

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

DISSERTATION

Der Einfluss von Erythropoietin auf den Ischämie-
/Reperfusionsschaden der Leber im Modell der orthotopen
Rattenlebertransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gerhard Hunold
aus Fulda

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. U. P. Neumann
2. Priv.-Doz. Dr. med. R. Pfitzmann
3. Prof. Dr. med. R. Somasundaram

Datum der Promotion: 29.01.2010

1	Einleitung	5
1.1	Lebertransplantation und Bedeutung des Ischämie-/Reperfusionsschadens	5
1.2	Pathophysiologische Mechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens	6
1.3	Protektives Potenzial von Erythropoietin	9
1.3.1	Modulation von EPO	10
1.3.2	Zytoprotektion durch EPO	11
2	Fragestellung	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Experimenteller Plan	14
3.1.1	Behandlungsgruppe (EPO-Gruppe)	14
3.1.2	Vergleichsgruppe	15
3.2	Chirurgische Technik der Lebertransplantation	16
3.2.1	Operationsvorbereitungen und Anästhesie	16
3.2.2	Spenderoperation und Hepatektomie	16
3.2.3	Empfängeroperation	19
3.3	Tierwahl und Tierhaltung	22
3.4	Perfusions-, Konservierungs- und Reperfusionslösungen	23
3.5	Histologische und molekularbiologische Methoden	23
3.5.1	Probengewinnung	23
3.5.2	Isolierung von RNA und Protein	24
3.5.2.1	Materialien	24
3.5.2.2	Durchführung	26
3.5.2.3	Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	27
3.5.2.4	Reverse Transkription	27
3.5.3	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	28
3.5.3.1	Primer	28

3.5.3.2	Durchführung der RT-PCR	28
3.5.4	Histologische Techniken.....	29
3.5.4.1	Hämatoxilin-Eosin (H.E.) – Färbung	29
3.5.4.2	Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung	30
3.5.4.3	TUNEL – Technik	31
3.5.4.4	Immunhistochemische Färbung nach der Labeled-Streptavidin-Biotin (LSAB) Methode.....	32
3.5.4.5	Leberzellschaden	33
3.5.4.6	Statistik.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Überleben	34
4.2	Leberenzyme	34
4.3	TUNEL Färbung.....	36
4.4	HE und PAS Färbung	39
4.5	Immunhistochemische Färbung (Hypoxyprobe™).....	43
4.6	IL 1b mRNA Expression.....	46
4.7	IL 6 mRNA Expression.....	46
5	Diskussion	49
6	Zusammenfassung.....	52
	Danksagung.....	62
	Lebenslauf.....	63
	Erklärung an Eides Statt	64
	Publikationsliste	65

1 Einleitung

1.1 Lebertransplantation und Bedeutung des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) ist heute ein etabliertes Verfahren zur Behandlung terminal leberinsuffizienter Patienten [3]. Bei den zugrunde liegenden Erkrankungen handelt es sich um fortgeschrittene Leberzirrhose bei Virushepatitiden, nutritiv-toxisch induzierte Leberzirrhose, primär biliäre Zirrhose, wie auch primär und sekundär sklerosierende Cholangitis, Budd-Chiari-Syndrom und primäre Lebertumoren in frühem Stadium [4]. Des Weiteren kommen als Indikationen das akute Leberversagen, angeborene Erkrankungen wie M. Wilson und Zystenleber oder Gallengangsagenesien in Betracht.

Seit der ersten erfolgreichen Lebertransplantation von Thomas E. Starzl in Denver, Colorado/USA [5, 6, 7] führten kontinuierliche Verbesserungen der Immunsuppression, der Organkonservierung, der chirurgischen Technik und des perioperativen Managements zu den heute hervorragenden Ergebnissen dieser Operation. Gegenwärtig werden pro Jahr insgesamt über 8000 OLT in Nordamerika und Europa durchgeführt, in Deutschland allein sind es zwischen 700 und 750. An den verschiedenen Transplantationszentren wurden in den letzten Jahren Überlebensraten von über 90% nach einem Jahr und von über 80% bzw. 70% nach 5 bzw. 10 Jahren erreicht.

Trotz dieser Erfolge steht die Transplantationsmedizin weiterhin vor Schwierigkeiten. Der Mangel an geeigneten Spenderorganen führt dazu, dass Patienten auf der Warteliste versterben, bevor ein Spenderorgan zur Verfügung steht [8]. Daraus erfolgt die Notwendigkeit, auch Organe zu transplantieren, die nur noch bedingt als Transplantat geeignet sind („marginale Qualität“) [9]. Diese Organe mit marginaler Qualität stehen in Zusammenhang mit dem Transplantatversagen und der Transplantatdysfunktion, welche sich als multifaktorielle Geschehen aus der Summe schädigender Einflüsse während der Spenderorganentnahme, Konservierung und Reperfusion zusammensetzen. Hierbei stellt der mit der Konservierung zusammenhängende Ischämie-Reperfusion (I/R) – Schaden ein wichtiges klinisches Problem dar [12, 13, 14, 15, 16]. Die Ausprägung dieses Schadens ist abhängig von der

kalten und warmen Ischämiezeit, der Konservierungs- und Reperfusionstyp und der vorbestehenden Leberschädigung, z.B. durch Verfettung.

Durch die stetige Entwicklung und Verbesserung der Konservierungslösungen konnte der Konservierungsschaden reduziert und die Konservierungsdauer der Leber theoretisch auf bis zu 24 Stunden verlängert werden [17, 18]. Dennoch bleibt der I/R-Schaden als ernstes Problem bestehen: Ein Transplantatversagen (primäre Nichtfunktion) ist eine der Hauptursachen für das Nichtüberleben des Empfängers [19, 20, 21] und tritt in etwa 8 % der Fälle auf [22, 23]. Des Weiteren kommt es bei einer schweren Konservierungsschädigung zu stärkeren Abstoßungsreaktionen des Empfängers gegen das Transplantat [24, 25, 26].

1.2 Pathophysiologische Mechanismen des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Die Mechanismen der Organschädigung durch Ischämie und Reperfusion sind vielfältig und deren Kenntnis ist die Grundlage zum Schutz der Leber vor primärer Nichtfunktion und Dysfunktion. Die Ischämie findet in drei Formen statt: Als kalte Ischämie im Rahmen der Organkonservierung bei Transplantationen, als warme Ischämie bei Trauma, Schock, Leberchirurgie (Pringle Manöver) und Transplantation und als Ischämie unter Wiedererwärmung im Rahmen von ex situ Manipulation an der Leber oder während der Implantation in der Phase vor Freigabe des Blutflusses. Die im Folgenden aufgeführten Schädigungen werden durch diese drei Phasen der Ischämie und der anschließenden Reperfusion hervorgerufen, wobei das Ausmaß der Schädigung abhängig ist von der Dauer und der Art der Ischämiezeit. Die in der Ischämiezeit entstandenen Zellveränderungen führen während der Reperfusion zu weiterer Schädigung [27, 28, 29]. Dabei sind Endothelzellen und Hepatozyten unterschiedlich betroffen. So werden die Endothelzellen eher während der kalten Ischämie und die Hepatozyten besonders während der warmen Ischämie geschädigt [30, 31, 32].

Durch Unterbrechung der Blut- und damit der Sauerstoffzufuhr entsteht im ischämischen Organ eine Hypoxie, die dazu führt, dass sauerstoffabhängige Stoffwechselforgänge nur noch in begrenztem Maße ablaufen können. Damit wird die oxidative Phosphorylierung von Adenosintriphosphat (ATP) unmöglich und

vorhandenes ATP ist schnell aufgebraucht. Den ATP-abhängigen Ionenpumpen (Na⁺/K⁺-Pumpe, Ca⁺⁺-Pumpe) fehlt die Energie und die steigenden intrazellulären Na⁺- und Ca⁺⁺-Spiegel führen zu einem Einstrom von Cl⁻-Ionen und Wasser. Es kommt zum Zellödem [33, 34, 35]. Das in der Zelle angesammelte Ca⁺⁺ aktiviert hydrolysierende Enzyme wie Phospholipasen und Proteasen, die das Organ schädigen [36, 37, 38].

Die Laktat- und H⁺-Akkumulation durch anaerobe Glykolyse bzw. Nukleotidhydrolyse führt zur intrazellulären Azidose, wodurch lysosomale Membranen destabilisiert werden. Der dadurch gestörte mitochondriale pH-Gradient führt zur Bildung von Ausstülpungen auf der Zelloberfläche, die in direktem Zusammenhang mit einem Aufbrechen des Zytoskeletts, irreversibler Zellschädigung und Zelltod steht [39, 33]. Eine milde Azidose allerdings schützt die Hepatozyten auch vor dem nekrotischen Zelltod (pH Paradox) [40, 41].

Diese Zellveränderungen auf Grund der Hypoxie prädisponieren die Zellen wiederum für einen Schaden durch Reoxygenierung. So beschrieb McCord ein Modell, in dem er erklärte, wie der ischämische Schaden durch Bildung von freien Sauerstoffradikalen bei der Reoxygenierung noch vergrößert wird [42]. Er machte die von der Xanthinoxidase gebildeten Sauerstoffradikale verantwortlich. Die Xanthinoxidase entsteht während der Ischämie durch proteolytische Enzyme aus der Xanthindehydrogenase. Wenn diese während der Reperfusion Hypoxanthin und Xanthin oxidiert, werden freie Sauerstoffradikale gebildet. Seither werden sämtliche freien Sauerstoffradikale und reaktive Stickstoffverbindungen für die postischämische Zellschädigung mitverantwortlich gemacht. Diese führen zur Schädigung von Epithelzellen und Hepatozyten indem sie zelluläre und mitochondriale Membranen angreifen [43, 44, 45, 38]. Des Weiteren aktivieren sie Kupffer Zellen, die wiederum Zytokine und Sauerstoffradikale ausschütten [46, 47]. In diesem Rahmen kommt es auch zur Aktivierung und Infiltration von Leukozyten, vor allem von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten [48, 49]. Bei der Aktivierung kommt es zur Ansammlung von Leukozyten in den Lebersinusoiden, zu deren Adhäsion an den Endothelzellen und zur transendothelialen Migration mit nachfolgendem Parenchymschaden. Durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden werden an der Oberfläche von Endothelzellen und Leukozyten Adhäsionsmoleküle exprimiert, wobei TNF- α und IL-1 durch ihre Aktivierung von Selektinen und β -Integrinen über IL-8-Synthese eine entscheidende Rolle spielen

[50, 51]. Die Leukozyten setzen dann wiederum Sauerstoffradikale und Proteasen frei, die zur Zellschädigung beitragen [52]. Außerdem wird durch die Leukozytenakkumulation in den Sinusoiden die hepatische Mikrozirkulation erheblich eingeschränkt. Dies wird durch verstärkte Thrombozytenadhäsion noch unterstützt [53]. Die sinusoidalen Randzellen, und hier gerade die Endothelzellen, haben bei den Ischämie-/Reperfusionsvorgängen eine besonders exponierte Stellung und sind dadurch neben den ischämischen auch unmittelbar mechanischen Belastungen wie zum Beispiel dem Perfusionsdruck ausgesetzt. Die Parenchymzellschädigung ist letztlich zu einem großen Teil auch Folge des Sinusoidalzellschadens [53, 54, 55, 56]. Gerade in Hinblick auf die sinusoidalen Endothelzellen ist es wichtig, die Rolle der Apoptose bei der Entwicklung des Ischämie-/Reperfusionsschadens zu betrachten. Borghi-Scoazec et al [57] beobachteten in ihrer Studie über menschliche Lebertransplantate Apoptose sowohl bei Hepatozyten als auch bei Endothelzellen. Beobachtet man die Zellschädigung jedoch in chronologischem Ablauf, stellt man fest, dass bei Endothelzellen dem massiven Zelltod und den stark erhöhten ALT-Werten nach 24h Reperfusion eine Phase der Apoptose vorausgeht (4h nach Reperfusion), wohingegen der Anteil der apoptotischen Hepatozyten gering ist [58]. Dies könnte bedeuten, dass Endothelzellen durch Apoptose und Hepatozyten durch Nekrose ohne vorherige Apoptose sterben. Vom zeitlichen Ablauf her findet eine Schädigung der Endothelzellen zwar bereits während der Phase der Ischämie statt, die Apoptose als aktiver Vorgang ist aber abhängig von der Reperfusion und der mit ihr steigenden Konzentrationen vom Energieträger ATP und von Mediatoren wie TNF- α [59, 60, 61]. Auf der Suche nach organprotektiven Strategien entdeckten Murry et al. 1986, dass eine kurze Periode von Ischämie/Reperfusion ein Organ toleranter macht gegenüber einem nachfolgenden länger andauernden Ischämie-/Reperfusionsschaden [62]. Diese Technik, die anfänglich am Herzen und später auch an Gehirn, Darm, Skelettmuskel und Leber beschrieben wurde, heißt ‚ischämische Präkonditionierung‘. Die zu Grunde liegenden zytoprotektiven Mechanismen sind noch unklar. Diskutiert wird zum Beispiel Adenosin, das über die Stimulation von A₂-Rezeptoren zu einem erhöhten NO-Spiegel führt [63]. Auch wird vermutet, dass durch die Präkonditionierung eine Art Energiesparmechanismus ausgelöst wird, der sich in einer verringerten ATP-Degradierung während der Ischämiezeit zeigt und die Produktion von Laktat und Produkten der anaeroben Glykolyse senkt [64, 65]. Darüber hinaus konnte gezeigt

werden, dass ischämische Präkonditionierung zu deutlich erniedrigten TNF- α Werten in der Spätphase der Reperfusion (24-48h) nach verlängerter Ischämie führt [66]. Schließlich wurde nach Präkonditionierung auch eine dramatische Reduktion der apoptotischen Endothelzellen festgestellt [67, 68, 69].

1.3 Protektives Potenzial von Erythropoietin

Erythropoietin ist das wichtigste an der Hämatopoese beteiligte Cytokin und wird hauptsächlich in der Niere und der Leber, aber auch im Gehirn, im Herzen und im Uterus produziert. Es reguliert die Erythropoese von Säugetieren und hat diverse zelluläre Effekte in Geweben ohne hämatopoetische Funktion. Die Einführung von rekombinantem menschlichen Erythropoietin (EPO) markierte einen signifikanten Fortschritt in der Behandlung von Anämien bei chronischem Nierenversagen. Gleichzeitig haben experimentelle Studien sein Potenzial als Mittel zur Präkonditionierung entdeckt und gezeigt, dass es sowohl im Gehirn als auch im Herz einen Schutz gegen Ischämie/Reperfusion(I/R)-Schäden bietet. Dies erreicht es zum einen durch eine Verringerung der zellulären Apoptose und Nekrose und zum anderen durch eine Unterdrückung der Entzündungsreaktion. Zusätzlich legt die Anwendung von EPO zum Zeitpunkt der Reperfusion am isolierten Rattenherz nahe, dass es nicht nur bei der Prävention sondern auch bei der Behandlung von ischämischen Episoden nützlich sein kann [70].

