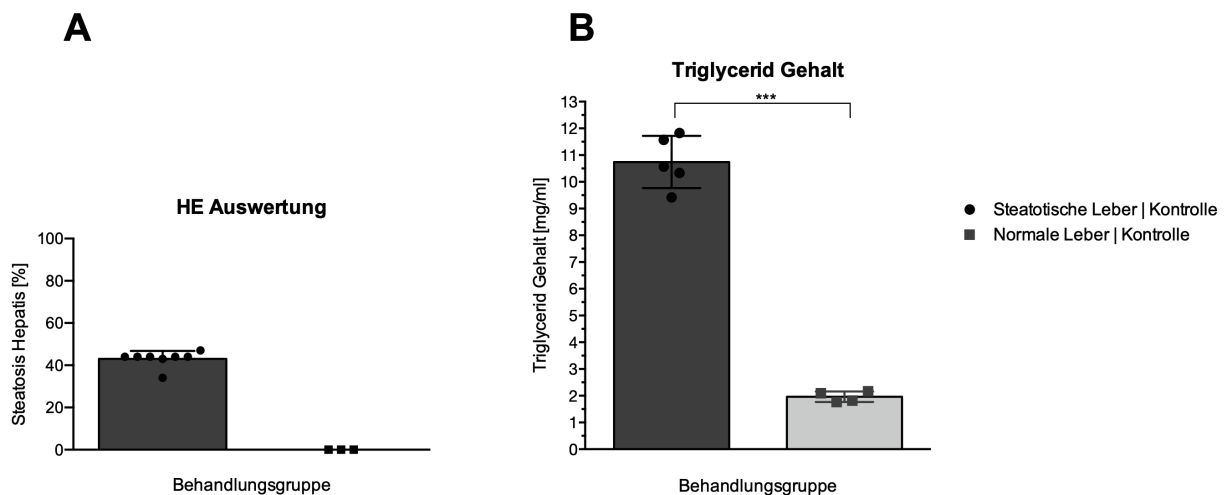


Abbildung 4 Fettgehalt Verfettungsmodell  
(A) HE Auswertung, (B) Triglycerid Gehalt

## **Ergebnis 1: Das Verfettungsmodell konnte erfolgreich etabliert werden**

### **3.2 Rahmenbedingungen**

Nach dreiwöchiger Fütterung mit 70%igem Fettfutter zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem mittleren Tiergewicht der einzelnen Gruppen ( $p=0.22$ ). Das mittlere Gewicht der Tiere betrug 345,8 g bei einem Minimalgewicht von 308 g und einem Maximalgewicht von 390 g. Der Grenzwert von 350 g Körpergewicht, der für eine Lebertransplantation im Rattenmodell maximal zulässig ist wurde von 5 Tieren deutlich um mindestens 10 g überschritten und von 4 weiteren unwesentlich um 1–6 g.

Das Gewicht der isolierten Organe war ebenfalls vergleichbar zwischen den Gruppen und unterschied sich nicht signifikant ( $p=0.5$ ). Hierbei wurde das geringste Gewicht mit 10,5 g gemessen und das höchste mit 15,7 g. Der Mittelwert der Lebergewichte betrug 12,5 g.

Auch die Kaltischämiezeit zwischen erster intraoperativer Spülung der Leber und Beginn der Perfusion unterschied sich nicht signifikant und bewegte sich in einem Rahmen von 30 bis 62 Minuten ( $p=0.62$ ). Ebenfalls vergleichbar war das makroskopische Aussehen der Lebern nach erster intraoperativer Spülung (Flush). Hierbei wurde mittels einer Skala von 1-10 das Lebergewebe auf Homogenität, Druckstellen und Einblutungen untersucht. Es konnte hierbei in allen Gruppen ein Median von 10 erreicht werden.

(Siehe Tabelle 5)

**Ergebnis 2.1: Die Tiere der einzelnen Gruppen waren Gewicht, Kaltischämiezeit und Flush betreffend vergleichbar zueinander**

**Ergebnis 2.2: Das Maximalgewicht von 350g wurde nur von wenigen Tieren überschritten**

### **3.3 Perfusionsdrücke**

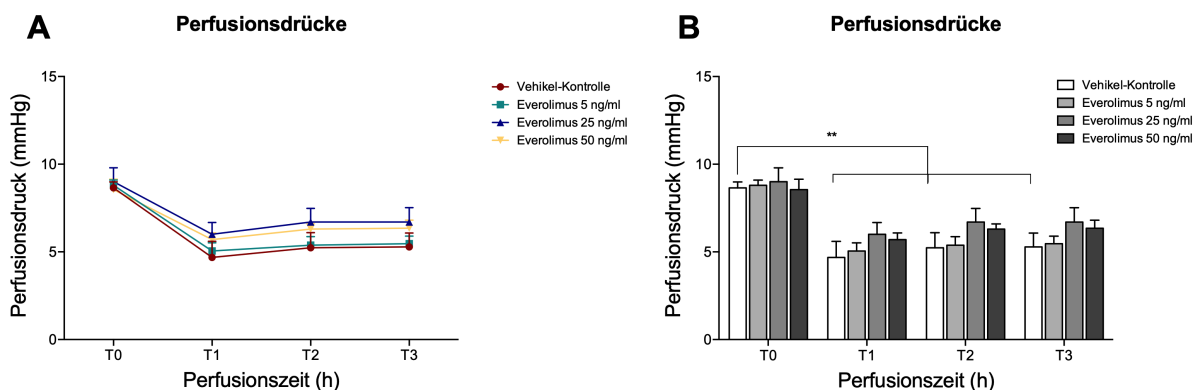
Die in der Pfortader gemessenen Drücke bewegten sich zu allen Zeitpunkten im physiologischen Bereich zwischen 5-9 mmHg und unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Es zeigte sich in allen Gruppen ein Druckabfall ab dem Zeitpunkt T0,

welcher sich in der Kontrollgruppe als signifikant darstellt ( $p < 0,001$ ). Auch in der 5 ng/ml und 25 ng/ml Gruppe zeigte sich ein solcher Druckabfall, jedoch deutlich milder ( $p = 0,001$  bzw  $p = 0,0256$ ). Innerhalb der Gruppe mit der höchsten Everolimus-Konzentration konnten stabile Verhältnisse ohne signifikanten Druckabfall zwischen den zwei Zeitpunkten festgestellt werden ( $p = 0,267$ ).

**Ergebnis 3: Die Gruppe mit der höchsten Everolimus-Konzentration zeigte den stabilsten Druckverlauf**

**Tabelle 2 Perfusionen**

	Vehikel-Kontrolle N=6	Everolimus 5 ng/ml N=6	Everolimus 25 ng/ml N=6	Everolimus 50 ng/ml N=6	p-Wert
<b>Perfusionsdrücke</b>					
<b>T0</b>	8,75 (1,15)	8,85 (1,175)	9 (2,555)	8,8 (2,725)	0,9966
<b>T1</b>	4,9 (3,625)	4,8 (1,925)	6,25 (3,225)	5,5 (1,3)	0,5961
<b>T2</b>	5,45 (3,375)	5,2 (2,225)	6,85 (3,825)	6,2 (1,25)	0,4719
<b>T3</b>	5,35 (3,35)	5,1 (2)	6,8 (3,8)	6,1 (2,025)	0,5127
<b>p-Wert</b>	0,0006	0,0014	0,0256	0,267	

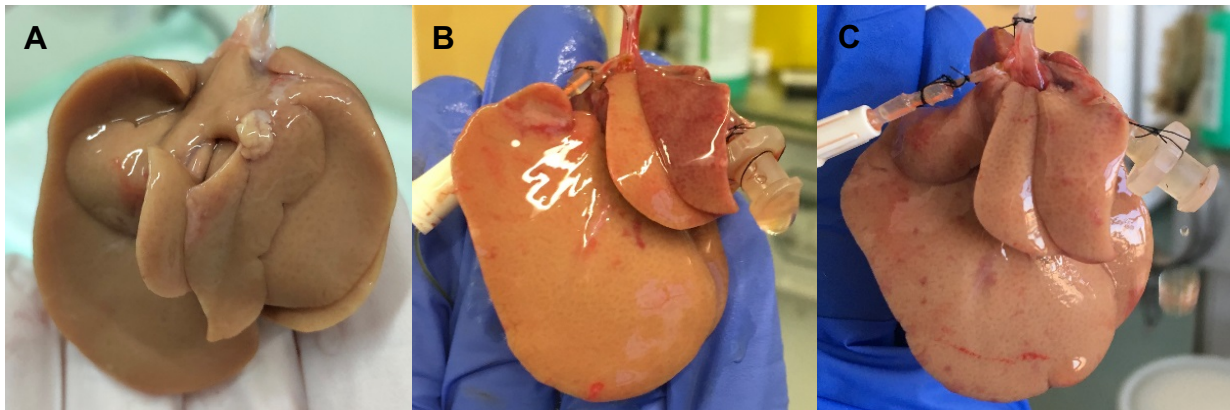


**Abbildung 5 Perfusionsdrücke**  
**(A) Verlauf der Perfusionsdrücke über den Versuchszeitraum, (B) Vergleich der Perfusionsdrücke zwischen den Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten, \*\* entspricht  $p < 0,01$**

### 3.4 Makroskopische Beschaffenheit nach Perfusion

Es zeigte sich in allen vier Gruppen nach Perfusion ein guter makroskopischer Zustand der Lebern. Durch Spülung mit 20 ml Ringerlösung konnte das Gewebe bis auf wenige keilförmige Aussparungen von Blut und Perfusat befreit werden. Der Leberhilus mit Pfortader und Gallengang wies keine makroskopisch sichtbaren Schädigungen auf. Lagerungsbedingt zeigten sich in allen Gruppen Druckläsionen von ca. 0,5 cm x 0,5 cm an der Unterseite des Organs.

**Ergebnis 4: Die Lebern befanden sich nach Perfusion makroskopisch insgesamt in einem guten Zustand**



**Abbildung 6 Makroskopische Beschaffenheit nach Perfusion**  
(A) Verfettete Rattenleber nicht perfundiert, (B) M355 5ng Gruppe nach Perfusion, M302 Vehikel-Kontrolle nach Perfusion

### **3.5 Blutgasanalyse (BGA)**

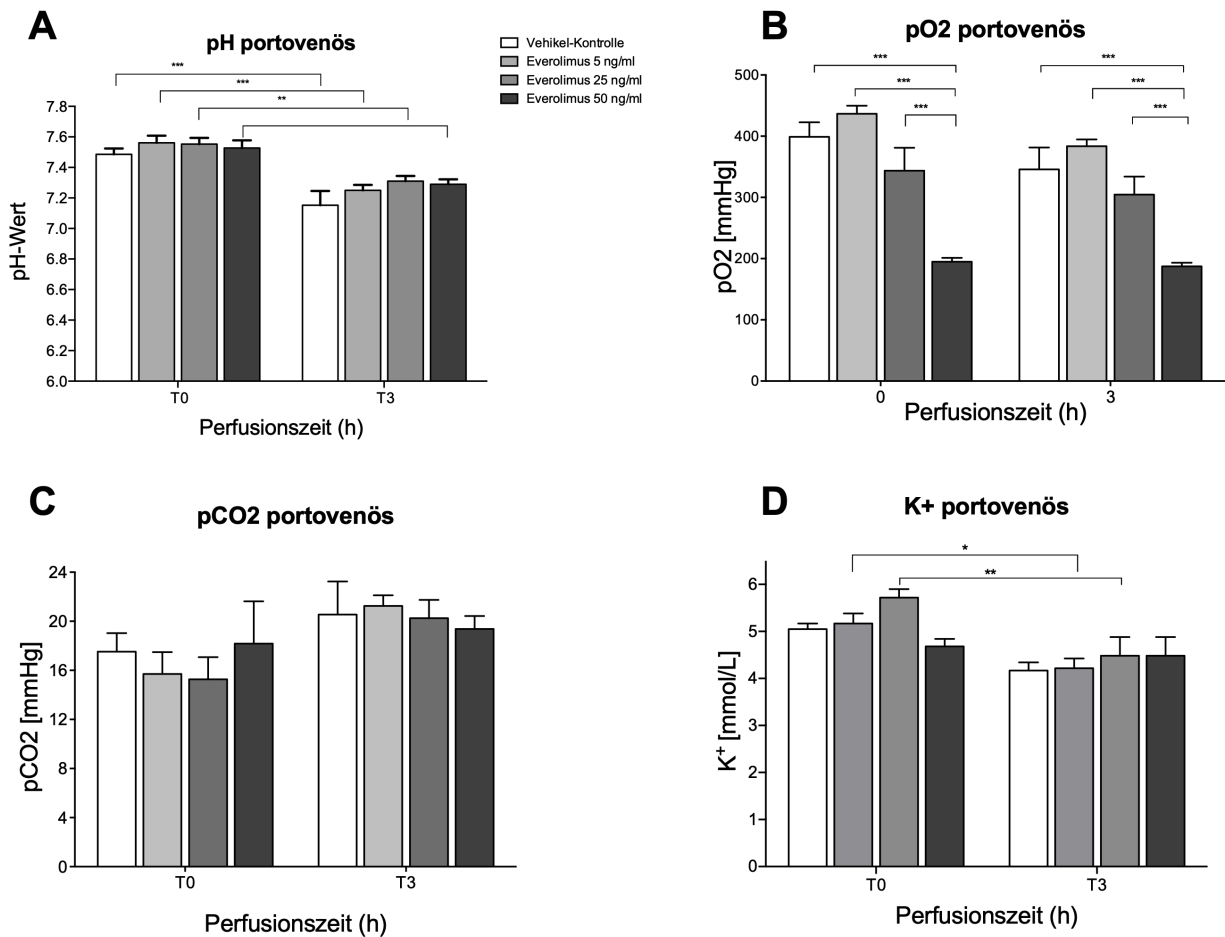
#### **3.5.1 Portovenös**

Die portovenösen pH-Werte der einzelnen Versuchsgruppen bewegten sich zunächst im basischen Bereich bei 7,47 bis 7,55. Im Verlauf der Versuche konnte ein signifikanter Abfall bei allen Gruppen registriert werden, der sowohl die Kontroll-Gruppe als auch die 5ng/ml-Gruppe in ein saures Milieu von 7,15 bzw. 7,26 führte. Die Gruppen mit einer höheren Everolimus-Konzentration erreichten annähernd physiologisches Niveau bei 7,30 und 7,31 (Normwert: 7,35-7,45). Zu den einzelnen Zeitpunkten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p=0,71$  bzw.  $p=0,13$ ). Die Kalium-Konzentrationen befanden sich zu allen Zeitpunkten im physiologischen Bereich (Normwert 3,6-5,2 mmol/L).

Trotz eines signifikanten Abfalls des Kaliums in den Gruppen 5ng und 25ng über die Zeit blieben die Parameter auch hier normwertig ( $p=0,043$  bzw.  $p=0,005$ ).

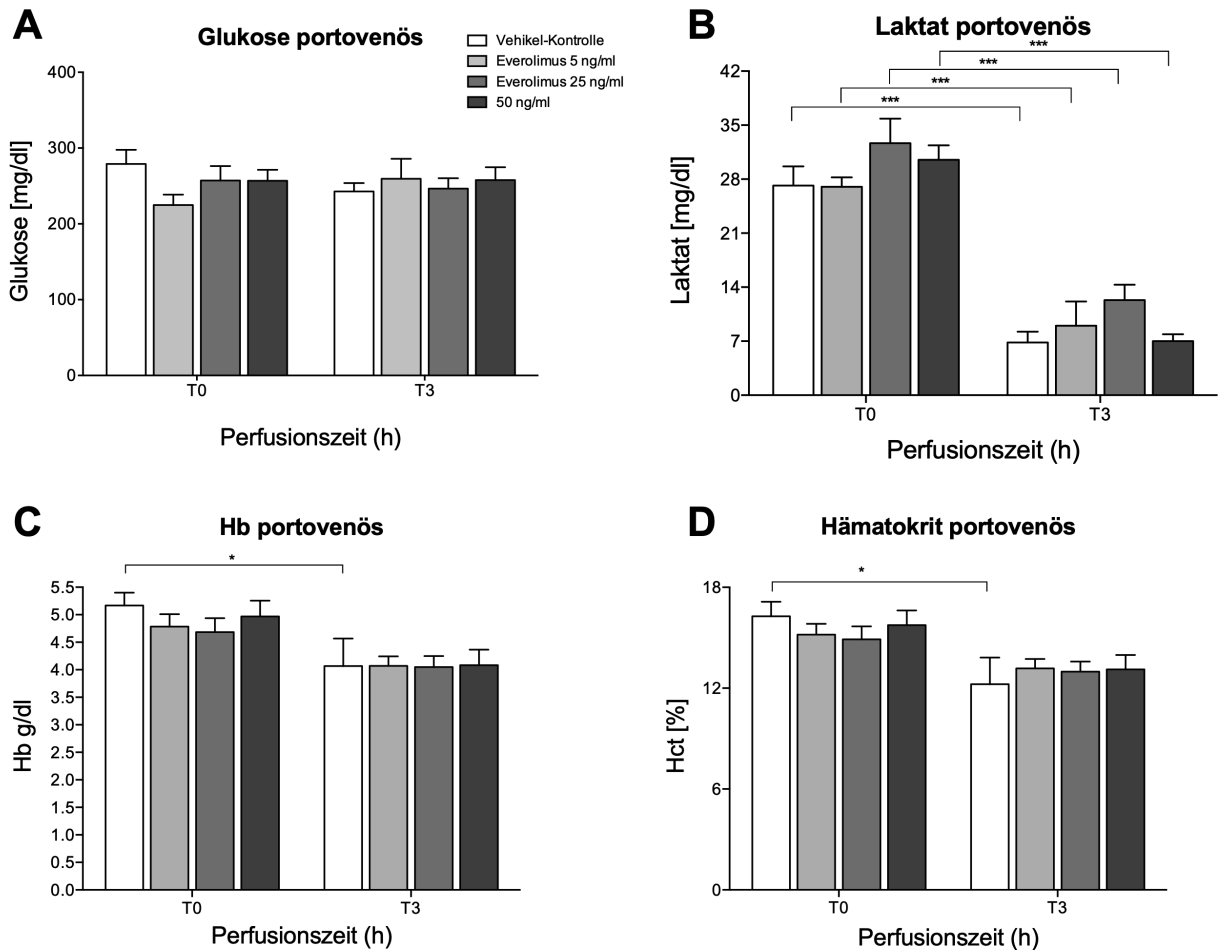
Die Elektrolyte Natrium und Chlorid zeigten vergleichbare Werte zwischen den Gruppen und bewegten sich zu allen Zeitpunkten in annähernd physiologischem Bereich (Normwerte Natrium: 135-145 mmol/L; Chlorid: 98-106 mmol/L). Der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) befand sich bei allen Versuchen deutlich oberhalb des Normwertes (Normwert: 65-100 mmHg). In der 50 ng/ml-Gruppe zeigte sich jedoch zu allen Zeitpunkten ein signifikant niedrigerer  $pO_2$  im Vergleich zu den anderen Gruppen ( $p=0,004$ ).