EPO wird derzeit nur zur Behandlung der Ischämie bei Nierenversagen angewandt. Ein besseres Verständnis der starken protektiven Effekte einer EPO-Gabe bei I/R-Schäden ist die Grundlage für die Entwicklung weiterer klinischer Anwendungen dieses Moleküls. Verschiedene Studien weisen bereits auf die möglicherweise an dieser Protektion beteiligten Mechanismen hin. So scheint die Fähigkeit von EPO die Apoptose zu verringern einen wichtigen Beitrag zu leisten [70, 71, 72]. Der Schutzeffekt von EPO während I/R der Niere wurde mit der Induktion des Hitze Schock Protein 70 (HSP70) in Zusammenhang gebracht [73]. Kürzlich berichteten Forscher über die anti-entzündlichen Eigenschaften von rhEPO bei Gehirnschädigung. Weiterhin wird deklariert, dass EPO in einem Modell experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis stark antiinflammatorisch auf das zentrale Nervensystem (ZNS) wirkt [74]. Gleichermaßen konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit EPO in einem Ischämie-Modell des Gehirns die

Produktion von proinflammatorischen Cytokinen und den Einstrom von Entzündungszellen in das Schädigungsgebiet vermindert [75]. Frühere Studien zeigen bereits, dass EPO intrazelluläre Signalwege über NF- κ B und AP-1 nutzt [76]. Es ließ sich weiterhin zeigen, dass EPO in einem Ischämiemodell des Herzens die I/R-induzierte Aktivierung von NF- κ B und AP-1 verringert, mit einer Reduzierung der TNF- α , IL-6 und ICAM-1-Produktion und einer gesteigerten IL-10-Produktion [77].

Die antiapoptotische Wirkung von EPO wurde als erstes im Modell eines ischämischen Hirnschadens demonstriert [78, 79]. Auch Endothelzellkulturen schützt die Zugabe von EPO vor Anoxie-induzierter Apoptose [80]. Erst kürzlich wurde beobachtet, dass die Gabe von EPO bei Ratten eine dramatische Schutzwirkung gegen kardialen Ischämieschaden entfaltet, was an einer reduzierten Zahl von TUNEL-positiven Zellen und einer reduzierten Aktivierung von Caspase 3 in den Herzen der behandelten Tiere ablesbar ist [71, 81]. Eine Behandlung mit EPO reduziert auch die Apoptose nach in vivo - Verschluss einer Koronararterie bei Kaninchen [70, 82, 83].

1.3.1 Modulation von EPO

Bekanntermaßen ist EPO ein entscheidender Modulator der Erythrozytenproduktion. Jedoch ist es nicht, wie man vermuten würde, die verminderte Konzentration von roten Blutkörperchen, die die Produktion und Sekretion von EPO stimuliert, sondern der Sauerstoffmangel. Dem hypoxischen Reiz folgt die Sekretion von EPO ins periphere Blut, wo es nach Ankunft im Knochenmark an seinen Rezeptor auf den erythroiden Vorläuferzellen bindet und zur Erythropoese führt [84], welches wiederum zu einer erhöhten Zahl von Erythrozyten und damit zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Gewebes führt. In den meisten Geweben wird die hypoxieabhängige EPO und Erythropoietinrezeptor (EPOR) Expression primär durch den Hypoxie-induzierten-Faktor 1 (HIF-1) reguliert. Auf transkriptionaler Ebene resultiert die hypoxieabhängige genetische Transkription von EPO und EPOR direkt aus einer Aktivierung von HIF-1 unter hypoxischen Bedingungen [85].

Nicht nur Hypoxie, sondern auch andere Störungen im Stoffwechsel wie Hypoglykämie und erhöhtes intrazelluläres Calcium führen möglicherweise zu einer verstärkten Expression von EPO über die Aktivierung von HIF-1. Außerdem können eine Reihe von Cytokinen wie der Insulin-ähnliche-Wachstumsfaktor, TNF- α , IL- 1β und IL-6 die Produktion und Sekretion von EPO regulieren [86].

1.3.2 Zytoprotektion durch EPO

Um mit einer zytoprotektiven Substanz Zellschaden zu vermindern oder gar zu verhindern, ist es wichtig, die zellulären Signalwege zu kennen, die den Zelltod herbeiführen. EPO ist an der Modulation einer Reihe dieser Signalwege beteiligt, die von der Janus Kinase 2 (Jak2) und der Serin-Threonin-Kinase Akt ausgehen und an denen weitere Zellsignalwege beteiligt sind, die unter anderem Nuclear Faktor κ B (NF κ B), mitochondriale Permeabilität, Kaspasen und Signaltransduktions- und Transkriptionsaktivator-Proteine STAT beinhalten.

Neben diesen Mechanismen, die die zelluläre Integrität verbessern, kann EPO auch Auswirkungen auf die Zellhomöostase haben, indem es direkt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α blockiert [87]. EPOR gehört zur Familie der Typ 1 Zytokinrezeptoren und besteht aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer intrazellulären Domäne. Nach der Aktivierung von EPOR an der extrazellulären Domäne wird an der intrazellulären Domäne Jak2 spezifisch gebunden und durch Phosphorylierung aktiviert. EPO scheint bei seiner antiapoptostischen Wirkung von der Phosphorylierung von Jak2 abhängig zu sein, da ein Verlust der Jak2 Aktivität die Zellschutzwirkung von EPO aufhebt [88]. Die Signaltransduktions- und Transduktionsaktivator-Proteine STAT sind direkte Substrate der Januskinasen. Die aktivierten STAT binden im Nucleus direkt an Promotorregionen der DNA und führen zu Gentranskription. STAT Proteine sind grundlegend für die pleiotropen Zellfunktionen als Antwort auf Zytokine und Wachstumsfaktoren. Die Aktivierung von STAT5 kann zusätzlich die Proliferation von EPO sowie einen Schutz der Zelle gegen Apoptose modulieren [89], wobei das EPO-abhängige Überleben der Zelle mit einer verlängerten DNA-Bindungsaktivität von STAT5 und einer Reduktion der Apoptoseinduktion einhergeht.

Zusätzlich zur Aktivierung von Jak2 führt EPO auch zur Aktivierung von Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-K) und der Proteinkinase B (PKB), auch bekannt als Akt. Akt ist eine der Grundkomponenten in einer Reihe von Signalkaskaden, die das Zellüberleben fördern und die Apoptose verhindern. In unterschiedlichen Schädigungsszenarien wie oxidativem Stress [91, 92], Hypoxie [90] oder Trauma führt eine Aktivierung von PI 3-K zur Aktivierung von Akt, welches in seiner aktiven Form (phospho-Akt) einen Schutz vor Apoptose induziert. In diesen Fällen kann EPO durch

Jak2- und PI 3-K – abhängige Phosphorylierung von Akt dessen Aktivität signifikant steigern und damit den Zellschutz verstärken. Diese Hochregulierung von Akt im Falle einer Zellschädigung scheint für die Schutzwirkung von EPO unverzichtbar zu sein, da eine Verhinderung der Phosphorylierung von Akt den Zellschutz durch EPO blockiert [91, 93, 94].

Akt kann unter anderem Bad inaktivieren, welches ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie ist. Die Phosphorylierung von Bad durch Akt führt zum Freiwerden von Bcl-XL, welches zusammen mit Bcl-2 die Translocation von Bax ins Mitochondrium verhindert, wodurch das Potential der mitochondrialen Membran aufrechterhalten werden kann und die Ausschüttung von Cytochrom C verhindert wird [95]. Zum Teil ist die Zytoprotektion durch EPO auch von der Aktivierung von NF- κ B abhängig, welches eine Reihe von antiapoptotischen Genen induziert. So fördert es zum Beispiel die Expression der Apoptose-inhibierenden-Proteine (IAPs), welche spezifisch aktive Formen der Kaspasen 3, 7 und 9 inhibieren [96]. Zusätzlich wird die TNF- α induzierte Apoptose durch eine Hemmung der Kaspase 8 unterdrückt [97]. Außerdem wurden JNK und Gadd45 β als weitere Ziele von NF κ B entdeckt. Gadd45 β wird mit dem Zellzyklus und der DNA-Reparatur in Verbindung gebracht. Seine Induktion durch TNF- α ist abhängig von NF- κ B und verantwortlich für die Hemmung der Aktivierung von JNK und für die Unterdrückung von Apoptose [96, 97, 98]. Weiterhin ist eine Zytoprotektion durch EPO eng mit der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) verbunden. Der Verlust von $\Delta\Psi_m$ stellt einen ausschlaggebenden Faktor für Zellverletzungen und darauf folgende Einleitung der Apoptose dar [91, 99]. In Studien über Schäden durch freie Radikale und Anoxie verhinderte EPO die Depolarisation der mitochondrialen Membran durch Aufrechterhaltung von $\Delta\Psi_m$, und verhinderte so das Freiwerden von Cytochrom C [90, 100, 101]. Gleichwohl ist es möglich, dass EPO $\Delta\Psi_m$ mit Hilfe der Aktivierung von Akt und durch Regulation der Kaspasen-vermittelten Signalwege aufrechterhält. Es scheint, dass EPO sowohl auf prä- als auch auf postmitochondrialer Ebene Akt dafür benutzt, Apoptose zu verhindern. Während Akt prämitochondrial Kaspase 9 direkt aktiviert [91], kann es postmitochondrial die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium verhindern, was wiederum die Aktivität von Kaspase 3 und 9 blockiert [101].

2 Fragestellung

Wir verwendeten das etablierte Modell der mikrochirurgischen orthotopen Rattenlebertransplantation mit einer Kaltischämiezeit von 18 Stunden, um den Einfluss von Erythropoietin auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden der Leber zu untersuchen. Es wurden sowohl histologische als auch molekularbiologische Methoden verwendet, um die Transplantatschädigung durch Ischämie und Reperfusion aufzuzeigen und den Einfluss von EPO auf die verschiedenen Anteile dieser Schädigung und deren Verhinderung darzustellen.

1. Lassen sich nach Lebertransplantation bei der Ratte mit einer Kaltischämiezeit des Transplantats von 18 Stunden an Hand lichtmikroskopischer Untersuchungen Zeichen des Leberzellschadens feststellen und zeigen sich Unterschiede in der Ausprägung zwischen EPO-behandelten und nicht behandelten Tieren?
2. Lässt sich durch eine Vorbehandlung von Leberspender und -empfänger mit EPO die Zahl der apoptotischen Zellen nach Transplantation verringern?
3. Lässt sich mit Hilfe einer immunhistochemische Färbung eine geringere Anzahl hypoxischer Zellen bei den mit EPO behandelten Tieren beobachten?
4. Ist es möglich durch eine Vorbehandlung von Leberspender und -empfänger mit EPO den an Hand der Leberenzyme gemessenen Leberzellschaden zu verringern?
5. Wird durch eine Vorbehandlung mit EPO die Expression proinflammatorischer Zytokine nach Transplantation verringert und wenn ja zu welchen Zeitpunkten ist dies der Fall?

3 Material und Methoden

3.1 Experimenteller Plan

Es wurden insgesamt 39 orthotope Lebertransplantationen bei Wistar Ratten mit einer Kaltischämiezeit von 18 Stunden durchgeführt. Dabei wurden in der Behandlungsgruppe die Spendertiere eine halbe Stunde vor Explantation und die Empfängertiere direkt nach Implantation mit jeweils 1000 IE Erythropoietin intraportal behandelt. Es wurden vier Gruppen gebildet mit Tötungszeitpunkten 4,5, 24 und 48 Stunden sowie sieben Tage postoperativ. In der ersten Gruppe wurde zusätzlich zwei Stunden postoperativ eine Resektion des Lobus triangulatus zur histologischen und molekularbiologischen Aufbereitung entnommen. In allen Gruppen wurden zum Tötungszeitpunkt Blut und Gewebeproben von der Leber entnommen. Die Vergleichsgruppe erfuhr abgesehen von der Erythropoietingabe das gleiche Procedere.

3.1.1 Behandlungsgruppe (EPO-Gruppe)

Hier wurden die Spendertiere eine halbe Stunde vor Explantation und die Empfängertiere direkt nach Transplantation mit je 1000 IE Erythropoietin intraportal behandelt. Die Kaltischämiezeit betrug 18 Stunden. Die Tötungszeitpunkte waren 4,5, 24 und 48 Stunden sowie sieben Tage nach Transplantation. In der ersten Gruppe wurde nach zwei Stunden eine Leberresektion durchgeführt. Eine halbe Stunde zuvor erhielten diese Tiere den Hypoxyprobe™ - Marker (NPI Inc., Burlington, USA) intravenös.

Tabelle 1: Versuchsplan Behandlungsgruppe

	Spender	Empfänger	Gewebeprobe	Tötungszeitpunkt	n
1.1	1000 IE Epo	1000 IE EPO	2h	4,5h	6
1.2	1000 IE Epo	1000 IE EPO		24h	4
1.3	1000 IE Epo	1000 IE EPO		48h	4
1.4	1000 IE Epo	1000 IE EPO		7d	5

3.1.2 Vergleichsgruppe

Diese Tiere erhielten kein Erythropoietin, das übrige Procedere glich dem der Versuchsgruppe.

Tabelle 2: Versuchsplan Vergleichsgruppe

	Spender	Empfänger	Gewebeprobe	Tötungszeitpunkt	n
2.1			2h	4,5h	6
2.2				24h	4
2.3				48h	5
2.4				7d	5

Die behördliche Genehmigung für die Tierversuche wurde am 15.03.2007 unter dem Aktenzeichen G 0040/07 erteilt.

3.2 Chirurgische Technik der Lebertransplantation

3.2.1 Operationsvorbereitungen und Anästhesie

Sämtliche operative Eingriffe wurden unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene™, Abbott, Wiesbaden) und Distickstoffmonoxid durchgeführt. Zur Narkoseeinleitung wurden die Versuchstiere in einen Plexiglaszylinder mit Narkosegaszufuhr und Absaugung gesetzt. Anschließend wurden sie über dem gesamten Abdomen geschoren und in Rückenlage mittels an den Extremitäten befestigten Pflasterstreifen auf einem Korkbrett fixiert.