Der CO<sub>2</sub>-Partialdruck (pCO<sub>2</sub>) wies keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Trotz eines leichten Anstiegs zwischen T<sub>0</sub> und T<sub>3</sub> befanden sich die Werte zu allen Zeitpunkten in einem hypokapnischen Bereich (Normwert: 32-45 mmHg).



**Abbildung 7 BGA portovenös 1**

(A) pH-Wert portovenös, signifikanter Abfall in allen Gruppe im Versuchsverlauf (B) pO<sub>2</sub> portovenös, signifikanter Unterschied zwischen der 50 ng/ml-Gruppe und den anderen Gruppen (C) pCO<sub>2</sub> portovenöse (D) K<sup>+</sup> portovenös, \* entspricht p≤0,05, \*\* entspricht p≤0,01, \*\*\* entspricht p≤0,001



**Abbildung 8 BGA portovenös 2**

**(A) Glukose portovenös, (B) Laktat portovenös, signifikanter Abfalls im Lauf des Versuchs in allen Gruppen, (C) Hb portovenös, (D) Hämatokrit portovenös, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$**

Sowohl Hämoglobin-Gehalt (Hb) als auch Hämatokrit (Hct) im Perfusat zeigten in allen Gruppen vergleichbare Werte, die einen leichten Abfall über die Zeit beschrieben. Der Abfall des Hb-Wertes und des Hct in der Kontrollgruppe erwiesen sich allerdings als statistisch signifikant ( $p=0,037$  bzw.  $p=0,014$ ).

Die portovenöse Glukose befand sich in allen Gruppen deutlich oberhalb der Normwerte, zeigte jedoch weder Unterschiede zwischen den Gruppen noch Veränderungen über die Zeit (Normwert: 55-100 mg/dL).

Laktat bewegte sich zunächst in allen Gruppen oberhalb des Normwertes und konnte im Laufe der Perfusion deutlich in einen niedrigen physiologischen Bereich gesenkt werden (Normwert: 5-15 mg/dL). Diese Entwicklung war ebenfalls anhand der positiven Laktat-Clearance in allen vier Gruppen zu beobachten. Es zeigte sich hierbei im Median zwar ein geringerer Wert in der 25 ng/ml-Gruppe, welcher sich jedoch nicht signifikant von den anderen Gruppen unterschied.

**Tabelle 3 BGA portovenös**

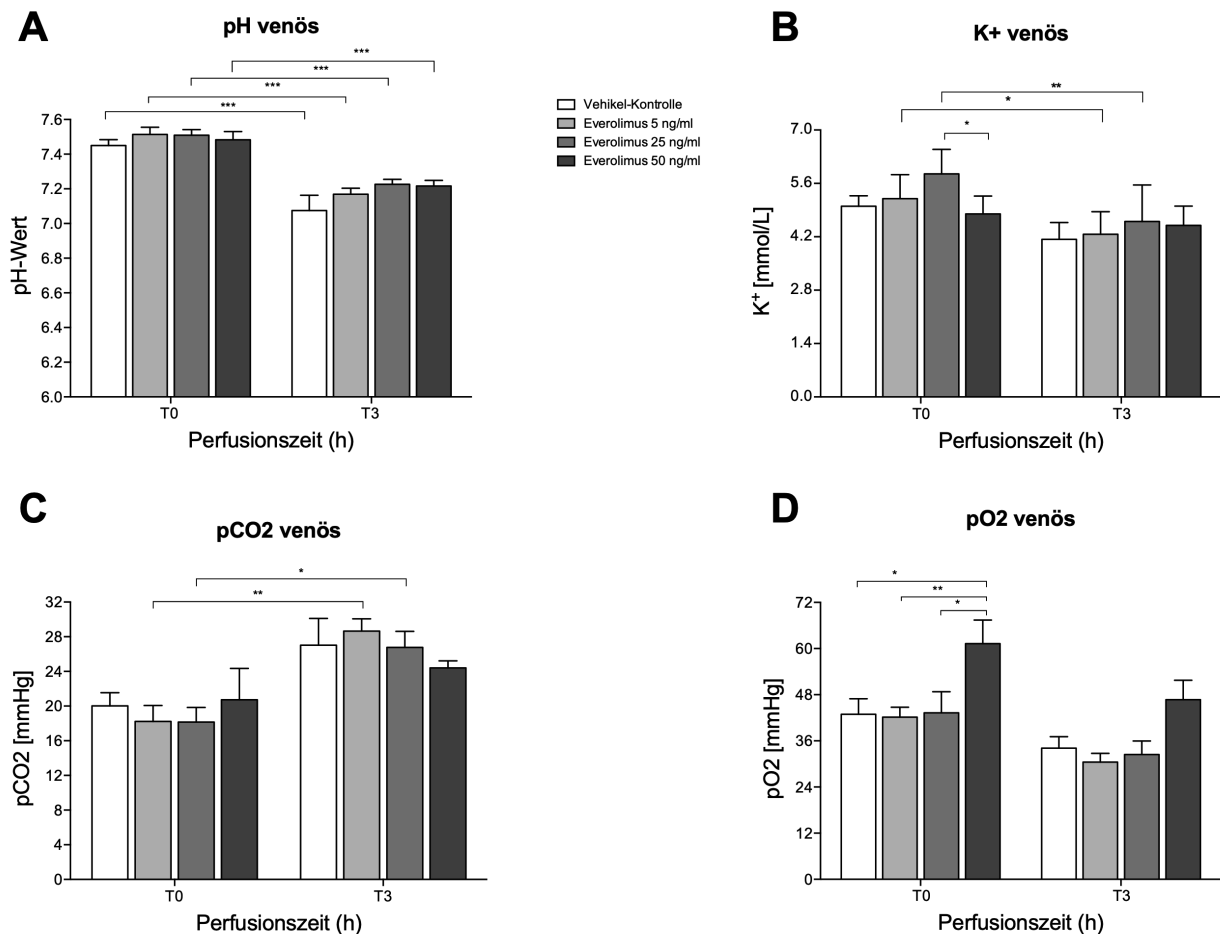
	<b>Vehikel-Kontrolle N=6</b>	<b>Everolimus 5 ng/ml N=6</b>	<b>Everolimus 25 ng/ml N=6</b>	<b>Everolimus 50 ng/ml N=6</b>	<b>p-Wert</b>
<b>pH</b>					
T0	7,475 (0,156)	7,552 (0,214)	7,519 (0,192)	7,54 (0,183)	0,71
T3	7,148 (0,295)	7,262 (0,147)	7,304 (0,142)	7,314 (0,145)	0,13
<b>pO2 [mmHg]</b>					
T0	410 (80)	431 (60,8)	334,5 (171,3)	190 (17,5)	<0.0001
T3	362,5 (147,8)	380,5 (47,3)	304,5 (131)	184,5 (19,5)	<0.0001
<b>pCO2 [mmHg]</b>					
T0	17,8 (6.,08)	15,2 (7,75)	17,3 (8,5)	16 (9,57)	0,89
T3	18,05 (12,4)	22 (4,53)	20,3 (5,58)	20,25 (4,75)	0,99
<b>K+ [mmol/L]</b>					
T0	5,15 (0,55)	5,3 (0,75)	5,65 (0,55)	4,85 (0,75)	0,04
T3	4 (0,85)	4,15 (1,05)	4,1 (1,375)	4,1 (0,6)	0,94
<b>Glukose [mg/dl]</b>					
T0	279,5 (99,7)	212 (57,2)	247 (78,5)	265,5 (72)	0,18
T3	239 (51,3)	252 (130,2)	238 (60,7)	239,5 (58,8)	0,99
<b>Laktat[mg/dl]</b>					
T0	28 (8,75)	26 (3,5)	32 (13,5)	29 (8,25)	0,37
T3	5,5 (6)	4,5 (12,75)	13 (6,5)	6,5 (3,75)	0,40
<b>Laktat- Clearance [%]</b>	9,001 (2,98)	9,193 (4,898)	6,655 (2,729)	8,834 (2,02)	0,56
<b>Hämoglobin [g/dl]</b>					
T0	5,25 (1,175)	4,9 (0,825)	4,85 (0,8)	4,65 (0,975)	0,80
T3	4,2 (2,05)	4,15 (0,675)	3,9 (0,975)	3,8 (1,125)	> 0,99
<b>Hämatokrit [mg/dl]</b>					
T0	16,6 (3,8)	15,4 (2,53)	15,4 (2,5)	14,8 (3,03)	0,85
T3	13,2 (5,8)	13,35 (2,1)	12,5 (2,92)	12,3 (3,38)	0,97

<b>Ergebnis 5.1:</b>	<b>Der pH-Wert zeigte in den mit Everolimus behandelten Gruppen einen geringeren Abfall</b>
<b>Ergebnis 5.2:</b>	<b>Der pO2 der 50 ng/ml-Gruppe wies signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu den anderen Gruppen auf</b>
<b>Ergebnis 5.3:</b>	<b>Es konnten physiologische Werte der Elektrolyte, insbesondere Kalium, erreicht werden</b>
<b>Ergebnis 5.4:</b>	<b>Alle Gruppen zeigen eine suffiziente Laktatclearance über den Beobachtungszeitraum</b>

### 3.5.2 Venös

In der venösen Blutgasanalyse zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie in der portovenösen. Es konnte ebenfalls ein zunächst basischer pH in allen Gruppen festgestellt werden, der sich gegen Ende des Versuches sowohl in der Kontroll- als auch in der 5 ng/ml-Gruppe in einem deutlich sauren Milieu befand und sich in den anderen beiden Gruppen in annähernd physiologischen Bereichen bewegte. Auch

Kalium bewegte sich trotz sinkender Werte in physiologischen Bereichen.



**Abbildung 9 BGA venös 1**

**A) pH-Wert venös, (B) K+ venös, (C) pCO2 venös, (D) pO2 venös, signifikanter Unterschied zwischen der 50 ng/ml-Gruppe und den restlichen Gruppen bei T0, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$**

Der venöse Sauerstoffpartialdruck befand sich sowohl in Kontrollgruppe als auch 5 ng/ml- und 25 ng/ml-Gruppe im normwertigen Bereich und senkte sich über die Versuchsdauer leicht ab (Normwert: 33 – 53 mmHg). Trotz niedrigeren Sauerstoffpartialdrucks in der portovenösen BGA wies die 50 ng/ml-Gruppe einen erhöhten venösen pO2 auf und unterschied sich daher signifikant von den anderen Gruppen ( $p=0,032$ ). Dieser Unterschied zeigte sich jedoch aufgrund eines Absinkens in physiologische Bereiche nicht mehr bei T3 ( $p=0,065$ ). Bei den venösen CO<sub>2</sub>-Partiellrücken konnten höhere Ausgangswerte im Vergleich zur portovenösen BGA registriert werden (Normwert 45 – 50 mmHg). Diese stiegen ebenfalls über die Dauer des Versuchs an und zeigten signifikante Unterschiede innerhalb der 5 ng/ml und 25 ng/ml-Gruppe. Eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen war jedoch zu allen Zeitpunkten gegeben.



Der Hb und Hct des Perfusats zeigten ebenfalls in allen Gruppen leicht abfallende Verläufe, wobei sich der Hct-Wert der Kontroll-Gruppe signifikant veränderte ( $p=0,029$ ). Auch der Verlauf von Glukose und Laktat zeigte ähnliche Werte wie im portovenösen Bereich. Es konnte ebenfalls in allen Gruppen eine signifikante Senkung des Laktats von Werten oberhalb der Normgrenze zu annähernd physiologischen Bereichen erreicht werden ( $p<0,0001$ ).

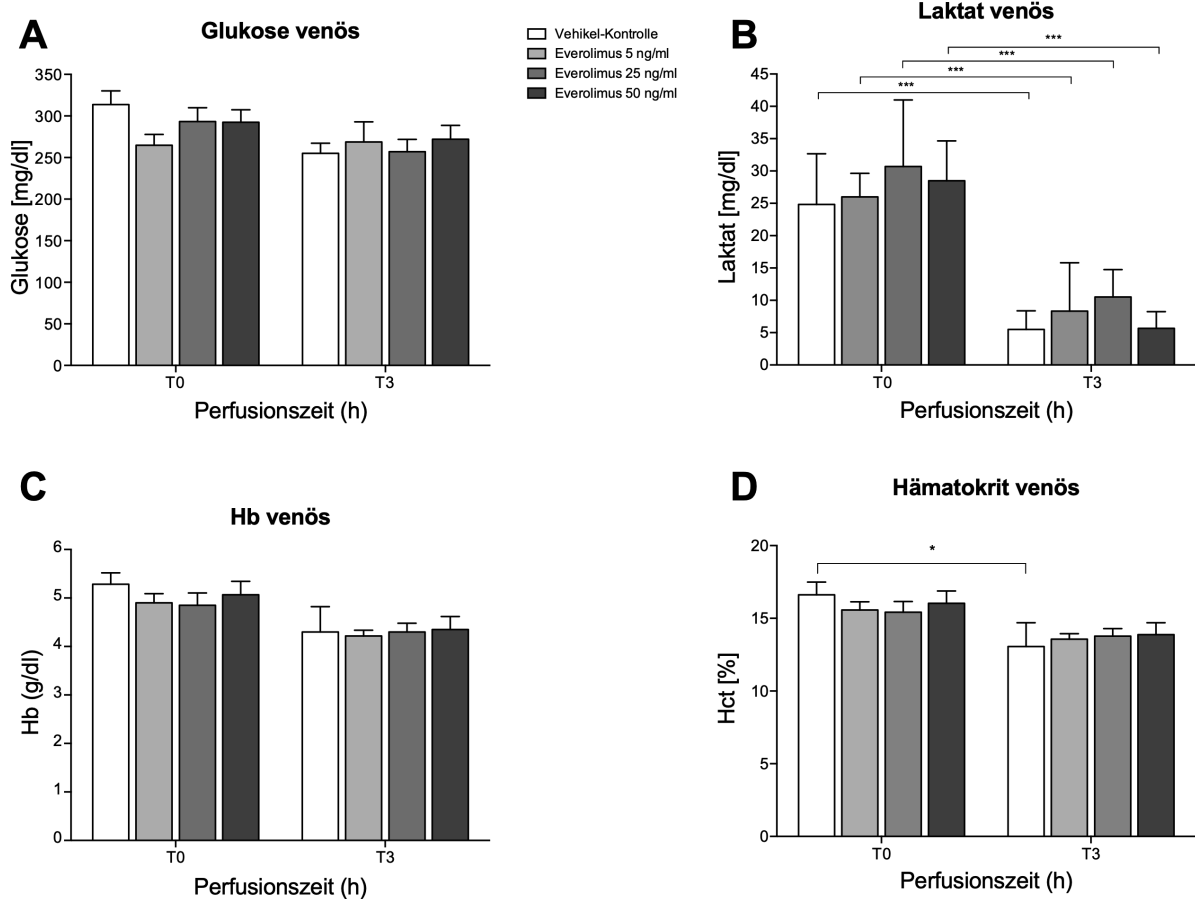


Abbildung 10 BGA venös 2

(A) Glukose venös, (B) Laktat venös, signifikanter Abfall in allen Gruppen über die Versuchsdauer, (C) Hb venös, (D) Hämatokrit venös, \* entspricht  $p\leq 0,05$ , \*\*\* entspricht  $p\leq 0,001$

Tabelle 4 BGA venös

	Vehikel-Kontrolle N=6	Everolimus 5 ng/ml N=6	Everolimus 25 ng/ml N=6	Everolimus 50 ng/ml N=6	p-Wert
<b>pH</b>					
T0	7,441 (0,145)	7,514 (0,188)	7,478 (0,13)	7,489 (0,15)	0,91
T3	7,095 (0,27)	7,171 (0,125)	7,216 (0,119)	7,254 (0,136)	0,14
<b>pO2 [mmHg]</b>					
T0	44,65 (18,73)	42,8 (11,07)	43,4 (21,23)	63,75 (22,58)	0,01
T3	31 (14,35)	29,6 (10,3)	30,6 (13,1)	44,9 (17,2)	0,06
<b>pCO2 [mmHg]</b>					
T0	21,25 (6,25)	17,65 (7,77)	20,2 (6,68)	18,75 (9,57)	0,95
T3	24,55 (15,53)	29,4 (7,23)	26,7 (6,9)	23,85 (4,23)	0,67
<b>K+ [mmol/L]</b>					