3.2.2 Spenderoperation und Hepatektomie

Alle Operationen erfolgten in sauberer nicht-steriler mikrochirurgischer Technik unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (M651™, Leica, Wetzlar) mit 6-40facher Vergrößerung und eingebauter Koaxial-Beleuchtung. Es wurden handelsübliche mikrochirurgische Instrumente verwendet. Für sämtliche Ligaturen wurde 6-0 Seide (Resorba™, Nürnberg) verwendet. Während des gesamten Eingriffs mussten alle Organe mit einer mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Kompresse bedeckt und mit großer Sorgfalt behandelt werden. Die Spenderoperation erfolgte im Wesentlichen der Originalbeschreibung von Lee [1] mit einer Modifikation der Gallengangs- [2] und Arterienpräparation. Das Abdomen wurde durch eine mediane Laparotomie von Xiphoid bis Blase eröffnet und der Zugang durch beidseits kranialateral verlaufende Schnitte bis zum Rippenbogen erweitert. Die so entstandenen Bauchwandlappen wurden mit Kanülen am Korkbrett fixiert. Das Xiphoid wurde mit einer Klemme nach kranial gezogen. Die Leber wurde vorsichtig nach kaudal gezogen und das Ligamentum falciforme bis zur suprahepatischen V. cava durchtrennt. Nach Durchtrennung der linkslateralen Ligamente der Leber wurde die subphrenische Vene unterfahren, doppelt ligiert und durchtrennt. Anschließend wurden die beiden Zentrallappen nach kranial geklappt und der obere Anteil des Lobus caudatus von Bauchfellüberzug befreit, so dass der hepatoösophageale Plexus doppelt ligiert und durchtrennt werden konnte. Nun wurde noch der untere Teil des Lobus caudatus vollständig mobilisiert. Der Darm wurde in einer feuchten Kompresse ohne Zug auf der linken Seite neben der Ratte gelagert wodurch die infrahepatische V. cava und der Leberhilus besser erreicht werden konnten. Es folgte die Befreiung der infrahepatischen

Vena cava von umgebendem Fettgewebe und die einfache Ligatur der rechten V. suprarenalis. Die Präparation des Leberhilus begann mit der doppelten Ligatur und Durchtrennung der präpylorischen Vene. An dieser Stelle wurde die V. portae unterfahren und mobilisiert. Die A. gastroduodenalis wurde doppelt ligiert und durchtrennt. Der Truncus coeliacus wurde bis zu seinem aortalen Ursprung freigelegt, die Aorta unterfahren und die Aa. gastrica sinistra und lienalis wurden identifiziert, doppelt ligiert und durchtrennt. Der Ductus choledochus wurde unter leichtem Zug an seiner Einmündung in das Pankreas inzidiert und ein etwa 6 mm langer, an beiden Seiten schräg angeschnittener Polyäthylensplint zur Hälfte in die entstandene Öffnung eingeführt und mit einer Ligatur fixiert. Der Splint wurde aus einer dünnen 22 G Venenverweilkanüle (Becton Dickinson, Heidelberg) zurechtgeschnitten. Zum Schluss wurde das dorsale Ligament der Leber zwischen der V. suprarenalis und der suprahepatischen V. cava durchtrennt und somit alle Vorbereitungen für eine Perfusion der Leber getroffen. Dazu wurde die infrahepatische V. cava inferior zunächst von rechts mit einer Mikro-Gefäßklemme nahe ihrer Einmündung in die Leber abgeklemmt. Eine gebogene Pinzette wurde am Ursprung des Truncus coeliacus unter der Aorta positioniert. Die V. portae wurde distal der Leber abgeklemmt, eröffnet, mit einer 16 G Venenverweilkanüle (Becton Dickinson, Heidelberg) kanüliert und die Leber mit insgesamt 30 ml 4°C kalter UW - Lösung über ein Infusionssystem und einen Dreiweghahn perfundiert. Nach Phrenotomie wurde die suprahepatische V. cava inferior cranial des Zwerchfells durchtrennt, um einen ungehinderten Abfluss der Perfusionslösung zu gewährleisten. Anschließend wurde der Truncus coeliacus mitsamt einem Aortenpatch abgesetzt und über eine 24 G Venenverweilkanüle (Becton Dickinson, Heidelberg) mit 1 ml 4°C kalter physiologischer NaCl - Lösung perfundiert. Um die suprahepatische V. cava für die Implantation vorzubereiten, wurde sie nun an ihrer Einmündung in das Zwerchfell abgesetzt und mit zwei Prolene™ 7-0 (Ethicon, Norderstedt) Eckfäden versehen. Daraufhin konnte die Entnahme der Leber erfolgen. Dazu wurde die Venenverweilkanüle mittels einer unter lediglich schwacher Spannung stehenden Gefäßklemme an der V. portae fixiert und mitsamt des Vierweghahns dort belassen, während die V. portae nun vollständig durchtrennt wurde. Die infrahepatische V. cava wurde mit einer beschuhten Moskitoklemme versehen und mit einem ausreichend langen Venenstumpf abgesetzt. Die V. suprarenalis wurde so abgesetzt, dass die Ligatur an ihrem leberseitigen Ende verblieb. Die Leber wurde mit Hilfe der

Moskitoklemme entnommen und in 4°C kalter UW – Lösung gelagert. Danach wurde die Moskitoklemme, die nur dem Handling diente, wieder entfernt. Die Kaltischämiezeit betrug bei allen Lebern 18 Stunden.

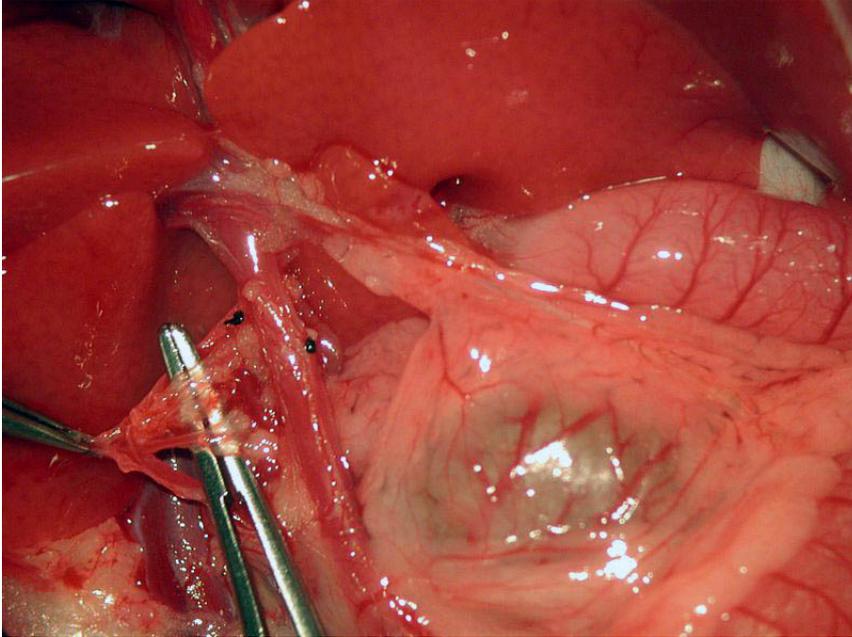


Abb. 1: Präparation der Aa. gastrica sinistra und lienalis. Rechts daneben V. cava inferior, links Pfortader und Gallengang mit umgebendem Pankreasgewebe.

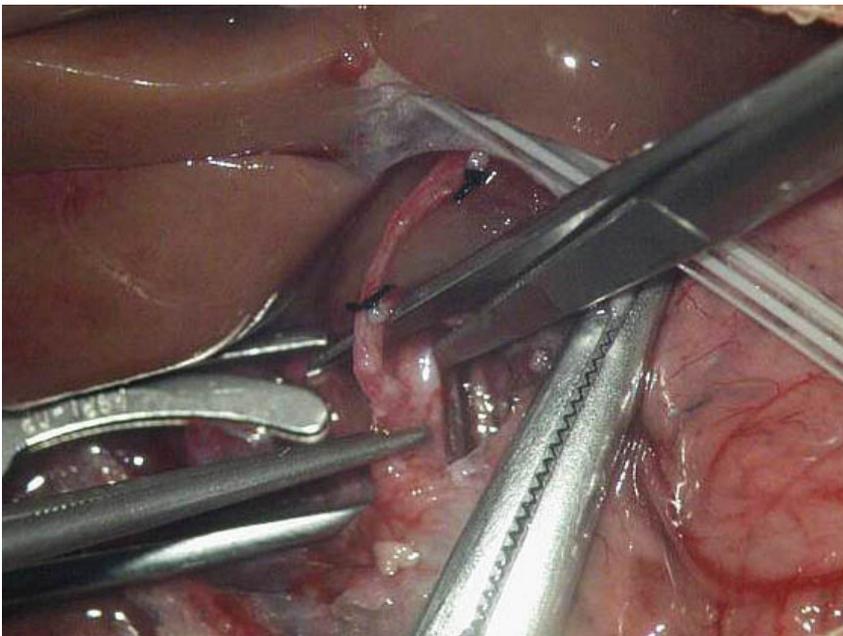


Abb. 2: Ausschneiden des Aortenpatches. Rechts ist die V. cava mit Gefäßklemmen versehen, die Pfortader ist kanüliert und die Leber homogen mit UW-Lösung perfundiert.

3.2.3 Empfängeroperation

Der Zugang beim Empfängertier erfolgte über eine mediane Laparotomie ohne laterale Erweiterung. Die Mobilisierung der Leber und die Präparation der subphrenischen Vene, des ösophagealen Plexus, der V. suprarenalis und der präpylorischen Vene glichen in wesentlichen Zügen dem Vorgehen bei der Spenderoperation. Danach wurden sowohl die A. hepatica propria als auch die A. gastroduodenalis doppelt ligiert und durchtrennt, so dass die A. hepatica communis als T-förmiger, pulsierender Stumpf stehen blieb. Die V. portae wurde bis zu ihrer Gabelung mobilisiert und der Gallengang im Leberhilus einfach ligiert und mitsamt der Ligatur abgetrennt. Somit war der Empfängersitus für das Abklemmen der Gefäße und das Herausnehmen der Leber präpariert. Die infrahepatische V. cava wurde oberhalb der rechten Nierenvene, die V. portae distal der Ligatur der präpylorischen Vene abgeklemmt. Darauf folgte die Abklemmung der suprahepatischen V. cava durch eine Satinsky-Klemme unter Mitnahme eines schmalen Zwerchfellsaums. Die Leber wurde an den entsprechenden Gefäßen lebernah herausgetrennt, die Ligatur auf der V. suprarenalis verblieb im Empfängertier. Im Situs wurde eine mit physiologischer Kochsalzlösung getränkte Kompresse platziert und die Ratte um 180 Grad gedreht, so dass ihr Kopf nun zum Operateur zeigte. Da das Tier während der anhepatischen Zeit aufgrund des stark erniedrigten Herzzeitvolumens sehr sensibel auf das Anästhetikum reagierte konnte die Narkosezufuhr stark vermindert werden ohne ein Aufwachen des Tieres zu riskieren. Das zuvor mit 30 ml 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung gespülte Transplantat wurde anatomiegerecht im Situs platziert und es wurde die Anastomose der suprahepatischen V. cava mit einer fortlaufenden mikrochirurgischen Naht durchgeführt. Nach Fertigstellung der Anastomose wurde das Tier wieder in Ausgangslage gedreht. Die beiden Gefäßenden der Pfortader wurden identifiziert und mit zwei Prolene™ 8-0 (Ethicon, Norderstedt) Eckfäden versehen. Daraufhin erfolgte die Anastomose der Pfortader in gleichartiger fortlaufender Nahttechnik. Vor Freigabe des portalen Blutstroms und vor Lösung der Satinsky Klemme wurden die Anastomosen jeweils mit körperwarmer Kochsalzlösung bedeckt, um Luftembolien zu vermeiden. Die anhepatische Zeit betrug hierbei durchschnittlich 17 Minuten und die Leber war bald wieder gleichmäßig mit Blut perfundiert. Als nächstes wurde die infrahepatische Vena cava in gleicher Weise mit 8-0 Prolene™ (Ethicon, Norderstedt) anastomosiert. Sobald

der Blutstrom aus der unteren Körperhälfte wieder freigegeben war, erhöhte sich das Herzzeitvolumen und die Eingeweide wurden wieder deutlich besser perfundiert. Nun folgte der arterielle Wiederanschluss. Hierzu wurde die zuvor präparierte A. hepatica communis an ihrer Basis abgeklemmt, der T-förmige Stumpf eingeschnitten und ein aus einem 24 G Venenverweilkatheter (Bectom Dickinson, Heidelberg) zurechtgeschnittener Splint eingebracht und mit einer Ligatur fixiert. Daraufhin wurde der Truncus coeliacus des Transplantats mit Hilfe des Aortenpatches über den Splint gezogen und in gleicher Weise mit einer Ligatur fixiert. Nach Lösen der Gefäßklemme kam es zu deutlich sichtbarer Pulsation in der gesamten A. hepatica. Zur Anastomose des Gallengangs wurde der Gallengang des Empfängertiers distal eingeschnitten, über den Splint im Gallengang des Transplantats gestülpt und anschließend mit zwei gegenüberliegenden 8-0 Einzelknopfnähten fixiert. Abschließend wurde das Abdomen inspiziert und mit körperwarmer Kochsalzlösung gespült. Die Nähte von Bauchwand und Haut erfolgten mit PDS II 4-0 resorbierbarem Nahtmaterial. Postoperativ wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt und nach dem Aufwachen in Einzelhaltungskäfige gesetzt. Dort hatten sie freien Zugang zu Wasser und Futter.

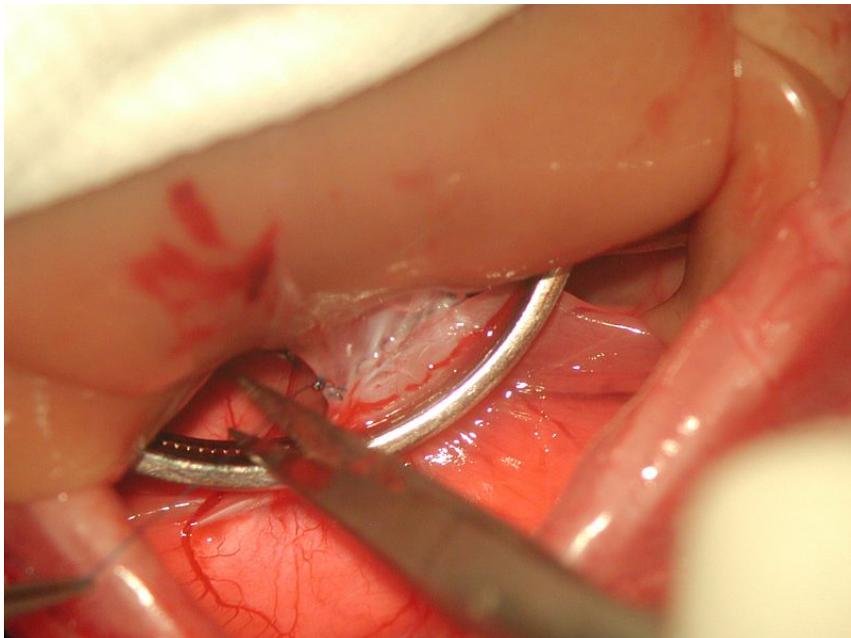


Abb. 3: Suprahepatische V. cava nach Fertigstellung der Anastomose mit 7-0 Prolene.

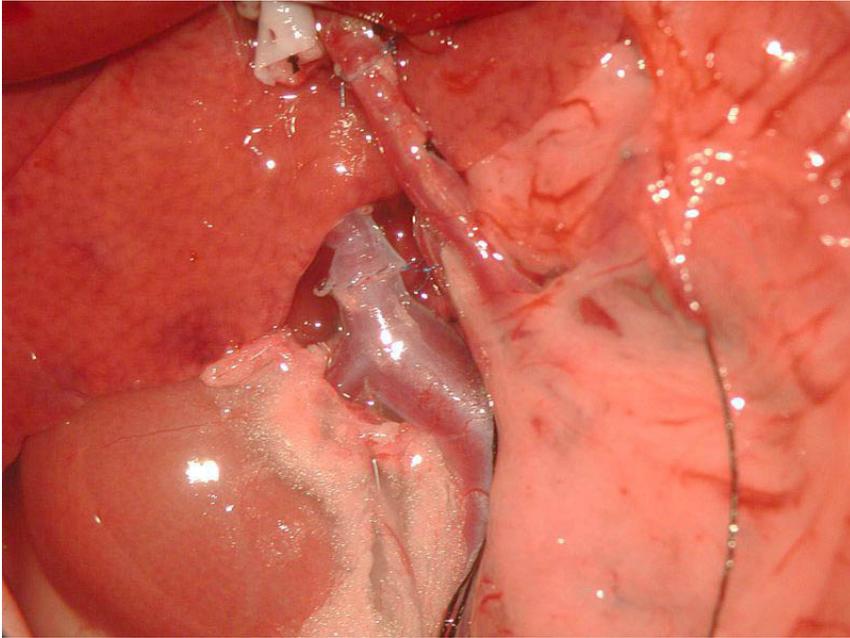


Abb. 4: Situs nach Naht der Pfortader und infrahepatischer V. cava inferior. Die Leber ist homogen perfundiert, oben im Bild der Aortenpatch vor Rekonstruktion.

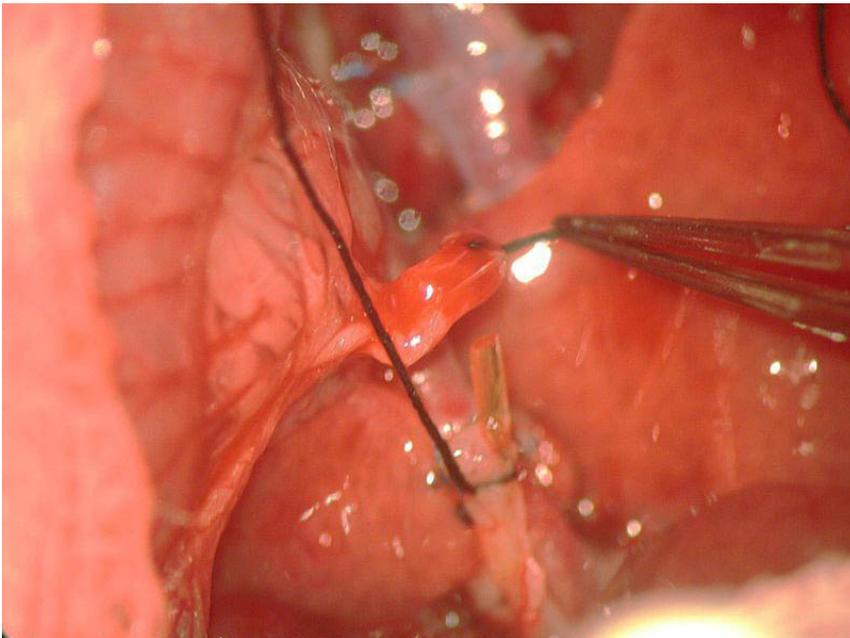


Abb. 5: Rekonstruktion des Gallengangs. Die Galleproduktion ist ein Zeichen der Funktionsaufnahme des Transplantates nach Reperfusion.

3.3 Tierwahl und Tierhaltung

Für alle Versuche wurden männliche, rückgezüchtete Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 300 Gramm und einem Alter von 8-14 Wochen verwendet. Bei diesen Tieren treten keine transplantationsimmunologischen Vorgänge auf. Sie wurden frei von spezifischen Pathogenen von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland, geliefert und in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum, gehalten. Bis zur Operation wurde jeweils eine Akklimatisierungsphase von mindestens einer Woche eingehalten, wobei die Tiere jederzeit freien Zugang zu Wasser und Standardnagerfutter hatten.

3.4 Perfusions-, Konservierungs- und Reperfusionlösungen

University of Wisconsin Lösung (Viaspan™, DuPont Pharma, Wilmington, USA)
1000 ml enthalten:

Tabelle 3: Inhaltsstoffe von 1000 ml University of Wisconsin Lösung

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

Natriumchlorid 0,9% (Isotonische Kochsalzlösung Fresenius, Fresenius Kabi, Bad Homburg)

1000 ml enthalten:

Tabelle 4: Inhaltsstoffe von 1000 ml NaCl 0,9%

NaCl 145 mM	9,00 g
ad ddH ₂ O	

3.5 Histologische und molekularbiologische Methoden

3.5.1 Probengewinnung

Für die feingewebliche Aufarbeitung von Gewebeproben der Tiere wurden an den entsprechenden postoperativen Tagen nach Ausbluten der Tiere Proben von Leber und

Lunge in einem standardisierten Verfahren entnommen und in Formalin (10%, wässrig, gepuffert) fixiert. Der Rest des Materials wurde sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Das Ausbluten der Tiere erfolgte in Narkose mit einem Katheter (Terumo 24 G) in der infrarenalen Aorta.

3.5.2 Isolierung von RNA und Protein

3.5.2.1 Materialien

Verbindung	Hersteller
5x Reaktionspuffer für reverse Transkription	Peqlab, Erlangen
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)-Lösung	Biorad, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck
Coomassie-Lösung; G-250, Bio-Soft™	Biorad
Desoxynukleotidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); Lösungen: 100 mmol/L	Promega, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat, Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Promega
Dulbeccos Modified Eagle Medium mit 862 mg/L L-Alanyl-Glutamin und 110 mg/L Na-Pyruvat (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure (HOAc); Eisessig	Merck
Ethanol; 70%, vergällt	Merck
Ethanol; absolut	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Fötale Kälberserum (FKS)	Invitrogen

Gentamycin	Ratiopharm, Ulm
Glycerol	Sigma
Glycin	Sigma
Glycogen	Peqlab
Isopropanol	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
L-Ascorbinsäure	Sigma
Light Cycler Hybridisation- Probe Fast Start-Kit	Roche, Mannheim
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Promega
Methyl-[³ H]-Thymidindesoxyribonukleotid ([³ H]-Thymidin)	Amersham, Little Chalfont, UK
Molekulargewichts(M _r)-Standard für Proteine; Tricom	Pierce, Bonn
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma
Pepsin	Sigma
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , pH 7,2 (PBS)	Biochrom, Berlin
Reverse Transkriptase; ImProm-II™	Promega
RNA-Extraktionsreagenz; RNAPure	Peqlab
RNase-Inhibitor; RNAsin	Promega
Salzsäure (HCl)	Merck
<i>Transforming Growth Factor</i> (TGF)-β 1; recombinant, human	Biomol, Hamburg

Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Trishydroxyethylaminomethan (Tris)	Sigma
Triton-X100	Sigma
Trypanblau (0,05%)-Lösung	Biochrom
Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%), sterile Lösung in PBS	Biochrom

3.5.2.2 Durchführung

Für die Präparation der Gesamt-RNA aus Zellen wird eine Lösung, die Guanidinisothiocyanat und Phenol enthält (RNApure), verwendet. Guanidinisothiocyanat besitzt chaotrope Eigenschaften und denaturiert wie Phenol Proteine. Durch Zugabe von Chloroform erhält man ein Dreiphasen-Gemisch. In der oberen, wässrigen Phase liegt die RNA gelöst vor und kann mit Isopropanol daraus gefällt werden. Die Interphase und die untere organische Phase enthalten die Proteine und die DNA aus den Zellen.

Für die Echtzeit-PCR wurden jeweils 5×10^4 Zellen mit 3,2 mL Standardmedium in die Vertiefungen einer 6-Lochplatte ausgesät. Zur Unterstützung der Zelladhäsion wurden die Zellen bei 800 U/min 10 min zentrifugiert und danach 24 h im Brutschrank angezüchtet. Anschließend wurde das Medium vorsichtig abgegossen und die Zellenrasen zweimal mit je 3 mL Grundmedium gewaschen. Danach wurde in jede Vertiefung 3,2 mL Reduktionsmedium hineinpipettiert. Nach 24 h wurde das Reduktionsmedium abgenommen, vollständig durch Reduktionsmedium mit KVI-F oder mit TGF- β ersetzt und die Zellen wurden für weitere 24 h inkubiert. Für die Arbeiten mit freier RNA und DNA wurde ausschließlich Wasser verwendet, das mit DEPC behandelt war. Dazu wurden 500 mL *Aqua bidest.* mit 250 μ L DEPC versetzt und 24 h bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das DEPC wurde durch Autoklavieren (25 min, 121°C, 1 atm) zerstört.

Die Zellen aus der Kultur in den Vertiefungen einer 6-Loch-Platte wurden direkt mit je 1 mL der Guanidinisothiocyanat-Phenol-Lösung lysiert und mit 200 μ L Chloroform versetzt. Die Lysate wurden in ein Reaktionsgefäß überführt mit der Hand kräftig geschüttelt und 10 min bei 12.000 U/min zentrifugiert. Diese Bedingungen galten auch für alle weiteren Zentrifugationsschritte. Die obere Phase wurde vorsichtig mit

abpipettiert in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µL Isopropanol und 2 µL Glycogen versetzt. Nach 1 h bei -20 °C wurden die Ansätze zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Präzipitat zweimal mit 1 mL 75% Ethanol (unvergällt) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet und in 20 µL DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

3.5.2.3 *Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration*

Für die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der RNA wurden die Absorptionen der RNA-Präparation bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm, den Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren und Proteinen bzw. Phenol, ermittelt. Da die genauen Sequenzen der RNA unbekannt sind und eine große Vielfalt der Moleküle vorliegt, wird für die Konzentrationsbestimmung ein Näherungswert verwendet. Dabei entspricht eine Absorption von „1“ bei 260 nm einer Konzentration von 40 µg/mL einzelsträngiger RNA. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm macht eine Aussage über die Reinheit der RNA-Präparation. Dabei sollte der Wert zwischen 1,8 und 2 liegen. Niedrige Verhältniswerte weisen auf eine Kontamination durch Proteine oder Phenol hin.

Für die photometrische Bestimmung wurden 4 µL RNA-Lösung mit 96 µL DEPC-behandeltem Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette überführt und die Absorptionen bei 260 nm und 280 nm wurden im Vergleich zu DEPC-behandeltem Wasser gemessen.

3.5.2.4 *Reverse Transkription*

Mit Hilfe der reversen Transkription wird die isolierte mRNA in die korrespondierende cDNA umgeschrieben. Für die Erststrangsynthese wurden 1 µg Gesamt-RNA mit 0,5 µL 500 µmol/L Oligo dT-Primer und 0,5 µL 200 µmol/L Random Hexamer Primer in einem Reaktionsgefäß gemischt und das Volumen mit DEPC-behandeltem Wasser auf 9,6 µL aufgefüllt. Die Lösung wurde im Thermocycler 10 min bei 70°C denaturiert und danach auf Eis abgekühlt um ein Renaturieren zu verhindern. Anschließend erhielt jeder Reaktionsansatz 4 µL 5x Reaktionspuffer für die reverse Transkription, 2 µL MgCl₂-Lösung, 1 µL einer Mischung mit je 10 mmol/L dATP, dTTP, dCTP, dGTP, 1 µL RNAsin, 1 µL 0,1 mol/L DTT und 1 µL Reverse Transkriptase. Im Thermocycler erfolgte die

Anlagerung der Primer an den RNA-Strang für 10 min bei 25°C und anschließend die reverse Transkription für 1 h bei 42°C. Abschließend wurde das Enzym durch Erhitzen für 15 min auf 70°C inaktiviert. Die Reaktionsansätze wurden unmittelbar nach der reversen Transkription in die PCR-Reaktion überführt oder wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.5.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

3.5.3.1 Primer

Es wurden die QuantiTect Primer Assays Rn_II1b_1_SG und Rn_II6_1_RG von der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Wir wurden gebeten, die Sequenzen nicht anzugeben.

3.5.3.2 Durchführung der RT-PCR

Die PCR ist eine Methode zur Vervielfältigung (Amplifizierung) von DNA bei der mit einer Polymerase eine Sequenz amplifiziert wird, die zwischen zwei Regionen bekannter Basensequenz liegt. An diese Regionen binden spezifisch komplementäre Oligonucleotide, die der DNA-Polymerase als Startsequenz dienen und deshalb auch Primer genannt werden. Die Primer binden an den vorher aufgetrennten Doppelstrang an den Sense-Strang und an den komplementären Antisense-Strang. Ausgehend von den 3'-OH-Enden der Primer synthetisiert die DNA-Polymerase den neuen Strang nur vom 5'- zum 3'-Ende. Die wiederholte Abfolge des Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges (Denaturierung), der Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen (Annealing) und die Synthese des neuen, komplementären Stranges (Elongation) wird als Zyklus bezeichnet. Dabei dienen die neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrize für den nächsten Amplifikationsschritt. Man könnte theoretisch ausgehend von einem DNA-Molekül nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen (n) eine Anzahl von 2^n Molekülen produzieren. Für die heute gebräuchlich PCR wird eine DNA-Polymerase verwendet, die ursprünglich aus dem Eubakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) isoliert wurde und durch ihre Thermostabilität das strenge Temperaturregime ohne Verlust ihrer enzymatischen Aktivität toleriert.

Bei der LightCycler-Echtzeit-PCR nach der Taqman-Methode wird zusätzlich zu den beiden endständigen Primern für die Amplifikation ein drittes Oligonukleotid eingesetzt, das an eine Sequenz zwischen diesen beiden Primern bindet. Wird die

fluoreszenzmarkierte Sonde durch die Exonuklease der *Taq*-Polymerase bei der Elongation abgebaut, gehen die Nukleotide in Lösung und eine für den Reporter typische Emission kann gemessen werden. Die Analyse erfolgt über den so genannten *Cycle Threshold* (CT-Wert). Der CT-Wert ist dann diejenige Zyklenzahl, bei der zum ersten Mal das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes über der Basislinie der Fluoreszenz erscheint.

Für die RT-PCR wurde für jeden Reaktionsansatz jeweils 1 µL der cDNA aus dem Ansatz der reversen Transkription und 9 µL eines Gemisches aus 6,5 µL DEPC-behandeltem Wasser, 1,2 µL MgCl₂-Lösung und 1 µL Primer-Sonden-Mix (0,5 µmol/L Primer, 0,125 µmol/L Sonde) in spezielle Glaskapillaren pipettiert. Die Kapillaren wurden verschlossen und anzentrifugiert (3000 U/min, 1 s). Die quantitative PCR wurde mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Tabelle 5: Prozessparameter für die Echtzeit-PCR. Die aufgeführte Haltezeit ist der Zeitraum die bis zur nächsten Änderung der Temperatur beibehalten wurde. Alle Temperaturen wurden mit einer Steilheit von 20°C/sec geändert.

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

3.5.4 Histologische Techniken

3.5.4.1 Hämatoxilin-Eosin (H.E.) – Färbung

Zur Untersuchung der morphologischen Organschäden wurden aus der in Formalin fixierten Leber Gewebeblöcke entnommen. Diese wurden in einen Paraffinblock eingebettet, mit dem Mikrotom in Schichten von 5 µm geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Es wurden Eosin und Hämatoxilin von der Firma Sigma, Steinheim (HAT 110232 bzw. HH S32) verwendet, EtOH stammt von der Firma Herbeta, Berlin (200-578-5).