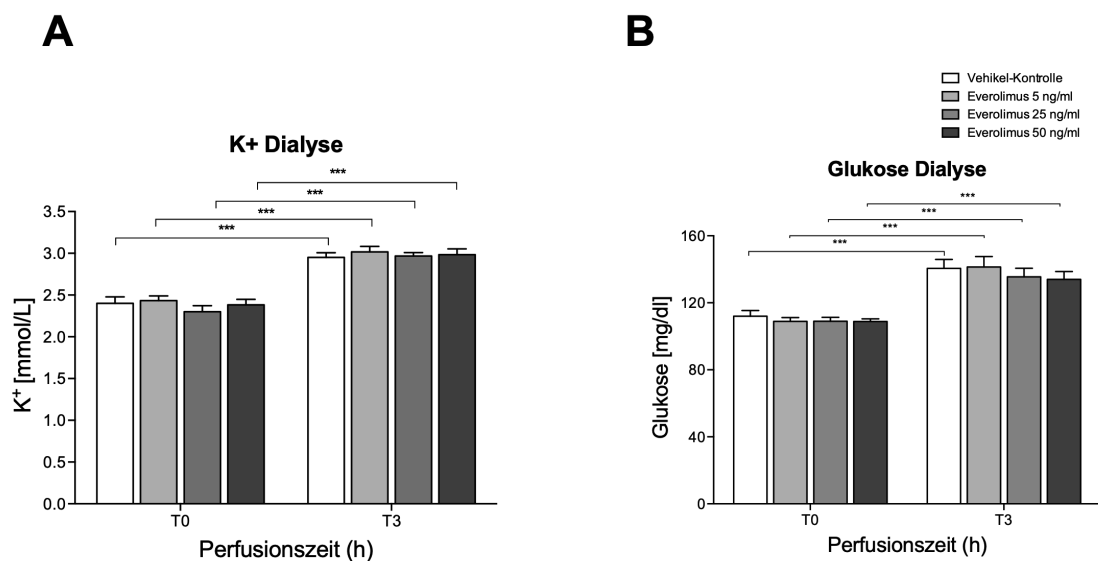
T0	4,95 (0,475)	5,35 (0,675)	5,8 (0,725)	4,85 (0,775)	0,02
T3	4 (0,75)	4,15 (1,175)	4,25 (1,375)	4,2 (0,95)	0,69
<b>Glukose [mg/dl]</b>					
T0	320,5 (86,2)	262 (64,5)	298,5 (61,8)	301 (70,3)	0,22
T3	247,5 (52,7)	257 (120)	248,5 (64,7)	256 (58,5)	0,99
<b>Lac [mg/dl]</b>					
T0	27,5 (10,5)	24,5 (6,75)	27 (21)	26,5 (12)	0,5043
T3	4,5 (5,5)	4,5 (12,75)	10,5 (6)	6 (4)	0,7053
<b>Hämoglobin [g/dl]</b>					
T0	5,4 (1,125)	4,9 (0,7)	5 (0,875)	4,75 (1,025)	0,85
T3	4,65 (2,075)	4,3 (0,425)	4,1 (0,8)	4,15 (1,05)	0,99
<b>Hämatokrit [mg/dl]</b>					
T0	17 (3,85)	15,7 (2,1)	15,85 (2,5)	15,1 (3,05)	0,90
T3	14,3 (6,4)	13,75 (1,38)	13,2 (2,35)	13,3 (3,18)	0,98

**Ergebnis 6.1:** Es zeigten sich signifikant höhere pO<sub>2</sub>-Werte in der 50 ng/ml-Gruppe bei T0

**Ergebnis 6.2:** Es zeigte sich ein signifikant abfallender Verlauf des Hct in der Kontrollgruppe

### 3.5.3 Dialyse

In der BGA des Dialysats konnten über die Perfusionsdauer stabile Verhältnisse in Bezug auf pH und pCO<sub>2</sub> registriert werden. Ähnlich wie in der portovenösen BGA zeigte sich ein signifikant niedrigerer pO<sub>2</sub>-Wert bei T0 in der 50 ng/ml-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen (p=0,0004). Dieser Unterschied glich sich jedoch



**Abbildung 11 BGA Dialyseflüssigkeit**

(A) K<sup>+</sup> Dialyse, (B) Glukose Dialyse, \*\*\* entspricht p<0,001

aufgrund sinkender Verläufe in allen Gruppen an und konnte bei T3 nicht mehr

registriert werden ( $p=0,425$ ). Im Gegensatz zur portovenösen und venösen BGA zeigte sich in der Dialyseflüssigkeit ein steigender Verlauf der Laktat-, Glukose- und Kalium-Werte. Dieser zeitliche Verlauf erwies sich innerhalb der Gruppen als signifikant für die Parameter Glukose und Kalium ( $p<0,0001$ ).

**Tabelle 5 BGA Dialyseflüssigkeit**

	<b>Vehikel-Kontrolle N=6</b>	<b>Everolimus 5 ng/ml N=6</b>	<b>Everolimus 25 ng/ml N=6</b>	<b>Everolimus 50 ng/ml N=6</b>	<b>p-Wert</b>
<b>pH</b>					
<b>T0</b>	7,465 (0,229)	7,485 (0,21)	7,431 (0,22)	7,466 (0,086)	0,31
<b>T3</b>	7,427 (0,189)	7,43 (0,212)	7,45 (0,077)	7,481 (0,075)	0,9
<b>pO2 [mmHg]</b>					
<b>T0</b>	169,5 (10,8)	174,5 (12,5)	173,5 (16)	152,5 (6,2)	0,0004
<b>T3</b>	149,5 (14,8)	145 (9,5)	143 (24,5)	138,5 (8,2)	0,42
<b>pCO2 [mmHg]</b>					
<b>T0</b>	27,8 (11,15)	27,5 (12,1)	30,85 (12,05)	29,1 (4,65)	0,96
<b>T3</b>	27,9 (9,95)	28,2 (10,03)	28,35 (3,1)	26,9 (2,17)	0,99
<b>K+ [mmol/L]</b>					
<b>T0</b>	2,4 (0,4)	2,4 (0,1)	2,35 (0,275)	2,45 (0,25)	0,85
<b>T3</b>	2,95 (0,3)	3 (0,325)	3 (0,15)	3 (0,275)	0,97
<b>Glukose [mg/dl]</b>					
<b>T0</b>	108,5 (13,7)	108 (7,8)	109 (8,5)	109 (5,3)	0,99
<b>T3</b>	141,5 (19,5)	137 (24)	139,5 (23)	136,5 (14,7)	0,78
<b>Lac[mg/dl]</b>					
<b>T0</b>	1,5 (3,25)	1,5 (2,25)	1 (1,25)	1 (2)	0,79
<b>T3</b>	2,5 (2)	2,5 (1,5)	2,5 (2,5)	2 (2,25)	0,91
<b>OUR [ml/min/g]</b>					
<b>T0</b>	1,133 (0,2628)	1,201 (0,177)	1,122 (0,4396)	0,4408 (0,0909)	< 0,0001
<b>T3</b>	1,029 (0,4474)	1,081 (0,156)	1,017 (0,4764)	0,4498 (0,1742)	0,0002

**Ergebnis 7.1: Eine suffiziente Dialyse konnte anhand steigender Kalium- und Glukose-Werte im Dialysat registriert werden**

**Ergebnis 7.2: Laktat im Dialysat zeigte ebenfalls einen Anstieg über die Dauer der Perfusion**

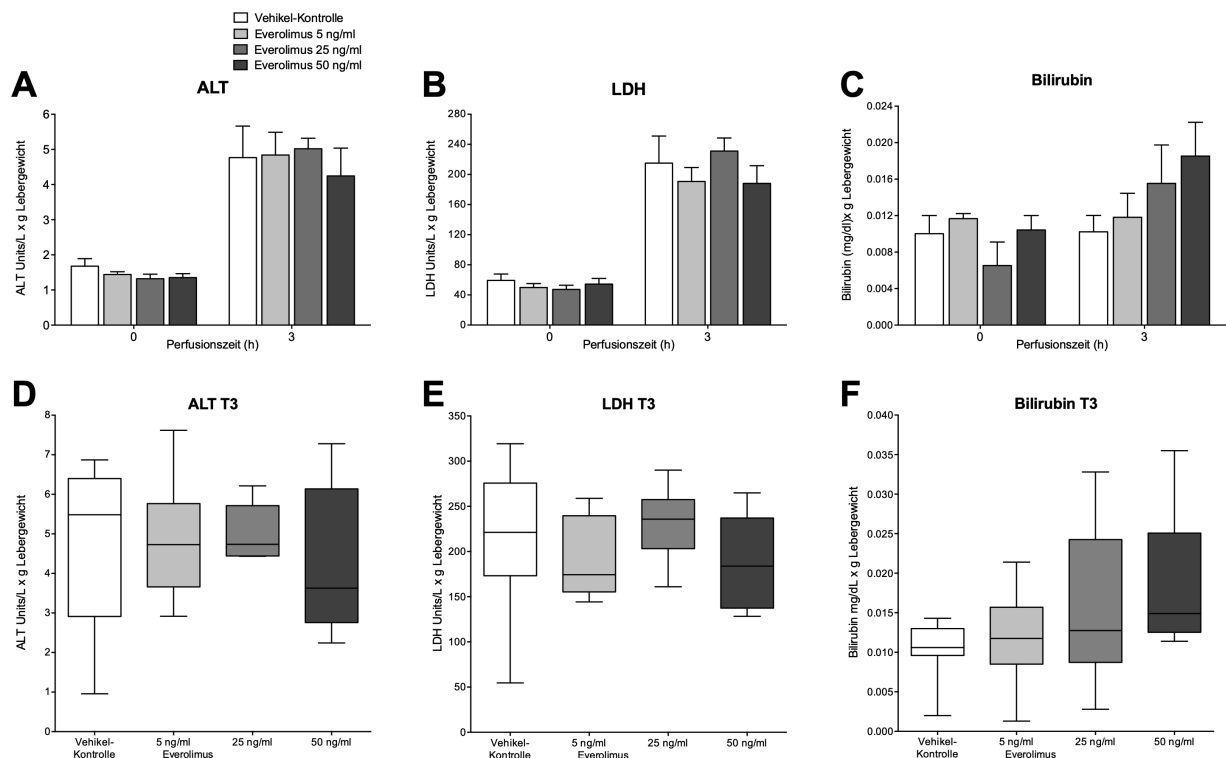
### 3.5.4 Oxygen Uptake Ratio (OUR)

Für die OUR konnte eine deutliche Diskrepanz zwischen der 50ng/ml Gruppe und den restlichen Gruppen zu beiden Zeitpunkten festgestellt werden. Eine wesentlich geringere OUR von 0,44 ml/min/g wurde in dieser Gruppe registriert, wohingegen die OUR der anderen Gruppen beim Zeitpunkt T0 1,12 bis 1,2 ml/min/g betrug ( $p<0,0001$ ). Allerdings zeigte die 50 ng/ml –Gruppe einen konstanten Verlauf über drei Stunden im Gegensatz zu einer leicht abfallenden OUR der anderen Gruppen. (Siehe Tabelle 4)

**Ergebnis 8: In der mit 50 ng/ml Everolimus behandelten Gruppe fand sich eine signifikant niedrigere OUR über den gesamten Versuchszeitraum**

### 3.6 Biochemische Marker

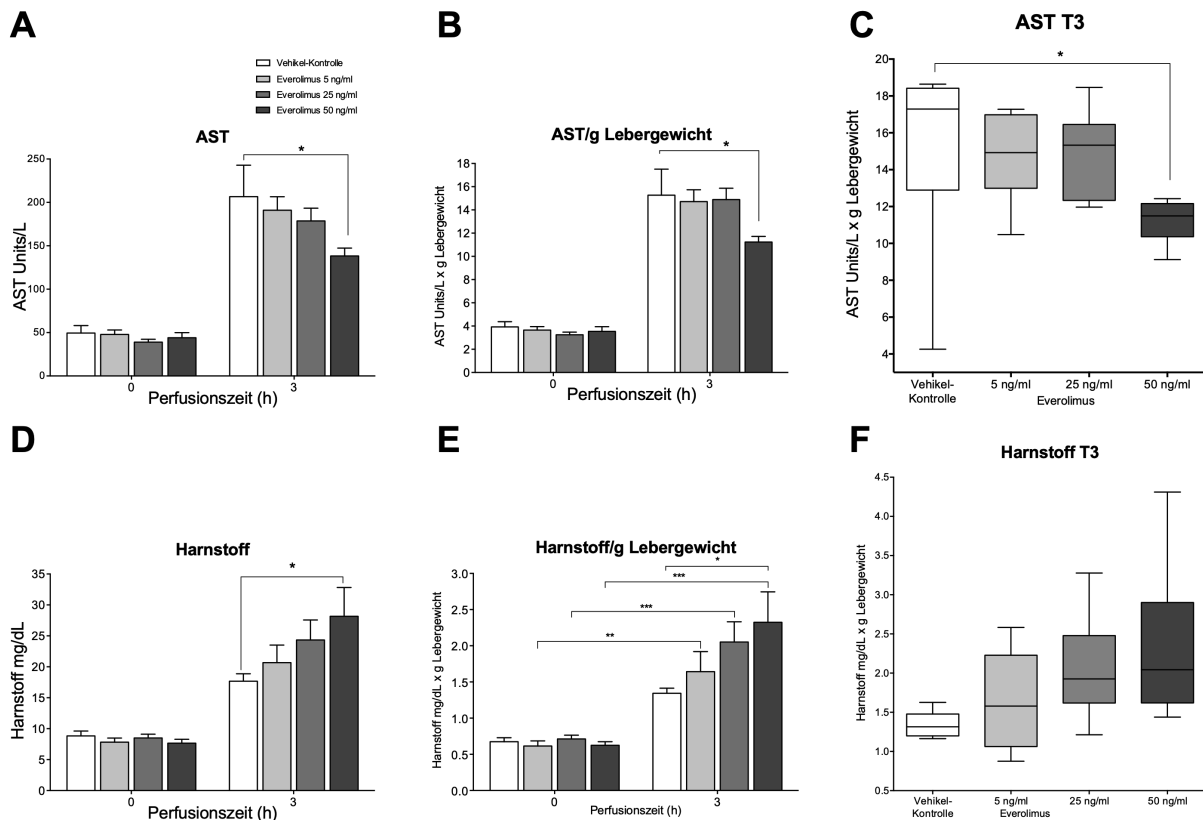
Die biochemischen Leberschädigungs- und -syntheseparameter ALT, AST, LDH, Bilirubin und Harnstoff zeigten zu Beginn der Perfusion keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen und somit vergleichbare Ausgangswerte. Einen signifikanten Anstieg über die Dauer des Versuches konnte jedoch in den meisten Gruppen verzeichnet werden. Gegen Ende der Perfusion bei Zeitpunkt T3 unterschieden sich die Gruppen in den Parametern ALT, LDH und Bilirubin nicht. Allerdings ließ sich ein aufsteigender Trend von Bilirubin mit zunehmender Everolimus-Konzentration feststellen ( $p=0,131$ ).