Tabelle 6: Technik der HE-Färbung: Arbeitsschritte und Zeitdauer

Paraclear	2 x 15 min
EtOH 100%	2 x 2 min
EtOH 96%	2 min
EtOH 80%	2 min
EtOH 70%	2 min
Aqua dest.	Kurz spülen
Harris Hämatoxin	20 min (auf dem Schüttler)
Leitungswasser, handwarm, fließend	3 min
Eosin (wässrig) plus 100 µl Eisessig	1-2 min, von Hand etwas schütteln
Aqua dest.	Kurz spülen
EtOH 80%	1 min
EtOH 96%	2 min
EtOH 100%	2 x 2 min
Paraclear	2 x 15 min

3.5.4.2 Periodic-Acid-Schiff (PAS)-Färbung

Die PAS Färbung ist eine der meist verwendeten chemischen Methoden in der Histologie. Bei der PAS-Färbung wird das Material mit Periodsäure behandelt, dabei werden die 1,2-Glykole zu Aldehydgruppen oxidiert. Die Aldehyde geben mit Schiffs Reagenz eine leuchtend rote Farbreaktion. Die PAS-Färbung gibt mit unsubstituierten Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden, Mukoproteinen und Glykoproteinen, Glykolipiden und Phospholipiden eine spezifische Farbreaktion. Für die PAS-Färbung wurde das PAS-Färbekit der Firma Merck, Darmstadt verwendet (Art. 1.01646).

Tabelle 7: Bestandteile des PAS-Färbekits

Periodsäure 0,5%, wäßrig	500 ml
Schiffs Reagenz	500 ml

Tabelle 8: Arbeitsschritte und Zeitdauer der Färbeschritte der PAS-Färbung

Schnitte in typischer Weise entparaffinieren und rehydratisieren	
Spülen in Aqua dest.	
Periodsäure	5 min
Leitungswasser, fließend	3 min
Spülen in Aqua dest.	
Schiffs Reagenz	15 min
Leitungswasser, fließend	3 min
Spülen in Aqua dest.	
Hämatoxylin Lösung modifiziert nach Gill III	2 min
Leitungswasser, fließend	3 min
Aufsteigende Alkoholreihe, 2 x Xylol	
Eindecken mit Entellan® Neu	

3.5.4.3 TUNEL – Technik

Diese Technik erlaubt durch die Detektion und Markierung von freien 3'-OH-Enden den Nachweis von Strangbrüchen in der genomischen DNA. Diese Strangbrüche sind typisch für apoptotische Zellen. Eingesetzt wurde das „In Situ Apoptosis Detection Kit

TACS TdT DAB“ (R&D Systems, TA 4625, MN, USA). Kryostatschnitte der Leber mit einer Dicke von 5 µm wurden 2 Stunden bei 37° Celsius getrocknet und dann mit Formaldehydlösung fixiert. Um die DNA-Fragmente den Reaktionsenzymen zugänglich zu machen, erfolgte die Permeabilisation durch 15-minütigen Proteinase K-Verdau. Anschließend wurde durch die 5-minütige Anwendung einer hydrogenperoxidhaltigen Quencher-Solution die endogene Peroxidase-Aktivität blockiert. Auf die eigentliche Labeling-Reaktion wurden die Schnitte dann noch 5 Minuten mit TdT-Labeling-Puffer vorbereitet. Beim Labeling werden biotinilierte Nukleotide an die freien 3'-OH Enden der DNA-Strangbrüche mittels terminaler Desoxynukleotidtransferase (TdT-dNTP) gebunden. Dazu wurden die Schnitte mit dem Labeling Reaction Mix bei 37°C eine Stunde lang im Brutschrank aufbewahrt. Zum Stoppen der Reaktion diente das 5-minütige Eintauchen der Schnitte in den TdT Stopp-Puffer. Die biotinilierten Nukleotide wurden dann über eine Zeit von 10 Minuten mit Streptavidin-Peroxidase Konjugaten identifiziert, woran in der anschließenden Färbereaktion der Farbstoff Diaminobenzidin (DAB) andocken konnte. Die Einwirkzeit der DAB-Working-Solution betrug etwa 2 Minuten. Darauf folgte die Gegenfärbung durch 12-sekündiges Eintauchen der Schnitte in Methylgrün Lösung.

3.5.4.4 Immunhistochemische Färbung nach der Labeled-Streptavidin-Biotin (LSAB)

Methode

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen lassen sich je nach verwendetem Antikörper entsprechende Zelloberflächenantigene detektieren. Bei der hier verwendeten LSAB Methode wird neben dem spezifischen Antikörper ein biotinylierter Brückenantikörper und Peroxidase-konjugiertes Streptavidin eingesetzt, welches letztendlich wieder zur Sichtbarmachung mit DAB gefärbt und mit Hematoxylin gegengefärbt wird.

Zur Vorbereitung auf die Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert wonach die endogene Peroxidase-Aktivität mit Hilfe einer wasserstoffperoxidhaltigen Lösung blockiert wurde. Vor Hinzugabe des Antikörpers wurden die Schnitte zur Antigendemaskierung 20 Minuten lang in Citratpuffer gekocht. Zusätzlich wurde eine Protein Blocking Solution zur Verhinderung unspezifischer Bindungen aufgetragen. Nun erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem gewünschten Antikörper und anschließend die 15- bis 30-minütige Inkubation mit dem biotinylierten

Brückenantikörper welcher dann über den gleichen Zeitraum mittels Streptavidinperoxidase indentifiziert wurde. Färbung und Gegenfärbung erfolgten mit DAB bzw. Hematoxylin.

3.5.4.4.1 Verwendeter Antikörper

Tabelle 9: Antikörper für immunhistochemische Färbung

Name	Firma
Hypoxyprobe™-1	Chemicon International, Temecula, CA

3.5.4.5 *Leberzellschaden*

Das Ausmaß des Leberzellschadens wurde 4,5, 24 und 48 Stunden sowie 7 Tage nach Transplantation durch spektrometrische Messung von ALT, AST, LDH und GLDH ermittelt.

3.5.4.6 *Statistik*

Die Ergebnisse der Leberenzym- und der Interleukinmessung wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Nach Varianzanalyse mit dem Levene`s Test wurden die Gruppenunterschiede mit dem T-Test für unabhängige Stichproben überprüft. Statistische Signifikanz wurde für p-Werte kleiner 0,05 akzeptiert. Alle statistischen Analysen und graphische Darstellungen wurden mit der SPSS Software (SPSS 16.0.1, SPSS Inc., USA) durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Überleben

Es gab keine Unterschiede in den Überlebendanzahlen der Tiere. In beiden Gruppen konnten alle Tiere zu den vorgesehenen Zeitpunkten getötet werden.

4.2 Leberenzyme

4,5 Stunden nach Transplantation waren sämtliche Leberenzyme deutlich erhöht und fielen mit der Zeit kontinuierlich ab, um sich nach sieben Tagen wieder im Normbereich zu befinden. Alle gemessenen Leberenzyme waren 4,5, 24 und 48 Stunden nach Transplantation in der Behandlungsgruppe deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, wobei statistische Signifikanz nur für LDH nach 24 und für ALT nach 48 Stunden erreicht wurde (p jeweils $< 0,05$).

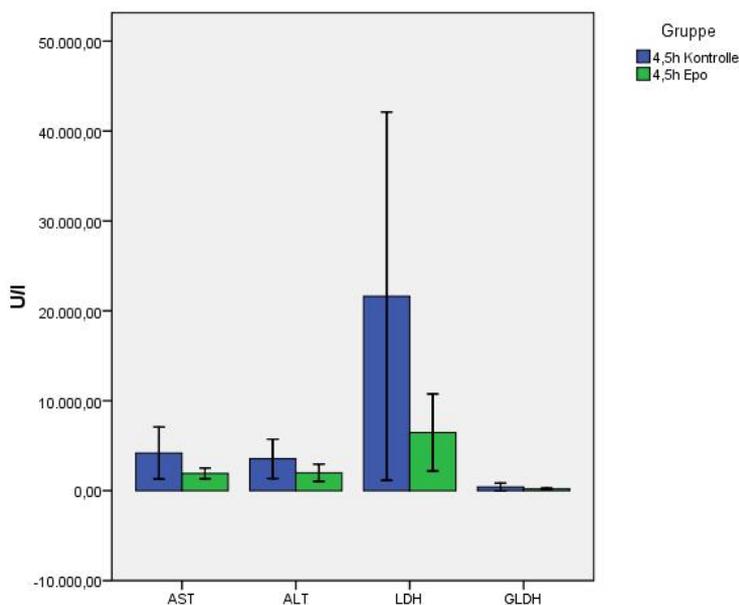


Abb. 6: Plasmaaktivitäten von AST, ALT, LDH, GLDH 4,5h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie. Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung. Epo-Gruppe mit intraportaler Erythropoietininjektion. Daten angegeben mit Mittelwert +/- Standardabweichung, n=6

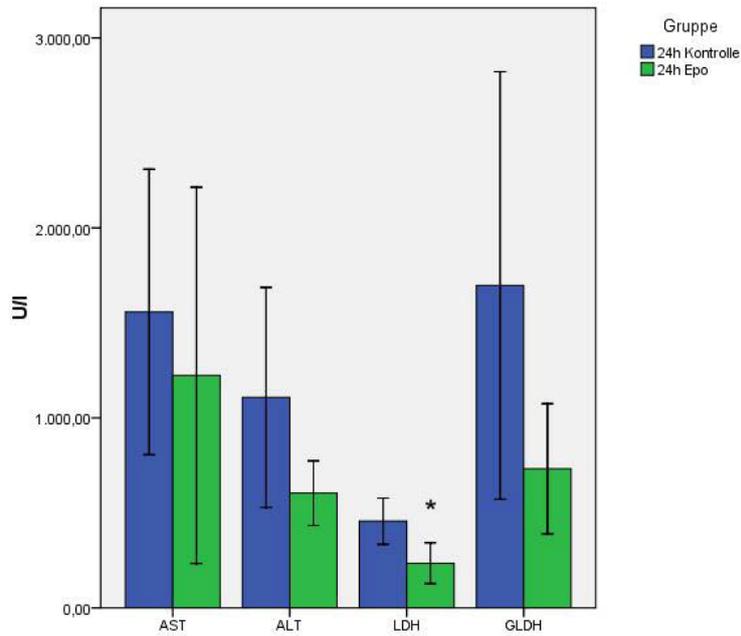


Abb. 7: Plasmaaktivitäten von AST, ALT, LDH, GLDH 24 h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie. Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung. Epo-Gruppe mit intraportaler Erythropoietininjektion. Daten angegeben mit Mittelwert +/- Standardabweichung. * $p < 0,05$ vs Kontrolle LDH; $n = 4$

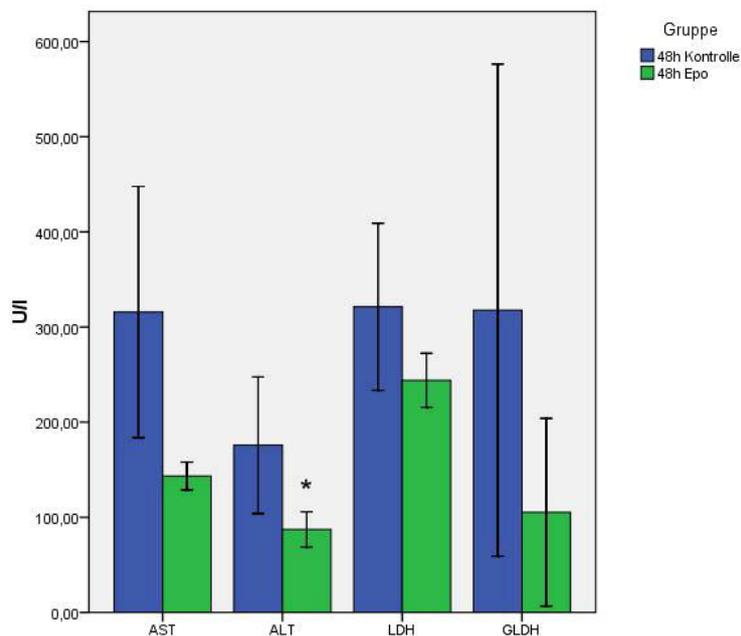


Abb. 8: Plasmaaktivitäten von AST, ALT, LDH, GLDH 48 h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie. Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung. Epo-Gruppe mit intraportaler Erythropoietininjektion. Daten angegeben mit Mittelwert +/- Standardabweichung. * $p < 0,05$ vs Kontrolle ALT; $n = 5$ (4)

4.3 TUNEL Färbung

Die TUNEL Färbung zeigte eine Reduzierung der Apoptoserate in der Behandlungsgruppe sowohl 2 als auch 4,5 Stunden nach Transplantation. Die Apoptoserate konnte nach 2 Stunden in der Behandlungsgruppe auf 2,9% von 4,3% in der Kontrollgruppe gesenkt werden. Nach 4,5 Stunden zeigte sich immer noch eine Reduktion auf 2,6% von 4,1%. Nach 24 und 48 Stunden war die apoptotische Aktivität insgesamt weniger ausgeprägt, Unterschiede waren nur noch marginal.