**Abbildung 12 Laborwerte ALT, LDH, Bilirubin**

Alle Parameter wurden auf das Lebergewicht normiert (A) ALT (B) LDH (C) Bilirubin (D-F) statistische Auswertung der Parameter beim Zeitpunkt T3 mittels Kruskal-Wallis-Test

Der biochemische Leberschädigungsparameter AST und der Syntheseparameter Harnstoff (Urea) zeigten nach statistischer Auswertung mittels Two-Way-Anova-Test signifikante Unterschiede zwischen der Vehikel-Kontrolle und der Gruppe mit der höchsten Everolimus-Konzentration von 50 ng/ml ( $p=0,0197$  bzw.  $p=0,0140$ ). Auch



**Abbildung 13 Laborwerte AST und Harnstoff**  
**(A) AST (B) AST normiert auf das Lebergewicht (C) AST normiert auf das Lebergewicht bei T3 mittels Kruskal-Wallis-Test, signifikanter Unterschied zwischen der 50 ng/ml-Gruppe und der Kontroll-Gruppe bei T3 (D) Harnstoff (E) Harnstoff normiert auf das Lebergewicht, signifikanter Unterschied zwischen der 50 ng/ml-Gruppe und der Kontroll-Gruppe bei T3 (F) Harnstoff normiert auf das Lebergewicht bei T3 mittels Kruskal-Wallis-Test, \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$**

normiert auf das Lebergewicht konnten bei diesen Parametern eine signifikante Veränderung zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ( $p=0,0292$  bzw.  $p=0,0101$ ). In den Gruppen mit geringerer Everolimus-Konzentration konnte ebenfalls ein Trend verzeichnet werden ( $p=0,094$ ). Eine individuelle Auswertung des Zeitpunkts T3 mittels Kruskal-Wallis-Test konnte außerdem den signifikanten Unterschied für AST bestätigen ( $p=0,0285$ ) nicht jedoch für Harnstoff ( $p=0,096$ ). (siehe Tabelle1) Einen signifikanten Anstieg der Harnstoffproduktion über die Zeit wurde in allen mit Everolimus behandelten Gruppen festgestellt. Einzig in der Kontrollgruppe zeigte sich keine signifikante Verbesserung der Syntheseleistung ( $p=0,112$ ). (Siehe Tabelle 5)

**Ergebnis 9.1:** Die mit 50 ng/ml Everolimus behandelte Gruppe zeigte eine signifikant geringere AST-Sekretion in das Perfusat im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe

**Ergebnis 9.2:** Der Syntheseparameter Harnstoff zeigte sich durch 50 ng/ml Everolimus signifikant verbessert im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe

**Ergebnis 9.3:** In den mit Everolimus behandelten Gruppen zeigte sich ein aufsteigender Trend des Bilirubins im Perfusat

### Galleproduktion

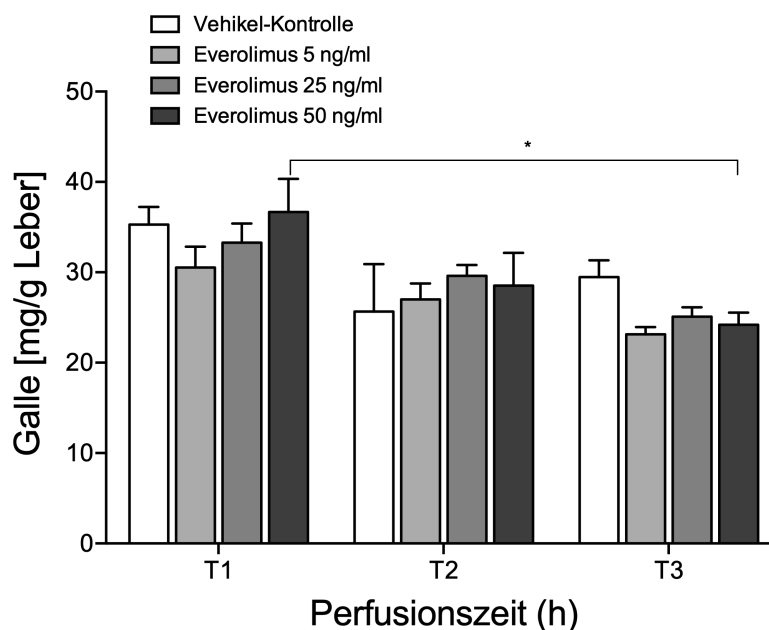


Abbildung 14 Galleproduktion  
\* entspricht  $p \leq 0,05$

### 3.7 Galleproduktion

Die Galleproduktion normiert auf das Lebergewicht zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei gemessenen Zeitpunkte zwischen den Gruppen. Es konnte jedoch ein stetiger Abwärtstrend festgestellt werden. Einzig die nicht behandelte Vehikel-Kontroll-Gruppe wies nach erstem Abfall einen leichten Syntheseanstieg zwischen dem Zeitpunkt T2 und T3 auf. Eine signifikante Minderung der Galleproduktion konnte in der mit 50 ng/ml Everolimus behandelten Gruppe gemessen werden ( $p=0,0131$ ). (Siehe Tabelle 5)

**Tabelle 6 Allgemeine Informationen, Laborwerte**

	<b>Vehikel-Kontrolle N=6</b>	<b>Everolimus 5 ng/ml N=6</b>	<b>Everolimus 25 ng/ml N=6</b>	<b>Everolimus 50 ng/ml N=6</b>	<b>p-Wert</b>
<b>Tiergewicht [g]</b>	349 (22)	352 (43)	330 (23)	350 (22)	0.22
<b>Lebergewicht[g]</b>	13.45 (5.2)	13.1 (2.3)	11.8 (3.3)	12.05 (3.8)	0.50
<b>Kaltischämiezeit [min]</b>	51.5 (14)	47.5 (18)	46.0 (21)	45.0 (5)	0.62
<b>Makroskopischer Flush</b>	10 (2)	10 (0.25)	10 (0.5)	10 (0.5)	>0.99
<b>ALT [U/l]</b>					
<b>T0</b>	20 (11)	17 (8)	14.5 (3)	15.5 (8)	0.19
<b>T3</b>	63.0 (57)	63.5 (31)	56.5 (21)	48.0 (48)	0.81
<b>AST [U/l]</b>					
<b>T0</b>	48.5 (23)	45.5 (25)	37.5 (17)	45.0 (21)	0.39
<b>T3</b>	225.0 (131)	198.5 (63)	178.5 (75)	131.0 (37)	0.012
<b>Urea [mmol/l]</b>					
<b>T0</b>	8.5 (4)	8 (3)	8.5 (3)	8 (3)	0.65
<b>T3</b>	18.0 (5)	20.0 (12)	21.5 (11)	24.5 (15)	0.010
<b>LDH [U/l]</b>					
<b>T0</b>	684.0 (421)	605.5 (397)	591 (253)	672 (357)	0.56
<b>T3</b>	2898.5 (2215)	2465.5 (1155)	2757.5 (918)	2253.0 (1437)	0.78
<b>Galleproduktion [mg/g Lebergewicht]</b>					
<b>T1</b>	35.22 (9.75)	29.64 (8.02)	32.84 (6.38)	37.13 (18.92)	0.43
<b>T2</b>	30.65 (12.26)	28.02 (6.89)	30.03 (4.89)	27.84 (13.69)	0.77
<b>T3</b>	30.19 (7.07)	23.15 (3.6)	25.37 (4.88)	23.23 (5.73)	0.013

**Ergebnis 10.1: Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Galleproduktion zwischen den Gruppen**

**Ergebnis 10.2: Ein rückläufiger Verlauf der Galleproduktion wurde in allen Gruppen registriert**

### 3.8 Triglyceridanalyse

In der Triglyceridanalyse des nicht verfetteten Lebergewebes zeigte sich ein sehr geringer Fettgehalt von ungefähr 2 mg/ml normiert auf das Lebergewicht. Im Vergleich dazu enthielt das Lebergewebe der mit Hochfettdiät behandelten Tiere einen bis zu 8-fach höheren Fettgehalt und unterschied sich damit höchst signifikant  $p < 0,0001$ . Eine dreistündige Perfusion ohne pharmakologische Behandlung zeigte keine signifikante Veränderung des Fettgehalts im Vergleich zu nicht-perfundierten steatotischen Lebern ( $p = 0,999$ ). Auch in den mit Everolimus behandelten Gruppen konnte keine signifikante Reduktion weder zu der perfundierten Kontrollgruppe noch zu der nicht-perfundierten Ausgangsverfettung erreicht werden ( $p = 0,824$ ). Der Fettgehalt der Lebern innerhalb einer Gruppe variierte stark und auch die unterschiedlichen Leberlappen zeigten ein inhomogenes Muster.

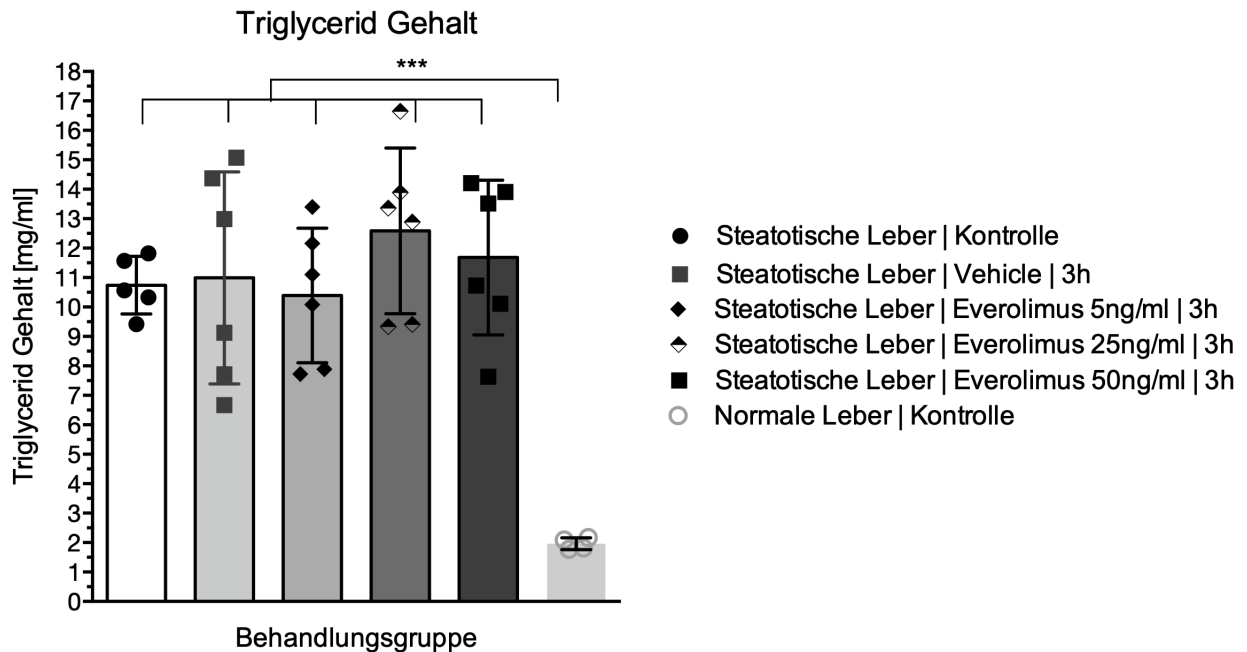


Abbildung 15 Triglyceridanalyse  
 \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

**Ergebnis 11.1:** Durch die Hochfettdiät konnte ein signifikant höherer Fettgehalt der Lebern erreicht werden

**Ergebnis 11.2:** Weder die Perfusion noch Everolimus zeigten einen Einfluss auf den Fettgehalt

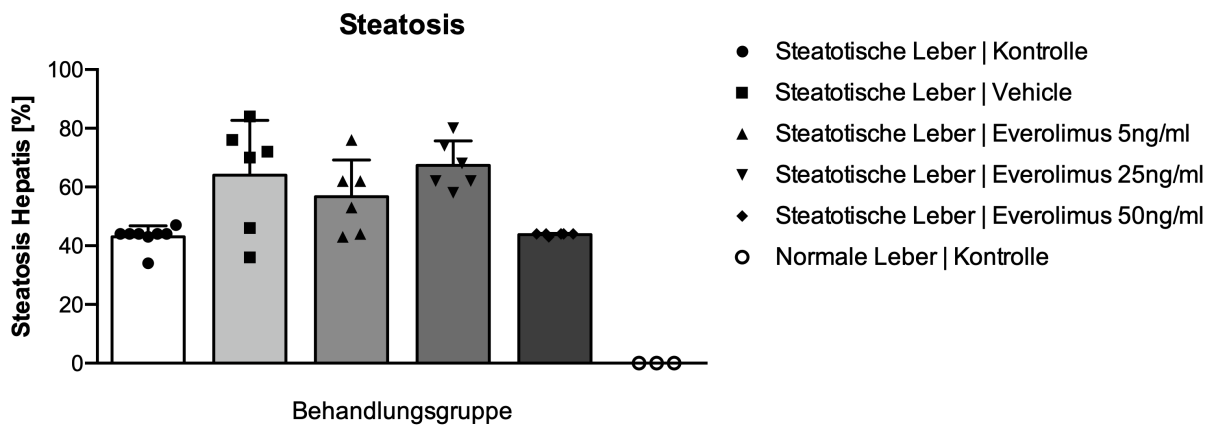
### 3.9 H.E. Färbung

Anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde der histologische Zustand und Verfettungsgrad des Gewebes bestimmt. Es zeigte sich in allen Gruppen ein vollständig vitales Gewebe mit 0% Nekroseraten. Fokale Inflammationen konnten in 3% der Fälle festgestellt werden, keines der Organe wies jedoch Zeichen einer Steatohepatitis auf (Siehe Definition Steatosis hepatis).

Einen deutlich verstärkte sinusoidaler Dilatation konnte in allen Gruppen außer der nicht-steatotischen Kontrollgruppe festgestellt werden. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den normalen Lebern und allen anderen Gruppen.



Die weitere Auswertung ergab in den verfetteten Gruppen eine gemischt bis makrovesikuläre Steatosis von bis zu 90%, wohingegen in der nicht-verfetteten Kontrollgruppe keine Steatosis nachweisbar war. Der makrovesikuläre Anteil der Steatosis erreichte hierbei ebenfalls Werte von bis zu 60%. Es zeigte sich jedoch ein sehr inhomogenes Muster. Sowohl zwischen den einzelnen Tieren als auch zwischen den Lappen einer Leber konnte der prozentuale Anteil verfetteter Hepatozyten stark variieren.



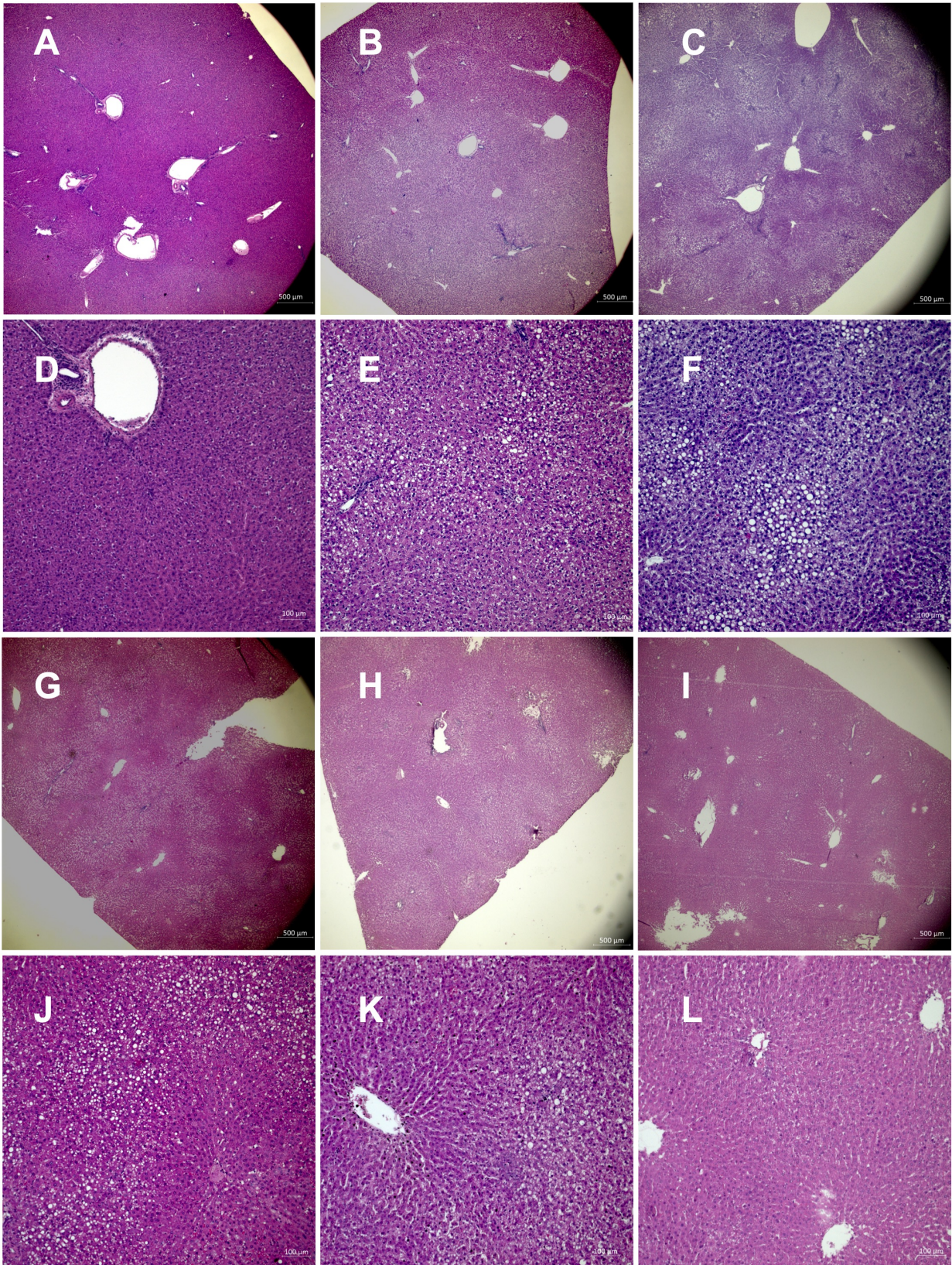
**Abbildung 16 HE-Auswertung**  
 Vergleich des prozentualen Anteils der gemischt bis makrovesikulär steatotischen Hepatozyten bei histologischer Auswertung in den einzelnen Gruppen

**Ergebnis 12.1:** Durch die Hochfettdiät konnte histologisch ein signifikant höherer Fettgehalt der Lebern erreicht werden

**Ergebnis 12.2:** Durch die Hochfettdiät konnte eine Mindestverfettung von 30% gemischt bis makrovesikulärer Steatosis erreicht werden

**Ergebnis 12.3:** Nach dreistündiger Perfusion zeigten sich in allen Gruppen 0% Nekroseraten

**Ergebnis 12.4:** Durch die Behandlung mit Everolimus zeigte sich in keiner der Gruppen eine Veränderung der Steatosis



**Abbildung 17 HE-Fotos**

(A,D) Normale Leber Kontrolle nicht-perfundiert 2,5x und 10x, (B,E) Steatotische Leber nicht-perfundiert 2,5x und 10x, (C,F) Steatotische Leber perfundiert 2,5x und 10x, (G,J) Steatotische Leber mit 5 ng/ml Everolimus perfundiert 2,5x und 10x, (H,K) Steatotische Leber mit 25 ng/ml Everolimus perfundiert 2,5x und 10x, (I,L) Steatotische Leber mit 50 ng/ml Everolimus perfundiert 2,5x und 10x