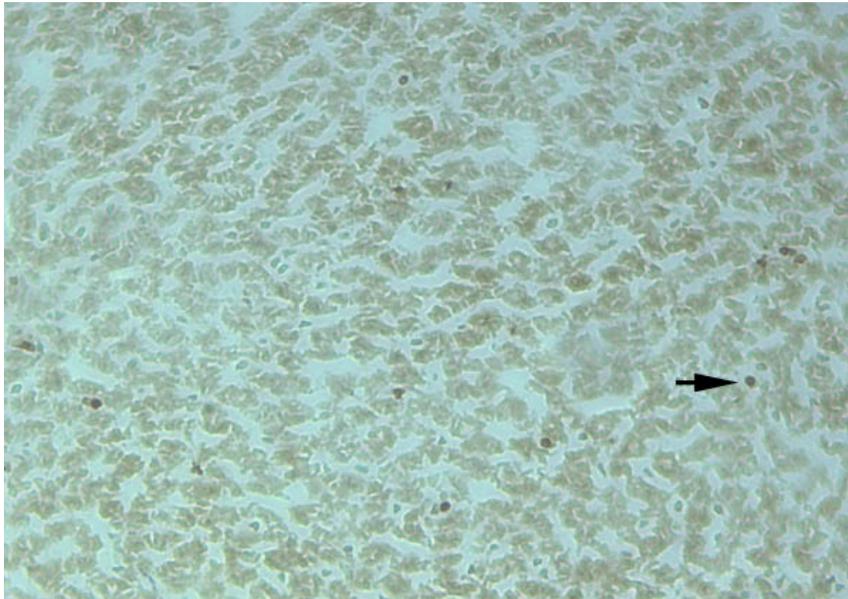


Abb. 9: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit Tunel-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie ohne Erythropoietinvorbehandlung (Kontrollgruppe), 20-fache Vergrößerung. (Pfeil: Apoptotische Zelle)

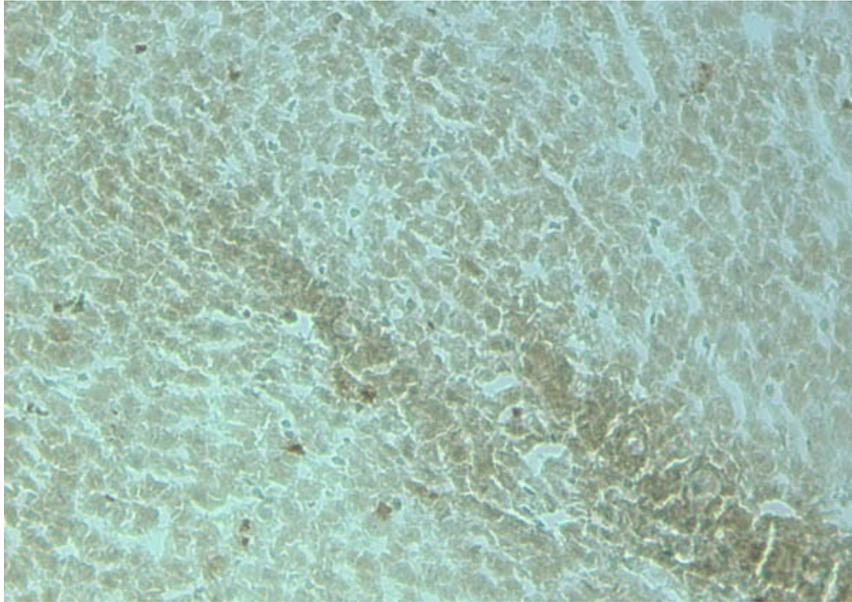


Abb. 10: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit Tunel-Färbung 4h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie ohne Erythropoietinvorbehandlung (Kontrollgruppe), 20-fache Vergrößerung

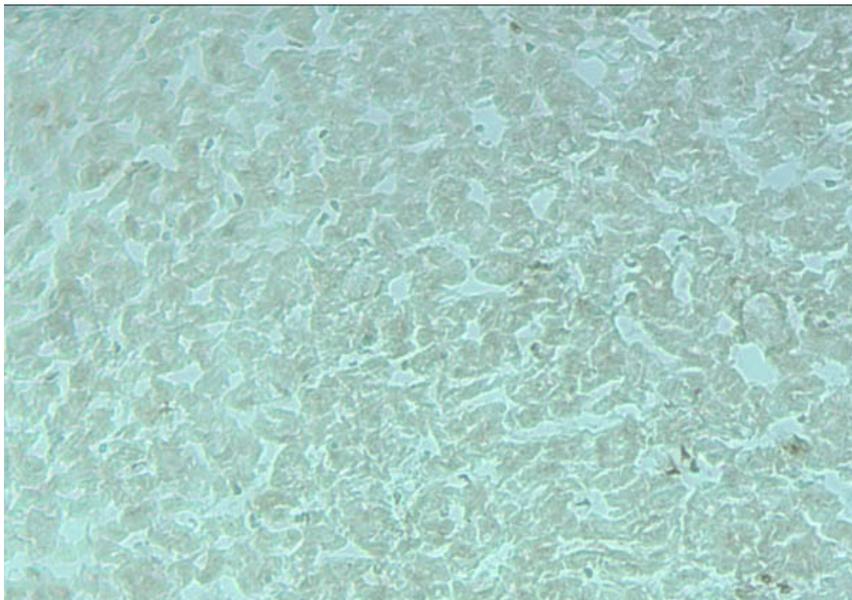


Abb. 11: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit Tunel-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie mit Erythropoietinvorbehandlung , 20-fache Vergrößerung

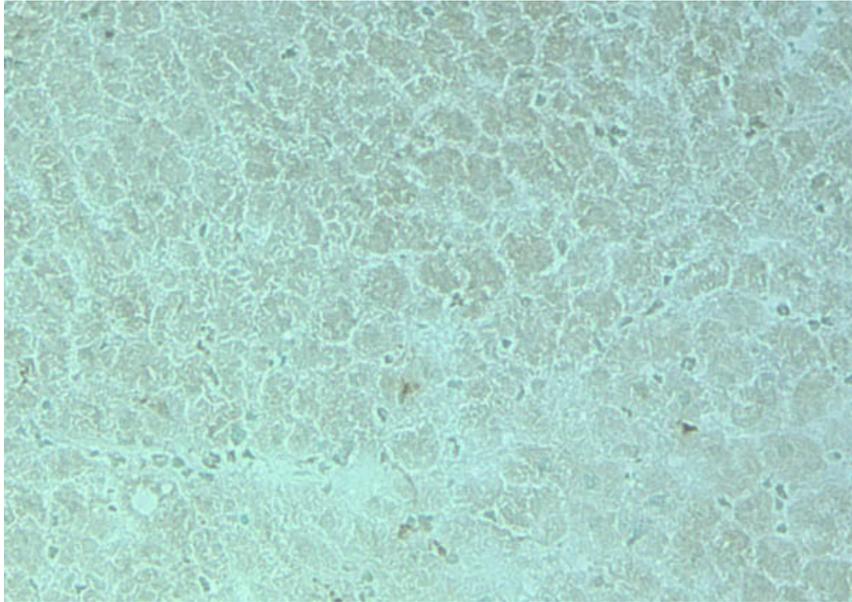


Abb. 12: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit TUNEL-Färbung 4,5h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie mit Erythropoietinvorbehandlung , 20-fache Vergrößerung

4.4 HE und PAS Färbung

In der HE und PAS Färbung zeigten sich vor allem Unterschiede in der Zahl der nekrotischen Zellen. Während in der Behandlungsgruppe 2 Stunden nach Transplantation nahezu keine nekrotischen Zellen detektierbar waren, stieg die Nekroserate in der Kontrollgruppe auf bis zu 30%. Ähnlich ausgeprägt waren die Unterschiede 4,5 Stunden nach Transplantation: In der Behandlungsgruppe sah man nur vereinzelt Nekrosen, in der Kontrollgruppe bei jedem Tier bis zu 40%.

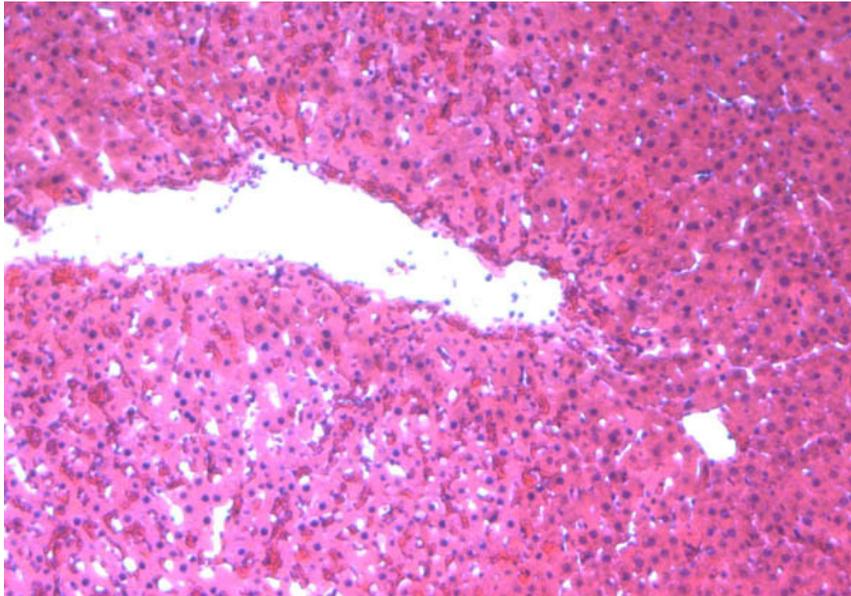


Abb. 13: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit HE-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie ohne Erythropoietinvorbehandlung (Kontrollgruppe), 20-fache Vergrößerung

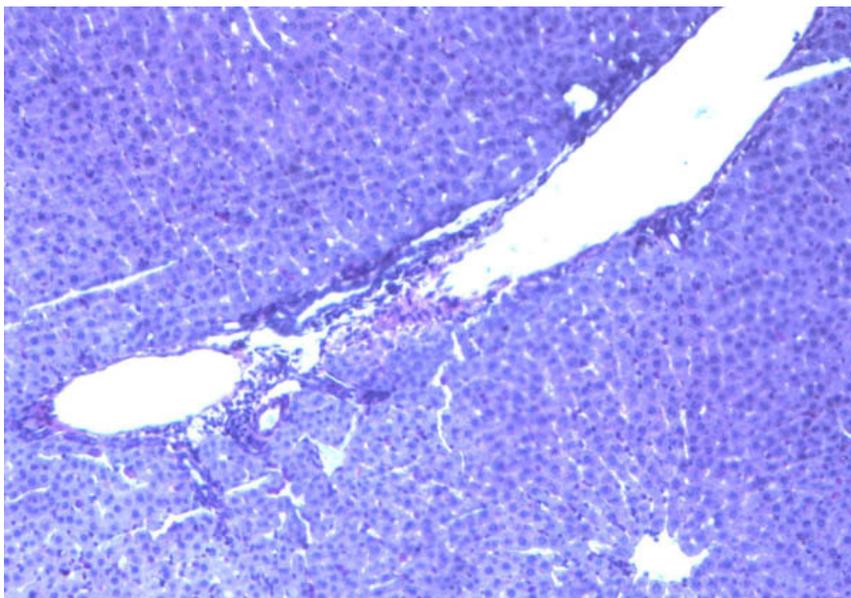


Abb. 14: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit PAS-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie ohne Erythropoietinvorbehandlung (Kontrollgruppe) , 20-fache Vergrößerung

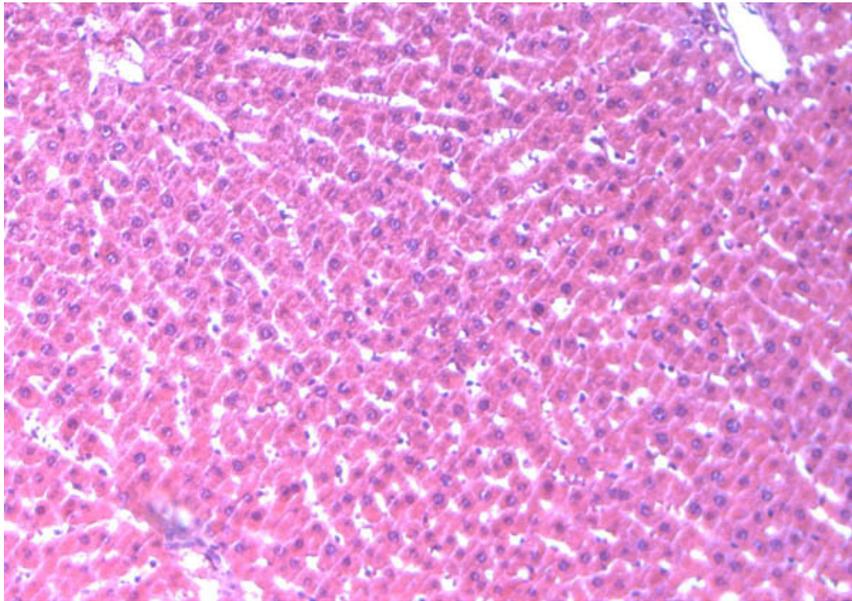


Abb. 15: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit HE-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie mit Erythropoietinvorbehandlung, 20-fache Vergrößerung

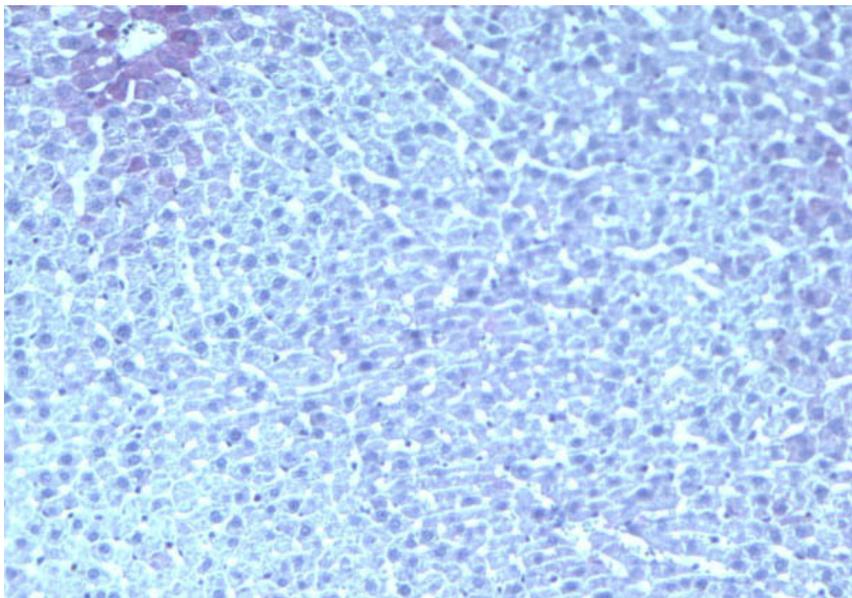


Abb. 16: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit PAS-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie mit Erythropoietinvorbehandlung, 20-fache Vergrößerung

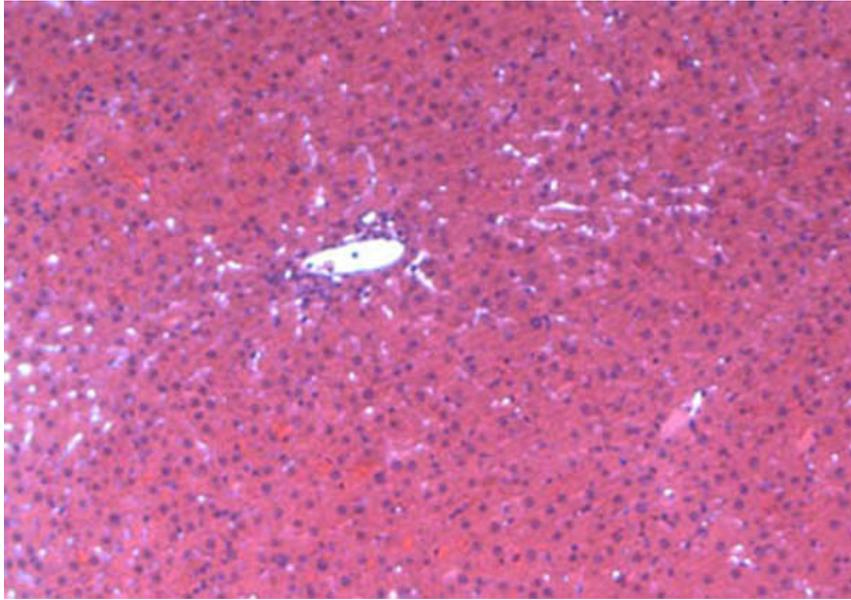


Abb. 17: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit HE-Färbung 4,5h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie ohne Erythropoietinvorbehandlung (Kontrollgruppe), 20-fache Vergrößerung