### 3.10 Elektronenmikroskopie (EM)

Alle Proben wiesen in der elektronenmikroskopischen Untersuchung ein intaktes Gewebe auf. Die polygonalen Strukturen der Hepatozyten ließen sich deutlich voneinander unterscheiden. Zellmembranen und -verbindungen waren intakt. Zahlreiche Zellorganelle wie Zellkerne, Mitochondrien oder raues endoplasmatisches Retikulum konnten eindeutig identifiziert werden. Ein wesentlicher Teil der Hepatozyten wiesen Fettvesikel unterschiedlicher Größe auf. Der „Systematic Uniform Random Sampling“-Methode (SURS) folgend wurden ab einem zufällig gewählten Punkt auf dem Schnitt in immer gleichem Abstand 27 Bilder ausgewählt (87). Diese zufällig gewählten Ausschnitte wurden nach Autophagosomen untersucht. In allen drei Proben konnten Autophagosomen festgestellt werden. Hierbei zeigte sich ein höherer Anteil von 8 bzw. 4 Autophagosomen in der mit 5ng/ml bzw. 50ng/ml Everolimus behandelten Proben im Vergleich zur Probe aus der Kontrollgruppe mit 2. Es konnte sowohl der Prozess der Makroautophagie, bei dem Zellorganelle wie Mitochondrien lysiert werden, sowie der

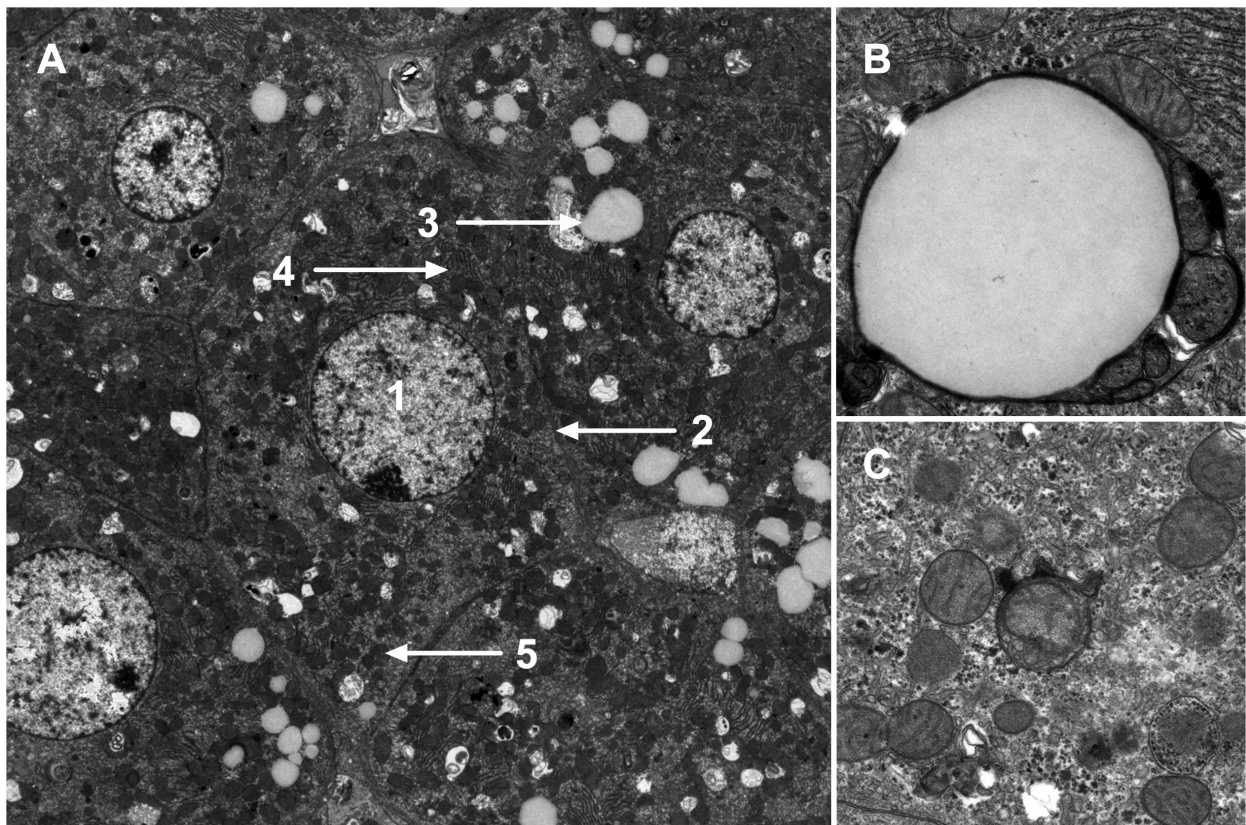


Abbildung 18 Elektronenmikroskopie  
(A) 1 Zellkern, 2 Zellmembran, 3 Fettvesikel, 4 Raues ER, 5 Mitochondrium, (B) Lipophagosom, (C) Autophagosom

Lipophagie, bei dem Lipidvesikel von einem Autophagosom umschlossen werden nachgewiesen werden. Identifiziert wurden diese Bereiche anhand einer weiteren Lipiddoppelmembran, welche die bereits vorhandene Lipiddoppelmembran der Zellorganellen umschloss und somit eine Vielschichtigkeit der umhüllenden Struktur erzeugt.

**Ergebnis 13.1: Autophagosomen ließen sich in allen untersuchten Gruppen erkennen**

**Ergebnis 13.2: In den mit Everolimus behandelten Gruppen zeigten sich mehr Autophagosomen als in der Kontrollgruppe**

**Ergebnis 13.3: Das Gewebe zeigte sich in einem unversehrten Zustand**

# 4 Diskussion

## 4.1 Zusammenfassung des Themas

Die Maschinenperfusion stellt eine moderne und vielversprechende Technik dar, um die Diskrepanz zwischen der Zahl der gespendeten Organe und der Anzahl von Patienten auf der Warteliste durch die Charakterisierung und gegebenenfalls Konditionierung marginaler Organe zu verringern. In der Phase zwischen Explantation und Implantation sind vor allem Organe minderer Qualität anfällig für Schäden durch die klassische Kältelagerung. Die Umstellung zu einer mitochondrialen Produktion von ROS während der ischämischen Phase wird während der Reperfusionphase um ein vielfaches verstärkt und erzeugt so den IRI (39). Die normotherme Maschinenperfusion kann diese kritische ischämische Phase wesentlich verkürzen und hat gleichzeitig das Potenzial zur metabolischen Einschätzung und Rekonditionierung marginaler Organe. Somit könnten deutlich mehr PatientInnen Zugang zu dem Therapiekonzept Lebertransplantation erhalten. PatientInnen mit nicht-alkohol induzierte Fettleber-Erkrankung stellen im Zuge des sich in der Bevölkerung immer weiterverbreitenden metabolischen Syndroms einen wachsenden potenziellen Spenderpool dar. Ziel dieser Arbeit war, ein Konzept zur pharmakologischen Behandlung steatotischer Lebern mittels normothermer ex-vivo-Maschinenperfusion im Kleintiermodell zu entwickeln. Eine pharmakologische Behandlung fand mit drei verschiedenen Dosierungen des mTOR-Inhibitors Everolimus statt. Die Inhibition des mTOR-Signalwegs nimmt wesentlichen Einfluss auf katabole Fettstoffwechselprozesse insbesondere die intrazelluläre Autophagie bzw. Lipophagie. Ziel dieser Versuchsreihe war es dementsprechend, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine Minderung der Schädigungsparameter und Steigerung der Syntheseparameter als Ausdruck einer verbesserten Perfusion zu erreichen. Außerdem wurde im Sinne einer metabolischen Rekonditionierung eine Reduktion des Fettgehalts angestrebt. Im Zuge dieser Untersuchung konnte ein geeignetes Verfettungsmodell etabliert werden, bei welchem die Tiere durch dreiwöchige Fütterung mit 70%igem Fettfutter eine über 30 % gemischt-bis makrovesikuläre Steatosis entwickelten und trotzdem ein transplantierbares Gewicht beibehielten. Des Weiteren konnte mithilfe des entwickelten Perfusionssystems eine Perfusion steatotischer Rattenlebern über drei Stunden unter annähernd physiologischen Bedingungen ermöglicht werden. Die pharmakologische Behandlung

des isolierten Organs mit Everolimus erzeugte eine verbesserte Perfusionsleistung im Hinblick auf einige Synthese- und Schädigungsparameter, zeigte jedoch keinen Einfluss auf den Fettgehalt des Parenchyms und den histologischen Verfettungsgrad der Lebern.

## 4.2 Diskussion der Methodik

### 4.2.1 Verfettungsmodell

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Verfettungsmethode konnte ein für die Anforderung geeignetes Steatosismodell etabliert werden, welches sowohl den Gewichtsanforderung der Lebertransplantation entsprach als auch eine ausreichende Verfettung des Gewebes sicherstellte. Die übermäßige Aufnahme von Fettsäuren und Kalorien stellt zudem einen Mechanismus dar, welcher der Pathogenese der humanen Steatosis hepatis sehr ähnlich ist. Im Vergleich dazu stellen andere Ernährungsmodelle wie die *Methionine- and Choline-deficient-diet* ebenfalls effektive Methoden zur Entwicklung einer Steatosis hepatis dar unterscheiden sich jedoch stark von der humanen Pathogenese. Dies lässt sich besonders eindrücklich anhand der Gewichtsreduktion der Tiere erkennen. Aufgrund der fehlenden Aminosäure Methionin und des fehlenden Cholins kommt es trotz der Entwicklung einer Steatosis hepatis zu einem Mangelernährungszustand. Auch die mit der NAFLD häufig verbundene Insulinresistenz bleibt bei dieser Diät aus (82). Vor allem auf Ebene des mTOR-Signalweges können diese Stoffwechselunterschiede zu Veränderungen der Signaltransduktion führen. Daher bietet die *Methionine- and Choline-deficient-diet* kein passendes Modell für die Untersuchung der Metabolischen Rekonditionierung mittels mTOR-Inhibition. Weitere Modelle wie die *Zucker fatty rats* unterscheiden sich ebenfalls stark von der humanen Pathogenese, da die Entwicklung einer Steatosis hepatis aufgrund einer veränderten genetischen Expression stattfindet (82).

Als Nachteil der Hochfettdiät konnte eine teilweise inhomogene Leberverfettung zwischen den einzelnen Tieren, aber auch innerhalb eines Tieres zwischen den verschiedenen Leberlappen beobachtet werden. Des Weiteren lässt sich zwar in einem Großteil der Lappen die klinisch relevante Makrovesikuläre Steatosis von >30 % erkennen, in vielen Bereichen findet sich jedoch ausschließlich eine schwere Mikrovesikuläre Steatosis. Unterschiede im Fressverhalten und biologische Varianzen, die sich auch anhand des abweichenden Wachstumsverhaltens einiger Tiere erkennen

lässt, sind eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung. Das von Rosenstengel et al. untersuchte Verhalten von drei verschiedenen Rattenstämme auf eine dreiwöchige Fütterung mit der Lieber-Decarli Hochfettdiät zeigte bei Sprague Dawley Ratten die Ausprägung einer schweren Makrovesikulären Steatosis (83). Ein wesentlicher Unterschied bestand in dem Gewicht der Ratten zu Beginn der Fütterung. Dieses befand sich in der Studie von Rosenstengel et al. bei 250-260g, wohingegen die Tiere in der vorliegenden Arbeit ein Gewicht von 100-120g aufwiesen. Das jüngere Alter der deutlich leichteren Ratten könnte somit aufgrund einer stärkeren Toleranz gegenüber dem Fettfutter ebenfalls eine Ursache für das inhomogene Verfettungsmuster und das Ausbleiben einer reinen Makrovesikulären Steatosis sein. Das geringe Gewicht zu Beginn der Verfettung ist jedoch entscheidend, um das Gewichtslimit für die Transplantation nicht zu überschreiten.

#### **4.2.2 Beurteilung der Steatosis hepatis mittels H.E.-Färbung**

Zur histologischen Beurteilung von Steatosegrad und Zustand des Lebergewebes hat sich die H.E.-Färbung als klinisches Standardverfahren etabliert. Auch in dieser Arbeit wurde sie zur histologischen Auswertung des perfundierten Gewebes verwendet. Neben der Beurteilung von Art und Ausdehnung der Steatosis bietet dieses Verfahren weitere Vorteile, wie die Bestimmung von Nekrose, sinusoidaler Dilatation, Inflammation und Fibrosegrad. Fettspezifische Methoden, wie die Oil-Red-O-Färbung, eignen sich aufgrund der verminderten Schnittqualität der kryokonservierten Proben und einer reinen Hämatoxylin-Gegenfärbung für eine Beurteilung der Steatosis, eine Beurteilung der Integrität des Lebergewebes ist nur eingeschränkt möglich. Beide Verfahren sind außerdem semiquantitative Auswertungsmethoden, welche aufgrund der subjektiven Einschätzung eines oder mehrere PathologInnen variieren können. El-Badry et al. konnten beispielsweise in ihrer Studie zeigen, dass sich die Beurteilung von Steatosis durch vier Pathologen und einer Computersoftware deutlich voneinander unterschieden (89). Die Weiterentwicklungen im Bereich der automatischen Steatosisbestimmung mithilfe von Computersoftware und künstlicher Intelligenz könnten daher dazu beitragen eine standardisierte quantitative Beurteilung zu ermöglichen.

### **4.2.3 Die Maschinenperfusion im Kleintiermodell**

Der von unserer Arbeitsgruppe etablierte Kreislauf im Kleintiermodell zur Perfusion von Rattenlebern stellte die Voraussetzung für die weitere Verbesserung der Perfusion und Überprüfung von möglichen Ansätzen zur metabolischen Rekonditionierung der Organe dar. Hierbei war die hohe Vergleichbarkeit zwischen experimentellem Setting und klinischer Anwendung mit humanen Organen von Vorteil. Eine pharmakologische Behandlung und Beobachtung verschiedener Zelltypen ist zwar auch im Bereich der Zellkultur möglich (90), durch die Maschinenperfusion wird jedoch ein dynamisches Modell geschaffen, bei dem beispielsweise Zell-Matrix-Kontakte und dreidimensionales Zusammenwirken des Zellverbandes ebenfalls berücksichtigt werden. Hierbei lassen sich außerdem Rückschlüsse auf die Viabilität und Syntheseleistung des gesamten Organs ziehen, die für die klinische Anwendung und Entscheidung zur Transplantation von großer Bedeutung sind.

Sicherlich ist eine Übertragung von Ergebnissen im Kleintiermodell auf den Menschen nur begrenzt möglich. Unterschiede in Größe, Gewicht und metabolischen Prozessen relativieren die Bedeutsamkeit der Erkenntnisse, die am Modell der Ratte gewonnen werden (91). Auch Wissen über Dosierung von Medikamenten, Pharmakokinetik und – dynamik lassen sich nur teilweise vom Kleintier auf den Menschen - und andersherum - übertragen.

Die in dieser Arbeit verwendete Perfusion ausschließlich über die Pfortader stellt einen weiteren Unterschied zur klinischen Anwendung dar. Da dieses Verfahren technisch deutlich weniger anspruchsvoll ist als die duale Perfusion über Pfortader und Leberarterie wird es in den meisten Tiermodellen und auch in der humanen hypothermen oxygenierten Perfusion (HOPE) der Forschungsgruppe aus Zürich verwendet (44, 48, 62). Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die arterielle Durchblutung des Organs während der Perfusion nicht gewährleistet werden kann und somit sowohl Teile des biliären Traktes als auch ein Teil des Leberparenchyms keine Versorgung erhalten (92). Eine erfolgreiche Transplantation im Rattenmodell nach normothermer Perfusion ausschließlich über die Pfortader konnte bislang nur von Tolboom et al. berichtet werden (57). Es handelte sich dabei jedoch um gesunde Lebern ohne Steatosis oder anderweitige Einschränkung der Organqualität. Eine Transplantation steatotischer Rattenlebern nach NMP konnte bislang nicht gezeigt werden. Die im Anschluss an diese Arbeit durchgeführte Studie unserer Arbeitsgruppe zur Evaluierung



der Perfusionsleistung von portovenöser und dualer Perfusion von Rattenlebern zeigte sowohl deutlich verbesserte Organintegrität und Syntheseleistung sowie verminderte Gallengangsnekrosen und Schädigungsparameter der Gruppen mit dualer Perfusion (93). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die duale Perfusion über Pfortader und Leberarterie ein geeigneteres Modell für die erfolgreiche Transplantation von Rattenlebern darstellt.