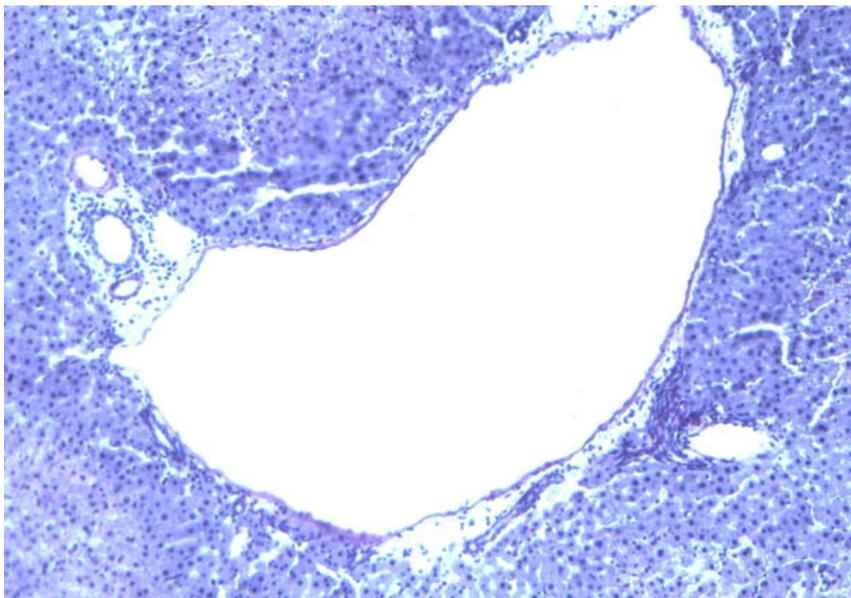


Abb. 18: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit PAS-Färbung 4,5h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie ohne Erythropoietinvorbehandlung (Kontrollgruppe) , 20-fache Vergrößerung

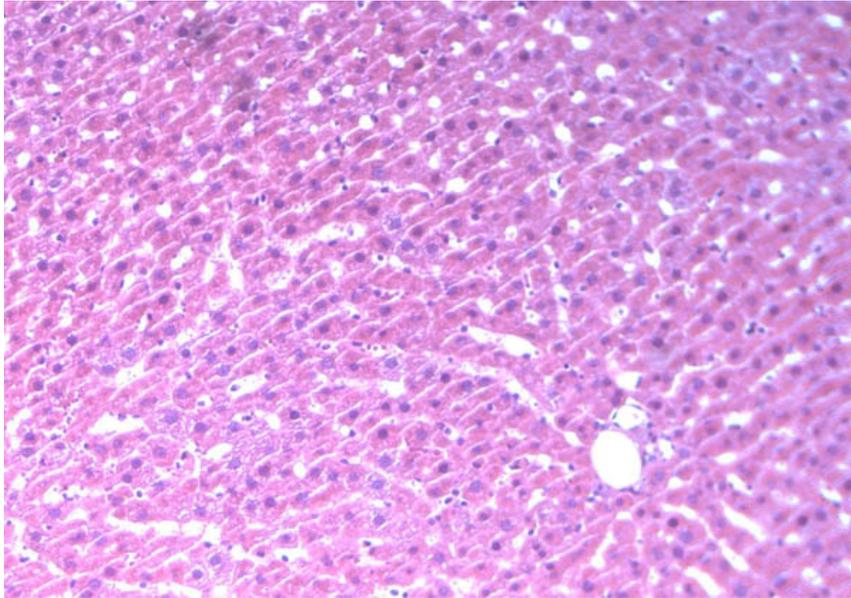


Abb. 19: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit HE-Färbung 4,5h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie mit Erythropoietinvorbehandlung, 20-fache Vergrößerung

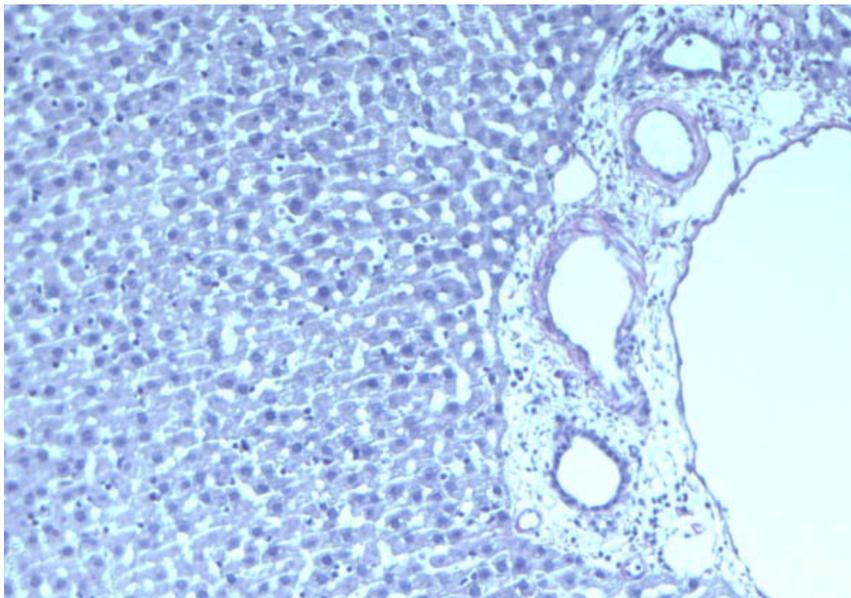


Abb. 20: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit PAS-Färbung 4,5h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie mit Erythropoietinvorbehandlung, 20-fache Vergrößerung

4.5 Immunhistochemische Färbung (Hypoxyprobe™)

Mit Hilfe des Hypoxyprobe™ Markers und einer immunhistochemischen Färbung unter Benutzung des Hypoxyprobe™-1 Antikörpers lässt sich der Sauerstoffgradient einzelner Zellen nachweisen und lichtmikroskopisch darstellen [107]. Bei der Auswertung wurden bei jedem Tier drei Gesichtsfelder ausgezählt und der Mittelwert der positiven Zellen als Prozent der Gesamtzellen dargestellt. Hier zeigte sich 2 Stunden nach Transplantation in der EPO-Gruppe eine deutlich geringere Zahl hypoxischer Zellen als in der Kontrollgruppe. Während alle Tiere der Kontrollgruppe etwa 30% hypoxische Zellen aufwiesen, hatten nur zwei der mit EPO behandelten Tiere einen so hohen Wert. Die übrigen Tiere lagen mit unter 5% beziehungsweise unter 1% hypoxischen Zellen deutlich darunter.

Tabelle 10: Auszählung der immunhistochemischen Färbung mit dem Hypoxyprobe™-1 Antikörper. Vergleichsgruppe: Tiere 1.1 bis 1.6, EPO-Gruppe: 1.7 bis 1.12. GF = Gesichtsfeld, MW = Mittelwert

Tier	MW GF	GF 1	GF 2	GF 3	MW GF	Prozent
	alle Zellen	pos. Zellen				
1.1	689	205	235	220	220	31,90%
1.2	707	198	202	179	193	27,29%
1.3	722	152	178	209	179	24,80%
1.4	707	146	187	193	175,3	24,70%
1.5	733	173	159	184	172	23,40%
1.6	727	169	160	158	162,3	22,28%
1.7	713	279	218	214	237	33,20%
1.8	701	214	206	239	219	31,30%
1.9	683	22	38	32	30,6	4,48%
1.10	714	40	37	21	32,6	4,57%
1.11	691	3	2	6	3,66	0,53%
1.12	726	1	0	8	3	0,41%

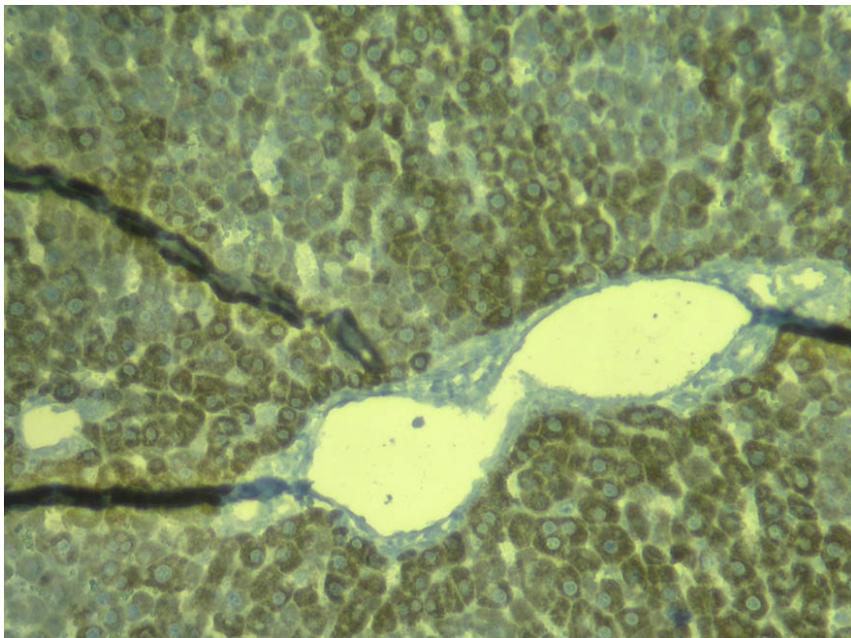


Abb. 21: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit Hypoxyprobe™-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie ohne Erythropoietinvorbehandlung (Kontrollgruppe), 20-fache Vergrößerung

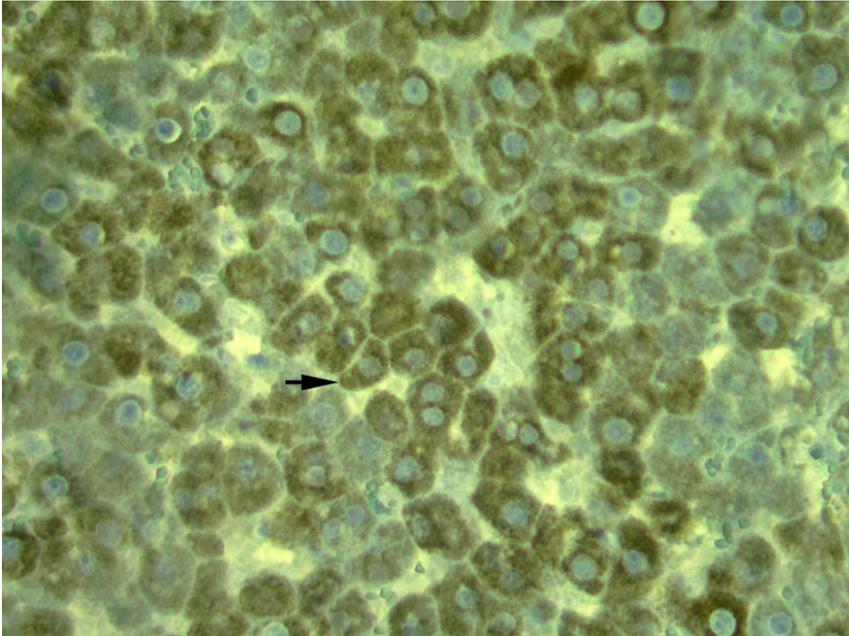


Abb. 22: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit Hypoxyprobe™-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie ohne Erythropoietinvorbehandlung (Kontrollgruppe), 40-fache Vergrößerung. (Pfeil: Hypoxische Zelle)

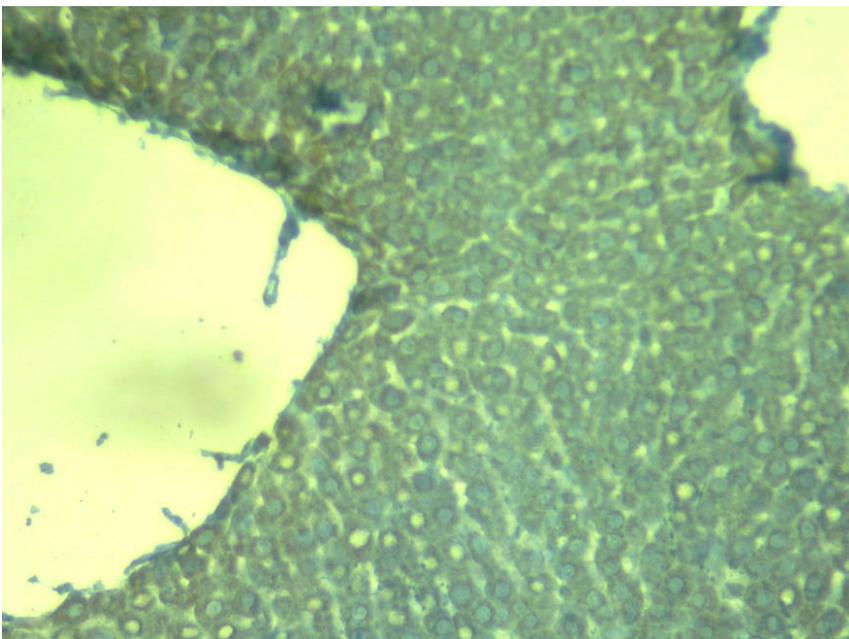


Abb. 23: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit Hypoxyprobe™-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie mit Erythropoietinvorbehandlung, 20-fache Vergrößerung. Es sind nur vereinzelt hypoxische Zellen zu sehen.

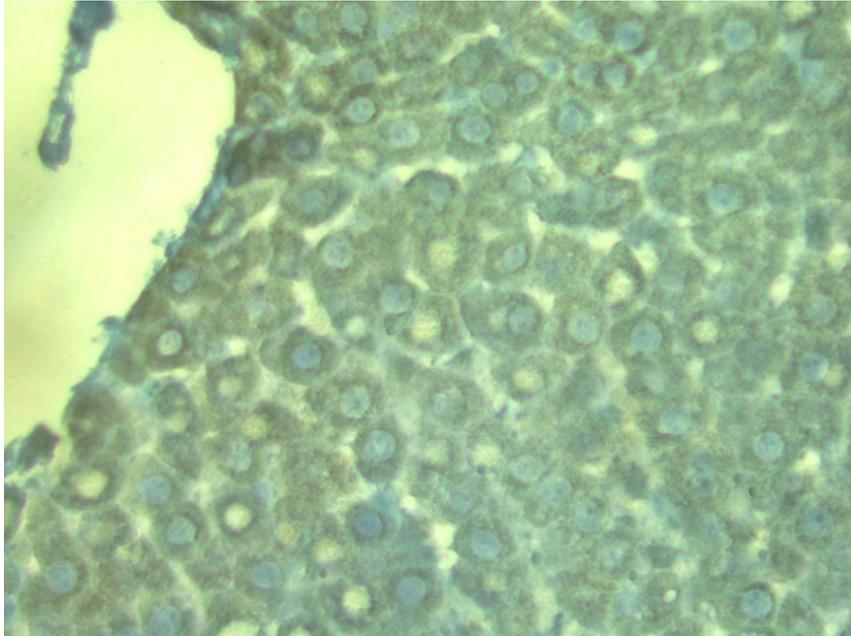


Abb. 24: Repräsentative Abbildung eines Leberschnittes mit Hypoxyprobe™-Färbung 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie mit Erythropoietinvorbehandlung, 40-fache Vergrößerung.