#### **4.2.4 Vor- und Nachteile der verschiedenen Perfusionstemperaturen**

Die von unserer Gruppe gewählte normotherme Maschinenperfusion birgt im Gegensatz zur hypothermen und subnormothermen Perfusion entscheidende Vorteile. Wesentlicher Vorteil der NMP gegenüber anderen Perfusionsmodalitäten stellt die Möglichkeit der Funktionalitäts- und Viabilitätsprüfung des Organs dar. Diese ist aufgrund der geringeren metabolischen Aktivität der Lebern bei niedrigeren Temperaturen nicht möglich. Des Weiteren eröffnet die metabolische Aktivität des Organs bei normothermen Temperaturen neben der Charakterisierbarkeit des Transplantats auch die Möglichkeit der pharmakologischen Behandlung. Physiologische Temperaturen bedeuten eine optimale enzymatische Aktivität und lassen somit einen maximalen Effekt der pharmakologischen Behandlung vermuten. NMP ermöglicht es außerdem das Organ in einem physiologischen Milieu zu halten und hat somit das Potenzial, auch längere Phasen zwischen Implantation und Explantation zu überbrücken. Jamieson et al. konnte die Perfusion steatotischer Schweinelebern über 48 Stunden durchführen und sowohl histologisch als auch laborchemisch ein vitales Organ erhalten (61). Auch bei humanen Lebern konnte eine Perfusion von 19 Stunden erfolgen und in der klinischen Studie von Nasralla et al. zeigten sich wesentlich längere Aufbewahrungszeiten im Vergleich zur Cold Storage Gruppe (43, 55). Inwiefern HMP und SMP vorteilhafte Effekte auch bei längerer Aufbewahrungszeit erzeugen, ist bislang unklar. Krohn et al. konnten zwar auch nach 12 Stunden Kältelagerung eine erfolgreiche Transplantation steatotischer Rattenlebern mithilfe von einer Stunde HOPE zeigen, in der Versuchsreihe mit humanen DCD Lebern von Dutkowski et al. wiesen die mit HOPE perfundierten Lebern jedoch eine signifikant niedrigere Kaltischämie Zeit auf (44, 48). Das HOPE-Verfahren etabliert durch die Forschungsgruppe in Zürich konnte sich bislang im Vergleich zu anderen Techniken sicherlich am besten bewähren, die Verbesserung der Transplantationsergebnisse von DCD Lebern betreffend (44, 58).

Dutkowski et al. führten eine erste klinische Studie durch, bei der 25 Transplantationen mit HOPE perfundierten humane DCD-Lebern mit 50 nicht-perfundierten DCD-Lebern verglichen wurden. Es zeigten sich geringere Retransplantationsraten und Schädigungsparameter nach Transplantation durch das HOPE-Verfahren (44). Auch die Konservierung bzw. Behandlung steatotischer Lebern mittels HOPE wies vielversprechende Ergebnisse im experimentellen Setting auf (48). Erste Ergebnisse der klinischen Studie sollten jedoch kritisch betrachtet werden. Die retrospektive Beobachtung einer bislang kleinen Fallzahl und die in vielen Fällen höhere makrovesikuläre Steatosis und Lab-MELD-Scores der Cold Storage Gruppe lassen Raum für eine weitere Betrachtung dieses Themas (48). Ein Nachteil der Perfusion steatotischer Lebern bei subnormothermen Temperaturen konnte in der Arbeit von Karimian et al. aus Boston verdeutlicht werden (94). Die Perfusion bei subnormothermen Temperaturen zeigte zwar im Vergleich zur NMP eine verbesserte Fähigkeit der Energiespeicherung in Form von ATP, jedoch wies sie ebenfalls einen deutlich verminderten Anteil des Antioxidans Glutathion auf. Die Autoren postulieren also aufgrund des wesentlichen Einflusses von Glutathion auf den Ischämie-Reperfusionsschaden einen Nachteil der SMP gegenüber der NMP.

Durch die randomisiert kontrollierte Multicenterstudie von Nasralla et al. konnte mit einer großen Fallzahl ein positiver Effekt von NMP auf die Inzidenz der Early Allograft Dysfunction gezeigt werden, sowie ein Trend zu einer vermehrten Organakzeptanz (43). Jedoch werden hier vor allem die Vorteile der Perfusion von DCD Organen gegenüber Cold Storage adressiert. Eine Auswertung im Hinblick auf den Steatosegrad der perfundierten Lebern nahmen die Autoren hierbei nicht vor. Das Potenzial der NMP, marginale Organe pharmakologisch zu behandeln und metabolisch zu rekonditionieren, wird in der Literatur vielfach postuliert, das Verfahren hat jedoch bislang noch keinen Einzug in die klinische Praxis gefunden. Weitere experimentelle Forschung wird daher auch in Zukunft nötig sein, um eine klinische Anwendung zu ermöglichen.

#### **4.2.5 Konzentration von Everolimus im Perfusat**

Everolimus, ein klinisch zugelassenes Pharmakon, kann durch seine inhibitorische Wirkung auf den mTOR-Signalweg großen Einfluss auf den katabolen Fettstoffwechsel nehmen (95). Ausgehend von der klinisch empfohlenen Dosis von 3-8 ng/ml wurden die drei Konzentrationen 5, 25 und 50 ng/ml untersucht (96). In ihrer Studie zur Aktivierung

von Autophagie durch Everolimus und den Einfluss auf IRI konnten Lee et al. trotz zunehmender Apoptoseraten eine vergleichbare Viabilität von Hepatozyten bei steigenden Everolimus-Konzentrationen bis zu 100 bzw. 1000 nM (entspricht 95,8 mg/ml bzw. 958 mg/ml) zeigen (78). Auch die Dosisfindungsstudie und die Phase I Pharmakokinetik Studie im Bereich der Therapie von soliden Tumoren mittels Everolimus (Study C2101 Monotherapie/C2102) wiesen eine gute Verträglichkeit selbst bei höheren Konzentrationen von bis zu 174 ng/ml auf (97). Unverträglichkeiten wie Infektionen mit opportunistischen Keimen oder Mykosen ließen sich dabei im Wesentlichen auf die immunsuppressive Wirkung von Everolimus zurückführen. Als Substrat von CYP3A4 und PgP (phosphoglycolate phosphatase) erfährt Everolimus größtenteils eine hepatische Eliminierung, daher sollten mögliche hepatotoxische Effekte weiterhin beobachtet werden. Da die Perfusion jedoch am isolierten Organ durchgeführt wird, gehen wir von einer deutlich höheren Toleranzgrenze als der von uns gewählten pharmakologischen Konzentration aus. Eine Steigerung der Konzentration lässt außerdem eine Zunahme der konditionierenden Effekte durch Everolimus vermuten, und gibt Anlass zu weiterführenden Projekten.

Weitere interessante Aspekte, die mit dieser Arbeit nicht adressiert wurden, sind die immunsupprimierende Wirkung und der Einfluss auf den Alterungsprozess durch Rapamycin. Zwei Bereiche, die aufgrund der immer älter werdenden PatientInnen und der damit einhergehenden gesteigerten Immunogenität der Spenderorgane eine wichtige Rolle spielen (24).

#### **4.2.6 Limitationen**

Einige Variablen während des Prozesses der Verfettung und der Versuchsdurchführung lassen ein standardisiertes Verfahren und eine Vergleichbarkeit der Versuche nur begrenzt zu. So führt eine biologische Varianz und ein unterschiedliches Fressverhalten der Tiere zu einer teilweise inhomogenen Ausgangssituation. Unterschiede in Tiergewicht und Steatosegrad der Lebern sind die Folge. Des Weiteren können auch anatomische Varianzen den operativen Ablauf stören und Perfusionsverhältnisse im Sinne einer Druckveränderung beeinflussen.

Auch die Entwicklung der Steatosis hepatis im Kleintier hat Limitationen. Die Ratte stellt zwar ein häufig verwendetes experimentelles Modell dar, hat jedoch aufgrund von unterschiedlicher Größe, Gewicht und metabolischen Prozessen nur eine begrenzte

Vergleichbarkeit zum Menschen (91). Zusätzlich besitzt die Steatosis hepatis eine Pathogenese, die sich über Jahre entwickelt, wohingegen in dieser Arbeit ein kurzfristiger Prozess über 3 Wochen gewählt wurde. Auch handelt es sich aufgrund der Gewichtslimitation für die Transplantation um sehr junge Tiere im Vergleich zu eher älteren humanen Spendern (23).

Die Perfusion ausschließlich über die Pfortader stellt zwar ein technisch einfacheres Verfahren dar, spiegelt jedoch weder die physiologischen *in-vivo* Verhältnisse noch die humanen *ex-vivo*-Perfusionsmaschinen wider. Dem Vergleich zur humanen Perfusion und der Möglichkeit Rückschlüsse daraus zu ziehen sind daher gewisse Grenzen gesetzt.

Die relativ kurze Perfusionsdauer über drei Stunden und die im Vergleich zu der bereits erwähnten Arbeit von Lee et al. deutlich geringeren Dosierung von Everolimus können Ursache für die fehlende Wirkung auf den Fettgehalt der Lebern sein und sind daher ebenfalls als Limitationen der Arbeit zu werten (78). Eine längere Perfusions- und damit –wirkdauer von Everolimus könnte einen deutlich stärkeren Effekt auf den Fettgehalt der Leber zeigen, dies ist Gegenstand laufender Untersuchungen.

Auch die Bestätigung des Konzeptes der pharmakologischen Behandlung steatotischer Rattenlebern mittels Everolimus in Form einer Transplantation der perfundierten Lebern wurde nicht durchgeführt und stellt daher die abschließende Limitation dieser Arbeit dar.

## **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.3.1 Einfluss von Everolimus auf die Perfusion**

Der von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Perfusionskreislauf konnte nun auch bei steatotischen Rattenlebern angewendet werden. Hierbei konnte eine stabile Perfusion in annähernd physiologischem Milieu über 3 Stunden gewährleistet werden. Einige Parameter legten den positiven Einfluss von Everolimus auf die Perfusion nahe. So konnte im portalvenösen Druckverlauf in allen vier Gruppen ein Abfall von ungefähr 9 auf 5 mmHg registriert werden. Dieser war deutlich signifikant in der Kontroll-Gruppe und milderte sich mit steigender Everolimus-Konzentration ab, sodass in der Gruppe mit 50 ng/ml kein signifikanter Unterschied bestand. Konstante Druckverhältnisse bedeuten eine stabilere und schonendere Perfusion für das Gewebe. In der Studie von

Tolboom et al. mit nicht steatotischen Lebern wurden Drücke von 12-15 mmHg erreicht und überstiegen damit den physiologischen Bereich von 8-10 mmHg (57). Gewebeschäden in Form von sinusoidaler Dilatation können Folge dieser erhöhten Druckverhältnisse sein, wohingegen niedrige Drücke zu einer inhomogenen Versorgung des Organs führen können. Histologisch zeigte sich in dieser Arbeit jedoch eine homogene Vitalität des Lebergewebes mit wenigen Nekrosefeldern. Allerdings konnten trotz relativ niedriger Perfusionsdrücke vermehrte sinusoidale Dilatationen in allen Gruppen festgestellt werden. In ihrer Evaluation der Entwicklung eines Steatosis hepatis-Modells in verschiedenen Rattenstämmen sprechen Rosenstengel et al. von deutlich veränderten Druck- und Flussverhältnissen in verfetteten Lebern von Sprague Dawley Ratten (83). Hierdurch könnte möglicherweise die erhöhte Druckanfälligkeit des steatotischen Gewebes erklärt werden. Da sich jedoch auch in nicht-perfundiertem Gewebe teilweise sinusoidale Dilatationen zeigten, sind ebenfalls perioperative Schädigungen - beispielsweise durch die manuelle Spülung der Leber - in Erwägung zu ziehen. Da sich in der Arbeit von Gassner et al. bei ähnlichem Versuchsablauf wie in dieser Arbeit, jedoch mit nicht-verfetteten Lebern kaum Druckschädigungen zeigten, geben diese Ergebnisse Anlass dazu operative Verfahren in Bezug auf steatotische Organe neu zu überdenken (60).

Auch der pH-Wert fiel in allen Gruppen über den Versuchszeitraum ab, zeigte jedoch in den beiden Gruppen mit höherer Everolimus-Konzentration einen stabileren Verlauf und bewegte sich im Bereich von 7,3 am Ende der Perfusion in physiologischem Niveau im Gegensatz zu 7,14 bei der Kontrollgruppe. Ähnliche Verläufe konnten sowohl in den Arbeiten von Gassner et al. bei normothermer Perfusion gesunder Rattenlebern mit dem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Perfusionssystem als auch von Liu et al. bei subnormothermer Perfusion steatotischer Lebern von Obese Zucker Rats festgestellt werden (51, 60).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen bestand im pO<sub>2</sub> der portovenösen BGA. Es zeigte sich ein Abwärtstrend bei der Gruppe mit 25 ng/ml Everolimus und ein signifikant geringerer Wert bei 50 ng/ml im Vergleich zur Kontrollgruppe. Trotz der geringeren Werte bewegte sich auch hier der pO<sub>2</sub> deutlich oberhalb des physiologischen Bereichs. Auch in vergleichbaren Studien zu normothermer und subnormothermer Maschinenperfusion wurden unphysiologisch hohe Werte präsentiert (51, 52, 57). Interessanterweise zeigten sich trotz niedrigerer pO<sub>2</sub>-Werte in der portovenösen BGA signifikant erhöhte Werte des pO<sub>2</sub> in der venösen

BGA der 50 ng/ml-Gruppe. Es ist festzuhalten, dass in allen Gruppen ein deutlicher Abfall des pO<sub>2</sub> zwischen portovenöser und venöser BGA registriert werden konnte. Hieran lässt sich eine Sauerstoffaufnahme des Gewebes und somit eine Funktionalität des Organs erkennen. Die deutlich geringere OUR der 50 ng/ml-Gruppe spricht jedoch für eine wesentlich schwächere Sauerstoffaufnahme im Vergleich zu den anderen Gruppen. Eine mögliche Erklärung für die sinkenden pO<sub>2</sub>-Werte bei steigender Konzentration könnte die Bindungsaffinität von Everolimus an Erythrozyten sein (98). Der Einfluss von Everolimus auf die Funktionalität der roten Blutkörperchen ist bislang zwar unklar, eine verminderte Oxygenierungsfähigkeit wäre hierdurch jedoch denkbar. Ursächlich für die geringere OUR der 50 ng/ml-Gruppe könnte ein zusätzlicher Einfluss von Everolimus auf die mitochondriale Respiration sein. Eine Reduktion der mitochondrialen Zellatmung durch Everolimus konnte von Ariaans et al. in Brustkrebszellen gezeigt werden (99). Eine geringere mitochondriale Respiration hat wiederum eine verminderte Produktion von ROS durch die Mitochondrien zur Folge. Es ist bekannt, dass die mitochondriale Produktion von ROS einen wesentlichen Teil zur Entstehung des IRI beiträgt (39). In der Studie von Suyani et al. zum IRI am Modell der Rattenniere konnte durch Behandlung mit Everolimus eine deutliche Verringerung des oxidativen Stress und der Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren erreicht werden (100). Folglich kann von einem milderem Verlauf des IRI unter Gabe von Everolimus gesprochen werden. Die verringerte OUR der 50 ng/ml-Gruppe unserer Studie spricht also für eine verminderte mitochondriale Respiration, die jedoch als positiven Effekt einen schwächeren oxidativen Stress nach sich zog. Die geringere Schädigung des Leberparenchyms durch ROS führte somit zu einer verbesserten Perfusion, welche als Folge eine signifikant geringere Freisetzung des Schädigungsparameters AST und eine verbesserte Syntheseleistung im Hinblick auf Harnstoff und Bilirubin hatte.

#### **4.3.2 Einfluss von Everolimus auf die Steatosis hepatis**

Die Beeinflussung der Steatosis hepatis stellte aufgrund der klinischen Relevanz für eine Transplantation ein wesentliches Merkmal der metabolischen Rekonditionierung dar. Weder eine reine normotherme Perfusion über drei Stunden noch eine zusätzliche pharmakologische Behandlung mit Everolimus konnte die Steatosis der Lebern in

unserem Modell beeinflussen. Die Triglyceridanalyse des Gewebes zeigte zwar deutliche Unterschiede zu den nicht- verfetteten Lebern, jedoch keine Veränderungen zwischen den perfundierten Gruppen. Auch in der histologischen Auswertung ließ sich weder eine Reduktion des Steatosegrades noch eine Veränderung von makrovesikulärer zu mikrovesikulärer Steatose nachweisen. Insgesamt zeigte sich ein sehr inhomogenes Bild. Sowohl zwischen den Tieren der jeweiligen Gruppen als auch zwischen den Leberlappen eines einzelnen Tieres konnten deutliche Unterschiede des Steatosegrades und des Anteils an makrovesikulärer Steatose festgestellt werden.

Vielversprechende Ergebnisse im Bereich der pharmakologischen Entfettung konnten erstmals durch die Gruppe um Nagrath et al. aus Massachusetts erreicht werden (62). Hierbei wurden zunächst verschiedene potenziell entfettende Substanzen an steatotischen Rattenhepatozyten getestet. Ein sogenannter Entfettungscocktail aus zwei PPAR $\alpha$ Liganden, Hypericin, Scorparone, Forskolin und Visfatin konnte eine Entfettung in Zellkultur von bis zu 31 % nach 48 Stunden zeigen. Im weiteren Verlauf wurde diese Stoffzusammensetzung an steatotischen Rattenlebern während NMP untersucht. Auch hier konnte eine deutliche Fettreduktion von 65 % nach 3 Stunden Perfusion erreicht werden. Bereits ohne Entfettungscocktail war in dieser Studie eine Reduktion des Fettgehalts von 30 % durch reine normotherme Perfusion über 3 Stunden möglich und widerspricht damit unseren Ergebnissen. Methodische Unterschiede bestehen unter anderem im Verfettungsmodell der Ratten. Dabei handelt es sich bei Nagrath et al. mit Obese Zucker Rats um ein genetisches Modell (62). Dieses hat deutlich weniger Bezug zum eigentlichen Pathomechanismus der NAFLD als das in unserer Studie verwendete diätetische Modell, bei dem eine Fütterung von Sprague Dawley Ratten mit einer High-Fat-Diet stattfand. Kritisch zu betrachten ist außerdem die histologische Auswertung dieser Studie. So wird keine Aussage über Nekrose oder sinusoidale Dilatation des Gewebes getroffen. Allerdings waren die Organe, gemäß unserer Einschätzung auf Basis der publizierten histologischen Schnitte, schwer geschädigt - dies spiegelt sich in der Tatsache wider, dass eine Transplantation dieser Organe nicht beschrieben wurde. Es ist daher unklar, ob nach der Behandlung mit dem Entfettungscocktail von einem vitalen Gewebe ausgegangen werden kann.

Entscheidend für die Wirkung des Entfettungscocktails scheint die Temperatur der Maschinenperfusion zu sein. Liu et al. untersuchten die gleichen Substanzen unter subnormothermen Bedingungen und fanden weder auf histologischer Ebene noch im

Triglyceridgehalt des Gewebes Veränderungen der steatotischen Rattenlebern (51). Die Idee des Entfettungscocktails von Nagrah et al. weiterführend, wurde von Boteon et al. der Entfettungseffekt und die Toxizität der Substanzen an primären humanen Hepatozyten, intrahepatischen Endothelzellen und intrahepatischen Cholangiozyten getestet (90). Hierbei konnte der intrazelluläre Triglyceridgehalt um 32% gesenkt werden und bestätigte somit die Ergebnisse von Nagrah et al. Außerdem nahm der Entfettungscocktail keinen negativen Einfluss auf das Überleben der drei hepatischen Zelltypen, sondern zeigte im Falle der primären humanen Hepatozyten eher eine verbesserte Viabilität im Vergleich zur nicht-behandelten Gruppe. Hiervon ausgehend wurde durch dieselbe Gruppe der Entfettungscocktail in Verbindung mit L-Carnitin an abgelehnten humanen Lebern mit Steatose untersucht (101). Es konnte im Gegensatz zur nicht-behandelten Kontrollgruppe sowohl eine Reduktion des Fettgehalts im Gewebe um 38 % (vs. 7 %), als auch eine Reduktion der makrovesikulären Steatose um 40 % (vs. 0 %) nach 6 Stunden Perfusion erreicht werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Entfettung steatotischer Lebern in einer kurzen Phase der Maschinenperfusion durchaus möglich ist. Jedoch wird auch in dieser Arbeit keine Aussage über den histologischen Zustand der Lebern getroffen. Fraglich ist außerdem, ob ein Entfettungscocktail mit verschiedenen pharmakologischen Substanzen sinnvoll für den klinischen Gebrauch ist. Zwar konnte keine Toxizität im experimentellen Setting an der Zellkultur nachgewiesen werden, jedoch ist der Einfluss der Substanzen auf den gesamten Organismus des Menschen bislang ungeklärt und bedürfte einer langwierigen pharmakologischen Zulassungsstudie.

Banan et al. zeigten ebenfalls erste Entfettungsversuche an humanen Lebern mit Hilfe von L-Carnitin und Exendin-4 (102). Hierbei konnte zwar ein Anstieg der Triglyceride im Perfusat festgestellt werden, jedoch blieb eine wesentliche Veränderung des histologischen Steatosegrades aus. Eine geringe Fallzahl (N=2 Behandlungsgruppe, N=1 Kontrolle), keine Randomisierung und ein starker Unterschied im Verfettungsgrad der Lebern machen diese Studienergebnisse allerdings wenig reliabel.

Ein weiterer pharmakologischer Ansatz stellt der Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) dar. Da Studien einen starken Einfluss dieses Proteins auf den Fettstoffwechsel und dadurch eine verminderte Entwicklung einer Steatosis hepatis zeigten, wurde GDNF von Taba Taba Vakili et al. zur Entfettung von HepG2 Zellen und Mäuselebern eingesetzt (66, 103). Auch hier konnte eine 40%ige Reduktion des



Fettgehalts im Gewebe erreicht werden. Weiterführende Studien am Großtiermodell bzw. an humanen Lebern blieben bisher aus.

In dieser Arbeit konnte zwar eine Verbesserung der Perfusionsergebnisse im Hinblick auf Schädigungs- und Syntheseparameter jedoch keine Reduktion des Fettgehalts der Lebern nachgewiesen werden. Kron et al. legen durch ihre Ergebnisse zur HOPE-Perfusion nahe, dass durch Maschinenperfusion auch ohne Minderung der Steatose verbesserte Transplantationsergebnisse erzielt werden können (48). Daher ist zukünftig eine ganzheitliche Betrachtung der metabolischen Rekonditionierung sinnvoll, welche sowohl die Reduktion des Fettgehalts als auch die Vitalitätsmerkmale des Organs mit einbezieht. Des Weiteren stellt die Perfusion über drei Stunden möglicherweise ein zu geringes Zeitfenster dar. Eine Dauer von sechs Stunden wäre daher ein weiterer Schritt, um den Einfluss von Everolimus auf steatotische Lebern zu untersuchen. Wie bereits erwähnt konnte eine Transplantation steatotischer Rattenlebern nach normothermer Perfusion bislang nicht gezeigt werden. Weitere Arbeiten werden deshalb nötig sein, um ein geeignetes Verfahren zu etablieren und die Funktionalität der Organe nach Perfusion zu bestätigen.

#### **4.4 Molekulare Analyse des mTOR-Signalweges**

Im Anschluss an die Perfusionsversuche führten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dragun molekulare Analysen der Lebergewebe durch. Bereits im Vorfeld der Versuchsreihe konnte mit Hilfe der Western Blot Analysen eine deutlich erhöhte Aktivität des mTOR-Markers p-p85S6KT421 bei steatotischen Lebern von Wistar-Ratten im Vergleich zu normalen Lebern festgestellt werden. Außerdem zeigte der Autophagiemarker LC3-II entsprechend der hohen Aktivität des mTOR-Signalweges niedrigere Werte in den steatotischen Lebern im Vergleich zu nicht-verfettetem Gewebe. Die Western Blot Analyse der mit 50 ng/ml Everolimus behandelten Gruppe steatotischer Lebern wies hingegen im Vergleich zu nicht-perfundierten steatotischen Lebern einen signifikanten Anstieg der Autophagie-Aktivität (LC3-II) auf. Des Weiteren zeigte sich eine verbesserte Energiehomöostase (verminderte phosphorylierte AMPK) und eine Reduktion von Apoptose (Cleaved Caspase-3). Lipogene Faktoren (SREPB1 und PPARy) wurden signifikant herunterreguliert, dagegen  $\beta$ -Oxidation-aktivierende Gene, wie PPARa und PGC1a gesteigert und es zeigte sich auf Transkriptionsebene ein Anstieg von HMGCR und TNFa, welche im Prozess des Ischämie-

Reperfusionsschadens eine entscheidende Rolle spielen. Einen zusätzlichen Einfluss der höchsten Everolimus-Konzentration im Vergleich zur perfundierten Kontroll-Gruppe konnte im Bereich der lipogenen-/inflammations-modulierenden Gene (SIRT1, SREBP1 und FASN), der Fettsäure  $\beta$ -Oxidation-regulierenden Gene (CPT1a) und der antioxidativen Funktionen (SOD1) festgestellt werden.

Diese Ergebnisse sprechen insgesamt für eine Beeinflussung durch die Perfusion in Richtung einer katabolen Stoffwechsellage, wobei die Gabe von Everolimus einen zusätzlich aktivierenden Einfluss vor allem auf den katabolen Fettstoffwechsel nahm.

(Quelle: Monographie Peng Ren „mTOR complexes in steatotic liver“)

## 5 Schlussfolgerung

Mit dieser experimentellen Arbeit wurde das Konzept der pharmakologischen Beeinflussung steatotischer Rattenlebern zur Etablierung eines für die Transplantation geeigneten Kleintiermodells adressiert. Die NAFLD stellt im Zuge der zunehmenden Inzidenz des metabolischen Syndroms ein wachsendes Problem für die Transplantationsmedizin dar. Neuerungen wie die Maschinenperfusion machen die Nutzung marginaler Organe zunehmend möglich. Am Kleintiermodell der Ratte wurde mittels Hochfettdiät eine NAFLD erfolgreich induziert und der Einfluss einer dreistündigen normothermer Maschinenperfusion am isolierten Organ untersucht. Kern der Arbeit stellte die pharmakologische Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor Everolimus in drei verschiedenen Konzentrationen dar. Ziel dieser Versuchsreihe war es, durch Everolimus geringere Schädigungsparameter und höhere Syntheseparameter als Ausdruck einer verbesserten Perfusion zu erreichen. Außerdem sollte im Sinne einer metabolischen Rekonditionierung eine Reduktion des Fettgehalts erzielt werden. Es zeigten sich durch die höchste Konzentration von 50 ng/ml Everolimus im Vergleich zur Kontroll-Gruppe signifikant geringere Werte des Schädigungsparameters AST und signifikant höhere Werte des Syntheseparameters Harnstoff im Perfusat. Es lässt sich somit von einem verbesserten Perfusionsergebnis unter Einfluss von Everolimus ausgehen. Wesentlicher Unterschied zwischen der 50 ng/ml-Gruppe und den restlichen Gruppen war ein deutlich geringerer Sauerstoffpartialdruck und OUR, die sich mit einer geringeren mitochondrialen Respiration und somit einem geringeren oxidativen Stress durch weniger ROS-Produktion erklären lässt. Es lässt sich ein milderer Verlauf des IRI daraus schließen und erklärt somit die verbesserte Perfusionsleistung durch Everolimus. Eine Beeinflussung der Steatosis hepatis durch normotherme Perfusion und pharmakologische Behandlung mit Everolimus konnte weder auf histologischer Ebene noch durch photometrische Analytik gezeigt werden. Eine umfassende Betrachtung der Perfusionsleistung des Organs sollte jedoch zukünftig stattfinden, um die Vitalität der Leber und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Transplantation zu beurteilen.

Ausgehend von den hier dargestellten Ergebnissen scheint eine längere Perfusion über beispielsweise sechs Stunden mit der höchsten Everolimus-Konzentration sinnvoll, um weitere Effekte der pharmakologischen Behandlung zu untersuchen. Außerdem werden

zusätzliche Studien zur Lebertransplantation nach normothermer Perfusion nötig sein, um die Vitalität und erfolgreiche metabolische Rekonditionierung des Organs zu evaluieren.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Starzl TE. The long reach of liver transplantation. *Exp Clin Transplant.* 2013;11(2):87-92.
2. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Penn I, Fulginiti VA, Moon JB, Blanchard H, Martin AJ, Jr., Porter KA. Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg.* 1968;168(3):392-415.
3. Gutgemann A, Schriefers KH, Esser G, Lie TS, Paquet KJ, Kaufer C. A case of homologous liver transplantation. *Ger Med Mon.* 1969;14(11):525-8.
4. DSO DSO. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2018. 2019.
5. Tacke F, Kroy DC, Barreiros AP, Neumann UP. Liver transplantation in Germany. *Liver Transpl.* 2016;22(8):1136-42.
6. Westphal C, Doblhammer G. Projections of trends in overweight in the elderly population in Germany until 2030 and international comparison. *Obes Facts.* 2014;7(1):57-68.
7. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40 Suppl 1:S5-10.
8. Tang JX, Na N, Li JJ, Fan L, Weng RH, Jiang N. Outcomes of Controlled Donation After Cardiac Death Compared With Donation After Brain Death in Liver Transplantation: A Systematic Review and Meta-analysis. *Transplant Proc.* 2018;50(1):33-41.
9. Liu H, Li R, Fu J, He Q, Li J. Technical Skills Required in Split Liver Transplantation. *Ann Transplant.* 2016;21:408-15.
10. Deutsche Stiftung Organtransplantation 2018 [Available from: <https://www.dso.de/>].
11. GMBH A. Amboss 2018 [Available from: <https://www.amboss.com/de>].
12. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology.* 2001;33(2):464-70.
13. Peng Y, Qi X, Guo X. Child-Pugh Versus MELD Score for the Assessment of Prognosis in Liver Cirrhosis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Medicine (Baltimore).* 2016;95(8):e2877.
14. Moosburner S, Gassner J, Nosser M, Pohl J, Wyrwal D, Claussen F, Ritschl PV, Dragun D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Prevalence of Steatosis Hepatis in the Eurotransplant Region: Impact on Graft Acceptance Rates. *HPB Surg.* 2018;2018:6094936.
15. Eurotransplant. "Deceased liver donors used, by year, by donor country,"2019. Available from: <http://statistics.eurotransplant.org/>.
16. Eurotransplant. "Active liver waiting list (at year-end) in All ET, by year, by country"2019. Available from: <http://statistics.eurotransplant.org/>.
17. Eurotransplant. "Dynamics of the Eurotransplant liver waiting list and liver transplants between 1991 and 2018"2019. Available from: <http://statistics.eurotransplant.org/>.
18. Orman ES, Mayorga ME, Wheeler SB, Townsley RM, Toro-Diaz HH, Hayashi PH, Barritt AS. Declining liver graft quality threatens the future of liver transplantation in the United States. *Liver Transpl.* 2015;21(8):1040-50.
19. (BZgA) BfGA. Die Entscheidungslösung in Deutschland und gesetzliche Regelungen in anderen europäischen Ländern. 2019.

20. Richter-Kuhlmann E. Überprüfung der Lebertransplantationszentren: Deutliche Verstöße in vier Zentren. *Dtsch Arztebl.* 2013;110(37): A-1663 / B-1471 / C-1448.
21. Lue A, Solanas E, Baptista P, Lorente S, Araiz JJ, Garcia-Gil A, Serrano MT. How important is donor age in liver transplantation? *World J Gastroenterol.* 2016;22(21):4966-76.
22. de Graaf EL, Kench J, Dilworth P, Shackel NA, Strasser SI, Joseph D, Pleass H, Crawford M, McCaughan GW, Verran DJ. Grade of deceased donor liver macrovesicular steatosis impacts graft and recipient outcomes more than the Donor Risk Index. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012;27(3):540-6.
23. Moosburner S, Ritschl PV, Wiering L, Gassner J, Ollinger R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. [High donor age for liver transplantation : Tackling organ scarcity in Germany]. *Chirurg.* 2019.
24. Kan C, Ungelenk L, Lupp A, Dirsch O, Dahmen U. Ischemia-Reperfusion Injury in Aged Livers-The Energy Metabolism, Inflammatory Response, and Autophagy. *Transplantation.* 2018;102(3):368-77.
25. Chu MJ, Dare AJ, Phillips AR, Bartlett AS. Donor Hepatic Steatosis and Outcome After Liver Transplantation: a Systematic Review. *J Gastrointest Surg.* 2015;19(9):1713-24.
26. Pratschke S, Loehe F, Graeb C, Jauch KW, Angele MK. [Usage of marginal organs for liver transplantation: a way around the critical organ shortage?]. *Zentralbl Chir.* 2009;134(2):107-12.
27. Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J, Peralta C. Brain death and marginal grafts in liver transplantation. *Cell Death Dis.* 2015;6:e1777.
28. Le Dinh H, de Roover A, Kaba A, Lauwick S, Joris J, Delwaide J, Honore P, Meurisse M, Detry O. Donation after cardio-circulatory death liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2012;18(33):4491-506.
29. C. Weiller MR, A. Ferbert, G. Schackert. Stellungnahme zur Feststellung des Hirntodes vor Organentnahmen. 2014.
30. Vilmar PDDhck. Organentnahme nach Herzstillstand („Non heart-beating donor“). *Deutsches Ärzteblatt* 95. 11. Dezember 1998;Heft 50:A-3235.
31. Paschos P, Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia.* 2009;13(1):9-19.
32. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Charlton M, Cusi K, Rinella M, Harrison SA, Brunt EM, Sanyal AJ. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2018;67(1):328-57.
33. Kasper DL. *Harrisons – Innere Medizin.* 19 ed. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH; 2016.
34. Herold G. *Innere Medizin.* Köln: Gerd Herold; 2019.
35. Briceno J, Padillo J, Rufian S, Solorzano G, Pera C. Assignment of steatotic livers by the Mayo model for end-stage liver disease. *Transpl Int.* 2005;18(5):577-83.
36. Haldar D, Kern B, Hodson J, James Armstrong M, Adam R, Berlakovich G, Fritz J, Feurstein B, Popp W, Karam V, Muiesan P, O'Grady J, Jamieson N, Wigmore SJ, Pirenne J, Ali Malek-Hosseini S, Hidalgo E, Tokat Y, Paul A, Pratschke J, Bartels M, Trunecka P, Settmacher U, Pinzani M, Duvoux C, Noel Newsome P, Schneeberger S, European Liver ITA. Outcomes of Liver Transplantation for Non-alcoholic Steatohepatitis: a European Liver Transplant Registry Study. *J Hepatol.* 2019.
37. Kulik U, Lehner F, Klempnauer J, Borlak J. Primary non-function is frequently associated with fatty liver allografts and high mortality after re-transplantation. *Liver Int.* 2017.

38. D'Alessandro E, Calabrese F, Gringeri E, Valente M. Frozen-section diagnosis in donor livers: error rate estimation of steatosis degree. *Transplant Proc.* 2010;42(6):2226-8.
39. Tashiro H, Kuroda S, Mikuriya Y, Ohdan H. Ischemia-reperfusion injury in patients with fatty liver and the clinical impact of steatotic liver on hepatic surgery. *Surg Today.* 2014;44(9):1611-25.
40. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013;10(2):79-89.
41. Selzner M, Rudiger HA, Sindram D, Madden J, Clavien PA. Mechanisms of ischemic injury are different in the steatotic and normal rat liver. *Hepatology.* 2000;32(6):1280-8.
42. Kataria A, Magoon S, Makkar B, Gundroo A. Machine perfusion in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2019;24(4):378-84.
43. Nasralla D, Coussios CC, Mergental H, Akhtar MZ, Butler AJ, Ceresa CDL, Chiocchia V, Dutton SJ, García-Valdecasas JC, Heaton N, Imber C, Jassem W, Jochmans I, Karani J, Knight SR, Kocabayoglu P, Malagò M, Mirza D, Morris PJ, Pallan A, Paul A, Pavel M, Perera MTPR, Pirenne J, Ravikumar R, Russell L, Upponi S, Watson CJE, Weissenbacher A, Ploeg RJ, Friend PJ, Europe CfOPi. A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature.* 2018;557(7703):50-6.
44. Dutkowski P, Polak WG, Muiesan P, Schlegel A, Verhoeven CJ, Scalera I, DeOliveira ML, Kron P, Clavien PA. First Comparison of Hypothermic Oxygenated PERfusion Versus Static Cold Storage of Human Donation After Cardiac Death Liver Transplants: An International-matched Case Analysis. *Ann Surg.* 2015;262(5):764-70; discussion 70-1.
45. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, Odeh-Ramadan R, Kinkhabwala M, Goldstein MJ, Ratner LE, Renz JF, Lee HT, Brown RS, Jr., Emond JC. Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am J Transplant.* 2010;10(2):372-81.
46. Dutkowski P, Schlegel A, de Oliveira M, Mullhaupt B, Neff F, Clavien PA. HOPE for human liver grafts obtained from donors after cardiac death. *J Hepatol.* 2014;60(4):765-72.
47. van Rijn R, Karimian N, Matton APM, Burlage LC, Westerkamp AC, van den Berg AP, de Kleine RHJ, de Boer MT, Lisman T, Porte RJ. Dual hypothermic oxygenated machine perfusion in liver transplants donated after circulatory death. *Br J Surg.* 2017;104(7):907-17.
48. Kron P, Schlegel A, Mancina L, Clavien PA, Dutkowski P. Hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) for fatty liver grafts in rats and humans. *J Hepatol.* 2017.
49. Burra P, Zanetto A, Russo FP, Germani G. Organ Preservation in Liver Transplantation. *Semin Liver Dis.* 2018;38(3):260-9.
50. Okamura Y, Hata K, Tanaka H, Hirao H, Kubota T, Inamoto O, Kageyama S, Tamaki I, Yermek N, Yoshikawa J, Uemoto S. Impact of Subnormothermic Machine Perfusion Preservation in Severely Steatotic Rat Livers: A Detailed Assessment in an Isolated Setting. *Am J Transplant.* 2017;17(5):1204-15.
51. Liu Q, Berendsen T, Izamis ML, Uygun B, Yarmush ML, Uygun K. Perfusion defatting at subnormothermic temperatures in steatotic rat livers. *Transplant Proc.* 2013;45(9):3209-13.
52. von Horn C, Baba HA, Hannaert P, Hauet T, Leuvenink H, Paul A, Minor T, partners Cc. Controlled oxygenated rewarming up to normothermia for pretransplant reconditioning of liver grafts. *Clin Transplant.* 2017;31(11).
53. Minor T, Efferz P, Fox M, Wohlschlaeger J, Luer B. Controlled oxygenated rewarming of cold stored liver grafts by thermally graduated machine perfusion prior to reperfusion. *Am J Transplant.* 2013;13(6):1450-60.

54. Hoyer DP, Mathe Z, Gallinat A, Canbay AC, Treckmann JW, Rauen U, Paul A, Minor T. Controlled Oxygenated Rewarming of Cold Stored Livers Prior to Transplantation: First Clinical Application of a New Concept. *Transplantation*. 2016;100(1):147-52.
55. Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, Heaton N, Mirza D, Perera MT, Quaglia A, Holroyd D, Vogel T, Coussios CC, Friend PJ. Liver Transplantation After Ex Vivo Normothermic Machine Preservation: A Phase 1 (First-in-Man) Clinical Trial. *Am J Transplant*. 2016;16(6):1779-87.
56. Ravikumar R, Leuvenink H, Friend PJ. Normothermic liver preservation: a new paradigm? *Transpl Int*. 2015;28(6):690-9.
57. Tolboom H, Pouw R, Uygun K, Tanimura Y, Izamis ML, Berthiaume F, Yarmush ML. A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue Eng*. 2007;13(8):2143-51.
58. Schlegel A, Kron P, Graf R, Dutkowski P, Clavien PA. Warm vs. cold perfusion techniques to rescue rodent liver grafts. *J Hepatol*. 2014;61(6):1267-75.
59. Nossner M, Gassner J, Moosburner S, Wyrwal D, Claussen F, Hillebrandt KH, Horner R, Tang P, Reutzel-Selke A, Polenz D, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Development of a rat liver machine perfusion system for normothermic and subnormothermic conditions. *Tissue Eng Part A*. 2019.
60. Gassner J, Nossner M, Moosburner S, Horner R, Tang P, Wegener L, Wyrwal D, Claussen F, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine. *Liver Transpl*. 2019;25(2):275-87.
61. Jamieson RW, Zilvetti M, Roy D, Hughes D, Morovat A, Coussios CC, Friend PJ. Hepatic steatosis and normothermic perfusion-preliminary experiments in a porcine model. *Transplantation*. 2011;92(3):289-95.
62. Nagrath D, Xu H, Tanimura Y, Zuo R, Berthiaume F, Avila M, Yarmush R, Yarmush ML. Metabolic preconditioning of donor organs: defatting fatty livers by normothermic perfusion ex vivo. *Metab Eng*. 2009;11(4-5):274-83.
63. Boteon YL, Boteon APCS, Attard J, Mergental H, Mirza DF, Bhogal RH, Afford SC. Ex situ machine perfusion as a tool to recondition steatotic donor livers: Troublesome features of fatty livers and the role of defatting therapies. A systematic review. *Am J Transplant*. 2018.
64. Liu Q, Nassar A, Buccini L, Iuppa G, Soliman B, Pezzati D, Hassan A, Blum M, Baldwin W, Bennett A, Chavin K, Okamoto T, Uso TD, Fung J, Abu-Elmagd K, Miller C, Quintini C. Lipid metabolism and functional assessment of discarded human livers with steatosis undergoing 24 hours of normothermic machine perfusion. *Liver Transpl*. 2018;24(2):233-45.
65. Nativ NI, Yarmush G, So A, Barminko J, Maguire TJ, Schloss R, Berthiaume F, Yarmush ML. Elevated sensitivity of macrosteatotic hepatocytes to hypoxia/reoxygenation stress is reversed by a novel defatting protocol. *Liver Transpl*. 2014;20(8):1000-11.
66. Taba Taba Vakili S, Kailar R, Rahman K, Nezami BG, Mwangi SM, Anania FA, Srinivasan S. Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced mice liver defatting: A novel strategy to enable transplantation of steatotic livers. *Liver Transpl*. 2016;22(4):459-67.
67. Mwangi SM, Li G, Ye L, Liu Y, Reichardt F, Yeligar SM, Hart CM, Czaja MJ, Srinivasan S. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Enhances Autophagic Flux in Mouse and Rat Hepatocytes and Protects Against Palmitate Lipotoxicity. *Hepatology*. 2019;69(6):2455-70.
68. Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature*. 2009;458(7242):1131-5.



69. Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(2):124-31.
70. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017;169(2):361-71.
71. Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A. Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology.* 2005;146(3):1473-81.
72. Ricoult SJ, Manning BD. The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO Rep.* 2013;14(3):242-51.
73. Soliman GA, Acosta-Jaquez HA, Fingar DC. mTORC1 inhibition via rapamycin promotes triacylglycerol lipolysis and release of free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids.* 2010;45(12):1089-100.
74. Brown NF, Stefanovic-Racic M, Sipula IJ, Perdomo G. The mammalian target of rapamycin regulates lipid metabolism in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism.* 2007;56(11):1500-7.
75. Cingolani F, Czaja MJ. Regulation and Functions of Autophagic Lipolysis. *Trends Endocrinol Metab.* 2016;27(10):696-705.
76. He Q, Sha S, Sun L, Zhang J, Dong M. GLP-1 analogue improves hepatic lipid accumulation by inducing autophagy via AMPK/mTOR pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;476(4):196-203.
77. Boteon YL, Laing R, Mergental H, Reynolds GM, Mirza DF, Afford SC, Bhogal RH. Mechanisms of autophagy activation in endothelial cell and their targeting during normothermic machine liver perfusion. *World J Gastroenterol.* 2017;23(48):8443-51.
78. Lee SC, Kim KH, Kim OH, Lee SK, Kim SJ. Activation of Autophagy by Everolimus Confers Hepatoprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury. *Am J Transplant.* 2016;16(7):2042-54.
79. GmBH NP. Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels/SmPC)Afinitor®. In: GmBH NP, editor. Fachinfode2019.
80. De Simone P, Fagioli S, Cescon M, De Carlis L, Tisone G, Volpes R, Cillo U, Consensus P. Use of Everolimus in Liver Transplantation: Recommendations From a Working Group. *Transplantation.* 2017;101(2):239-51.
81. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(2):83-95.
82. Kucera O, Cervinkova Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *World J Gastroenterol.* 2014;20(26):8364-76.
83. Rosenstengel S, Stoeppeler S, Bahde R, Spiegel HU, Palmes D. Type of steatosis influences microcirculation and fibrogenesis in different rat strains. *J Invest Surg.* 2011;24(6):273-82.
84. Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T, Bolder U, Geissler E, Jauch KW, Beham A. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on postischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transpl Int.* 2005;18(9):1079-89.
85. Funk G. Diagnostik im Dialog. *DiaNews.* 2012(36).
86. Rubbia-Brandt L, Lauwers GY, Wang H, Majno PE, Tanabe K, Zhu AX, Brezault C, Soubrane O, Abdalla EK, Vauthey JN, Mentha G, Terris B. Sinusoidal obstruction syndrome and nodular regenerative hyperplasia are frequent oxaliplatin-associated liver lesions and partially prevented by bevacizumab in patients with hepatic colorectal metastasis. *Histopathology.* 2010;56(4):430-9.

87. Wernitznig S, Reichmann F, Sele M, Birkl C, Hayback J, Kleinegger F, Birkl-Toglhofner A, Krassnig S, Wodlej C, Holzer P, Kummer D, Bock E, Leitinger G. An Unbiased Approach of Sampling TEM Sections in Neuroscience. *J Vis Exp*. 2019(146).
88. Eurotransplant. Liver Donation 2020 [updated 22.04.2020. Available from: <https://www.eurotransplant.org/organs/liver/>.
89. El-Badry AM, Breitenstein S, Jochum W, Washington K, Paradis V, Rubbia-Brandt L, Puhan MA, Slankamenac K, Graf R, Clavien PA. Assessment of hepatic steatosis by expert pathologists: the end of a gold standard. *Ann Surg*. 2009;250(5):691-7.
90. Boteon YL, Wallace L, Boteon APCS, Mirza DF, Mergental H, Bhogal RH, Afford S. An effective protocol for pharmacological defatting of primary human hepatocytes which is non-toxic to cholangiocytes or intrahepatic endothelial cells. *PLoS One*. 2018;13(7):e0201419.
91. Benga G, Pop VI, Ionescu M, Hodarnau A, Tilinca R, Frangopol PT. Comparison of human and rat liver microsomes by spin label and biochemical analyses. *Biochimica et biophysica acta*. 1983;750(1):194-9.
92. Morell CM, Fabris L, Strazzabosco M. Vascular biology of the biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28 Suppl 1:26-32.
93. Claussen F, Gassner J, Moosburner S, Wyrwal D, Nossner M, Tang P, Wegener L, Pohl J, Reutzel-Selke A, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Dual versus single vessel normothermic ex vivo perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation. *PLoS One*. 2020;15(7):e0235635.
94. Karimian N, Raigani S, Huang V, Nagpal S, Hafiz EOA, Beijert I, Mahboub P, Porte RJ, Uygun K, Yarmush M, Yeh H. Subnormothermic Machine Perfusion of Steatotic Livers Results in Increased Energy Charge at the Cost of Anti-Oxidant Capacity Compared to Normothermic Perfusion. *Metabolites*. 2019;9(11).
95. Lamming DW, Sabatini DM. A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab*. 2013;18(4):465-9.
96. van Gelder T, Fischer L, Shihab F, Shipkova M. Optimizing everolimus exposure when combined with calcineurin inhibitors in solid organ transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2017;31(3):151-7.
97. Agency EM. CHMP Assessment Report for Afinitor 2009:27.
98. Laplanche R, Meno-Tetang GM, Kawai R. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of everolimus (RAD001) in rats involving non-linear tissue uptake. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2007;34(3):373-400.
99. Ariaans G, Jalving M, Vries EG, Jong S. Anti-tumor effects of everolimus and metformin are complementary and glucose-dependent in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2017;17(1):232.
100. Suyani E, Deric UB, Sahin T, Ofluoglu E, Pasaoglu H, Erdem O, Barit G, Reis KA, Erten Y, Arinsoy T, Sindel S. Effects of everolimus on cytokines, oxidative stress, and renal histology in ischemia-reperfusion injury of the kidney. *Ren Fail*. 2009;31(8):698-703.
101. Boteon YL, Attard J, Boteon AP, Wallace L, Reynolds G, Hubscher S, Mirza DF, Mergental H, Bhogal RH, Afford SC. Manipulation of lipid metabolism during normothermic machine perfusion: Effect of defatting therapies on donor liver functional recovery. *Liver Transpl*. 2019.
102. Banan B, Watson R, Xu M, Lin Y, Chapman W. Development of a normothermic extracorporeal liver perfusion system toward improving viability and function of human extended criteria donor livers. *Liver Transpl*. 2016;22(7):979-93.
103. Mwangi SM, Nezami BG, Obukwelu B, Anitha M, Marri S, Fu P, Epperson MF, Le NA, Shanmugam M, Sitaraman SV, Tseng YH, Anania FA, Srinivasan S. Glial cell line-derived

neurotrophic factor protects against high-fat diet-induced obesity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014;306(6):G515-25.

# 7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, David Wyrwal, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Metabolische Rekonditionierung steatotischer Rattenlebern mittels ex-vivo-Maschinenperfusion und mTOR-Inhibition/ Metabolic reconditioning of steatotic rat livers using ex-vivo maschine perfusion and mTOR inhibition“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## 8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht gezeigt.



## 9 Publikationsliste

Publikation	Impact factor
1. <i>“Prevalence of Steatosis Hepatis in the Eurotransplant Region: Impact on Graft Acceptance Rates.”</i> Moosburner S, Gassner JMGV, Nösser M, Pohl J, <b>Wyrwal D</b> , Claussen F, Ritschl PV, Dragun D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. HPB Surg. 2018 Nov 1;2018:6094936. doi:10.1155/2018/6094936. eCollection 2018. PMID: 30515073	3,047
2. <i>Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine.</i> Gassner JMGV, Nösser M, Moosburner S, Horner R, Tang P, Wegener L, <b>Wyrwal D</b> , Claussen F, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Liver Transpl. 2019 Feb;25(2):275-287. doi: 10.1002/lt.25360. PMID: 30341973	4,159
3. <i>„Development of a Rat Liver Machine Perfusion System for Normothermic and Subnormothermic Conditions.“</i> Nösser M, Gassner JMGV, Moosburner S, <b>Wyrwal D</b> , Claussen F, Hillebrandt KH, Horner R, Tang P, Reutzel-Selke A, Polenz D, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part A. 2019 Jul 31. doi: 10.1089/ten.TEA.2019.0152.	3,680
4. <i>„Dual versus single vessel normothermic ex vivo perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation.“</i> Claussen F, Gassner Jmgv, Moosburner S, <b>Wyrwal D</b> , Nösser M, Tang P, Wegener L, Pohl J, Reutzel-Selke A, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. PLoS One. 2020 Jul 2;15(7):e0235635. doi: 10.1371/journal.pone.0235635. eCollection 2020.	2,870

# 10 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinen Betreuern PD Dr. med. Nathanael Raschzok und Prof. Dr. Igor Sauer bedanken, durch deren fachliche Kompetenz und motivierenden Worte das Projekt ins Leben gerufen und vorangetrieben wurde. Einen riesen Dank geht an das gesamte Team der experimentellen Chirurgie, insbesondere Felix Claussen, Joseph Gaßner, Simon Moosburner, Max Nösser, Hannah Everwien, Rosa Horner und Julian Pohl, die mir zu jeder Zeit tatkräftig beiseite standen und mir durch witzige und anregende Gespräche Motivation und Spaß am Laboralltag gaben. Vielen Dank auch an Peter Tang, Anja Reutzel-Selke, Kirsten Führer, Steffen Lippert, Dietrich Polenz und Anja Schirmeier, die bei Fragen zu Auswertung, Färbung und Statistik immer ein Ohr für mich offen hatten.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Pflegerinnen und Pflegern bedanken, die sich täglich mit sehr viel Hingabe um unsere Tiere gekümmert haben. Vielen Dank an die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Duska Dragun, insbesondere Angelika Kusch und Peng Ren, die eine lehrreiche und angenehme Kooperation der beiden Arbeitsgruppen ermöglichten. Vielen Dank auch an Frau Petra Schrade, die mich bei der elektronenmikroskopischen Auswertung unterstützte. Außerdem herzlichen Dank an PD Dr. med. Ruza Arsenic und Dr. med. Edward Michaelis aus der Klinik für Pathologie, die mir bei der histologischen Auswertung halfen.

Schließlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meiner Freundin Lea Stefanel bedanken, die alle meine Höhepunkte und Tiefpunkte in dieser Zeit mitbekommen haben und ohne deren aufmerksames Zuhören und aufbauende Worte ich diese Arbeit nicht geschafft hätte. Diese Arbeit möchte ich meiner Mutter Sybille Wyrwal und meinem Vater Rüdiger Wyrwal widmen.