4.6 IL 1b mRNA Expression

IL 1b wurde mittels RT-PCR 2, 4,5, 24 und 48 Stunden nach Transplantation gemessen. Es steigt in der Kontrollgruppe 24 Stunden nach Transplantation auf seinen Höchstwert, um nach 48 Stunden wieder leicht abzufallen. In der EPO-Gruppe ist IL 1b nach 24 Stunden noch deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, es nähert sich erst nach 48 Stunden der Kontrollgruppe an. Zu allen Messzeitpunkten sind die Mittelwerte in der EPO-Gruppe deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, wobei wegen hoher Standardabweichungen bei kleinen Gruppengrößen keine statistische Signifikanz erreicht wird.

4.7 IL 6 mRNA Expression

IL 6 wurde mittels RT-PCR 2, 4,5, 24 und 48 Stunden nach Transplantation gemessen. Es steigt in beiden Gruppen 4,5 Stunden nach Transplantation auf seinen Höchstwert und fällt danach wieder ab. Die Mittelwerte sind bis zu 24 Stunden nach Transplantation in der EPO Gruppe niedriger als in der Kontrollgruppe, statistische Signifikanz wird allerdings nicht erreicht.

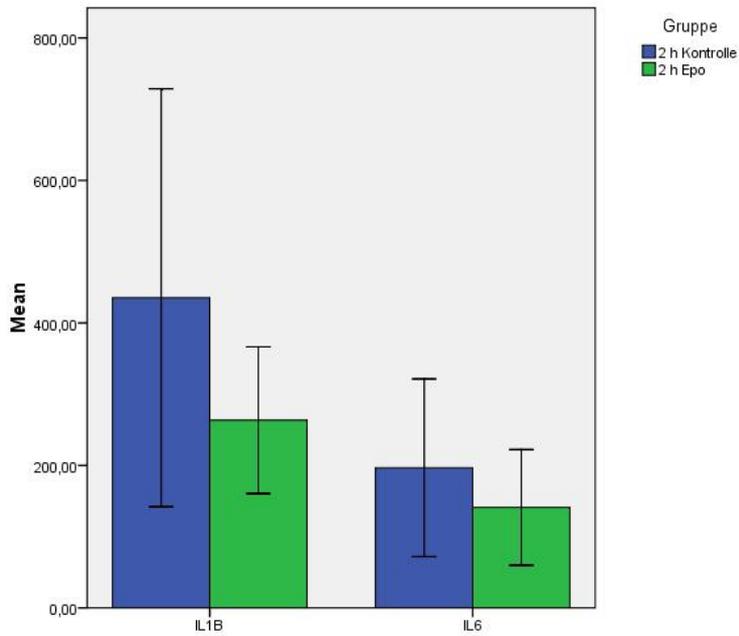


Abb. 25: Expression von IL1 β und IL6 2h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie. Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung. Epo-Gruppe mit intraportaler Erythropoietininjektion. Daten angegeben mit Mittelwert +/- Standardabweichung, n=6

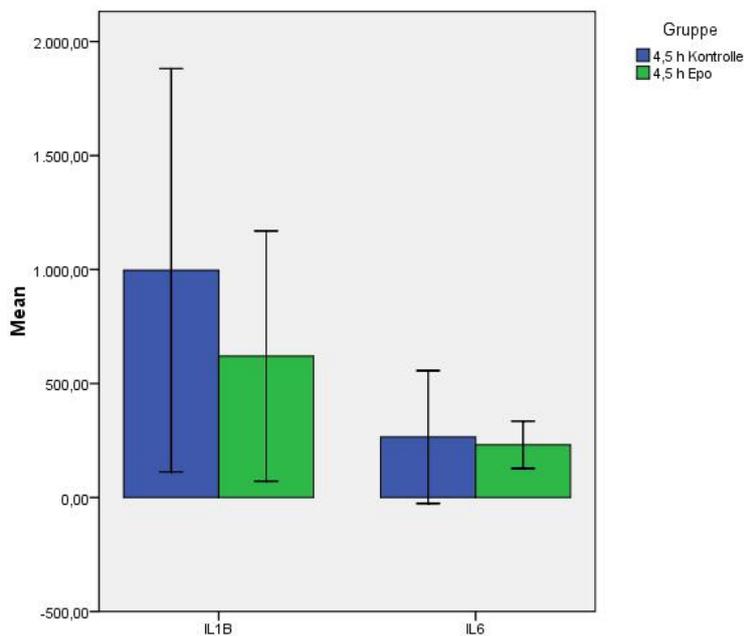


Abb. 26: Expression von IL1 β und IL6 4,5h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie. Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung. Epo-Gruppe mit intraportaler Erythropoietininjektion. Daten angegeben mit Mittelwert +/- Standardabweichung, n=6

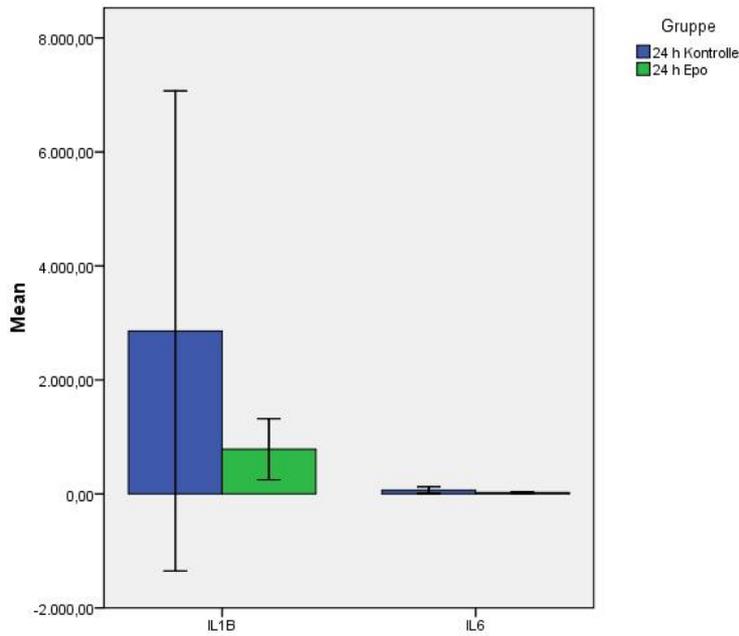


Abb. 27: Expression von IL1 β und IL6 24h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie. Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung. Epo-Gruppe mit intraportaler Erythropoietininjektion. Daten angegeben mit Mittelwert +/- Standardabweichung, n=4

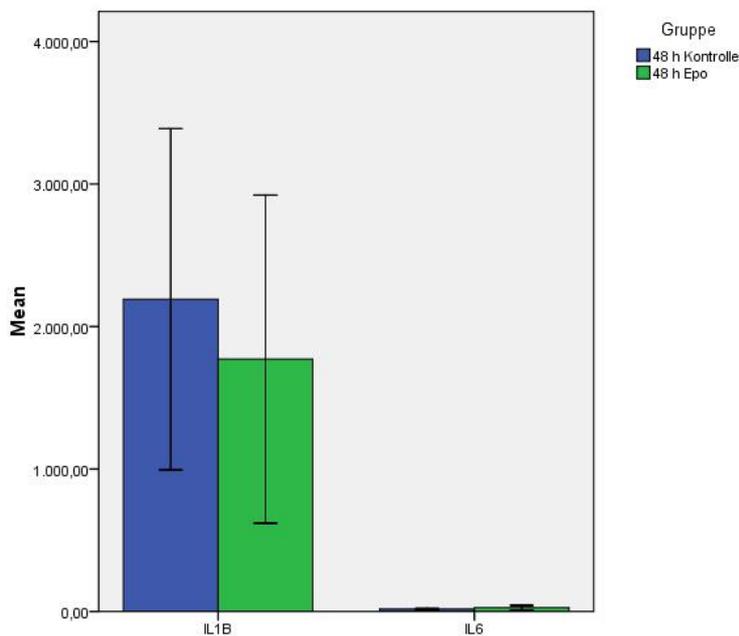


Abb. 28: Expression von IL1 β und IL6 48h nach Reperfusion und 18h kalter Ischämie. Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung. Epo-Gruppe mit intraportaler Erythropoietininjektion. Daten angegeben mit Mittelwert +/- Standardabweichung, n=5 (4)

5 Diskussion

Der positive Einfluss von Erythropoietin auf die strukturelle Integrität verschiedener Gewebe durch die Minimierung des Ischämie-/Reperfusionsschadens konnte bereits mehrfach gezeigt werden. So kann es im Gehirn durch einen direkten Einfluss auf Neurone, Astrozyten und Mikroglia die Infarktgröße deutlich reduzieren [102]. Hierbei werden die Produktion proinflammatorischer Zytokine, der Einstrom von Entzündungszellen und die Zahl der apoptotischen Zellen reduziert. Im Herzen konnte in Ischämie modellen gezeigt werden, dass EPO den I/R Schaden durch eine Reduktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL 6 verringert. Auch hier konnte eine Verminderung der Anzahl apoptotischer Zellen durch EPO erreicht werden [75-83]. Darüber hinaus konnte bereits gezeigt werden, dass Mäusenieren weniger empfindlich auf eine experimentell erzeugte Ischämie reagieren, wenn sie mit EPO vorbehandelt wurden [103].

Auch für die Leber gibt es Hinweise für die protektive Wirkung von Erythropoietin in Bezug auf den I/R-Schaden. Die hierzu bisher vorliegenden Untersuchungen fokussieren sich insbesondere auf Schädigungen durch ausschließlich warme Ischämiezeiten und den Einfluss der Applikationsweise von Erythropoietin. Die intraportalvenöse Gabe von EPO war hier den anderen Applikationsformen klar überlegen. [104, 105, 106].

Mit der hier vorliegenden Arbeit soll erstmals der Einfluss von EPO auf den kaltischämischen Schaden im Rahmen der Lebertransplantation untersucht werden. Hierzu wurden in einem standardisierten orthotopen Transplantationsmodell Rattenlebern mit einer prolongierten kalten Ischämiezeit von 18 Stunden transplantiert und zu festen Zeitpunkten sowohl Gewebe- als auch Plasmaproben asserviert. In den entsprechenden Proben wurden zur Quanti- und Qualifizierung des I/R-Schadens sowohl die klinisch etablierten Aktivitäten der Leberenzyme bestimmt als auch eine histologische Aufarbeitung der transplantierten Lebern zur Bestimmung von nekrotischen und apoptotischen Zellen durchgeführt.

Bei der Messung der Leberenzyme fiel auf, dass zu allen Messzeitpunkten zwischen 4,5 und 48 Stunden nach Transplantation die Mittelwerte der mit EPO behandelten Tiere deutlich niedriger lagen als die der unbehandelten Tiere. Eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) ließ sich für LDH nach 24 und für die ALIT nach 48 Stunden

ermitteln. Bei den übrigen Enzymen und zu den restlichen Messzeitpunkten ließ sich zwar ein klarer Trend erkennen, der sich aber durch hohe Standardabweichungen bei modellbedingt kleiner Gruppengröße statistisch nicht ausreichend objektivieren ließ. Diese deutliche Erniedrigung der Leberenzyme weist auf einen geringeren Zellschaden in der Behandlungsgruppe hin, der möglicherweise durch die zytoprotektive Wirkung von EPO verursacht und gut mit den Ergebnissen der Studien an Herz- und Nervengewebe zu vereinbaren ist.

In der frühen Phase nach Transplantation lässt sich das unterschiedliche Ausmaß der Zellschädigung auch histologisch darstellen:

In der Auszählung der nekrotischen Zellen über HE- und PAS-Färbung waren in der EPO-Behandlungsgruppe sowohl 2 als auch 4,5 Stunden nach Transplantation nahezu keine nekrotischen Zellen detektierbar, in der Vergleichsgruppe jedoch bis zu 30 bzw. 40%.

Die Auszählung der TUNEL positiven Zellen ergab in dieser Untersuchung in beiden Gruppen einen insgesamt geringen Anteil apoptotischer Zellen. Zwischen zwei und viereinhalb Stunden nach Transplantation bewegte sich dieser in beiden Gruppen zusammen zwischen 1,5 und 7,9%, wobei die Mittelwerte der untersuchten Tiere in der EPO Gruppe sowohl 2 als auch 4,5 Stunden nach Transplantation mit 2,9 bzw. 2,6 % deutlich niedriger waren als in der Vergleichsgruppe mit 4,3 bzw. 4,1%. 24 und 48 Stunden nach Transplantation war der Anteil der apoptotischen Zellen so niedrig, dass eine Differenzierung nicht sinnvoll schien.

Auf Grund der insgesamt niedrigen Menge apoptotischer Zellen in beiden Gruppen ist es schwierig, die Ergebnisse anderer Untersuchungen bezüglich des Ausmaßes der Verringerung der Apoptose durch EPO-Behandlung zu bestätigen. Jedoch ist auch in diesem niedrigen Bereich im Mittel noch eine geringere Anzahl apoptotischer Zellen in der Behandlungsgruppe zu erkennen. Im Falle der histologisch nekrotischen Zellen sind die Unterschiede deutlicher. Insgesamt findet man die durch die Leberenzym-Messung suggerierten Unterschiede der Zellschädigung im histologischen Bild bestätigt. Zur weiteren Aufklärung der Mechanismen des gezeigten reduzierten Ischämie-/Reperfusionsschadens unter EPO-Behandlung wurde mit Hilfe der Hypoxyprobe™ Färbung das Verhältnis von hypoxischen zu normoxischen Zellen bestimmt [107]. Hier zeigte sich, dass sich durch die Gabe von EPO bei vier von sechs Tieren die Zahl der hypoxischen Zellen zwei Stunden nach Transplantation auf unter 5%, bei zweien davon

sogar auf unter 1% senken ließ. In der Kontrollgruppe lag die Zahl der hypoxischen Zellen bei allen Tieren über 30%. Es lässt sich vermuten, dass der höhere Anteil nekrotischer Zellen in der Kontrollgruppe eine direkte Folge der durch die Hypoxyprobe™-Färbung angezeigten ischämischen Zellschädigung ist. Eine Ursache der Apoptose als aktiver, energieabhängiger Vorgang wird von dieser Methode allerdings nicht erfasst.

Die schon unter anderem im Ischämiemodell des Gehirns [75] und Herzens [77] gezeigte anti-entzündliche Wirkung von EPO sollte in dieser Untersuchung mit Hilfe der Messung der proinflammatorischen Cytokine IL6 und IL β auch im Transplantationsmodell der Leber nachvollzogen werden. Insgesamt zeigte sich vor allem in der frühen Phase nach Transplantation eine starke Erhöhung dieser beiden Cytokine, die im Mittel in der EPO-Gruppe deutlich niedriger waren als in der Kontrollgruppe. Im Einzelnen erreichte IL 1 β in der Kontrollgruppe seinen Höchstwert 24 Stunden nach Transplantation und fiel danach wieder ab, während es in der Behandlungsgruppe erst nach 48 Stunden seinen Höchstwert erreichte und die Mittelwerte zu jedem Zeitpunkt unter denen der EPO Gruppe lagen. Hiernach lässt sich vermuten, dass die antiinflammatorische Wirkung von EPO bis zu 24 Stunden anhält. Wenn man den zeitlichen Verlauf von IL 6 betrachtet, lässt sich das gleiche Phänomen beobachten, wobei der Höchstwert von IL 6 bereits nach 4,5 Stunden erreicht wurde und nach 48 Stunden der Mittelwert der Behandlungsgruppe sogar etwas über dem der Kontrollgruppe lag.

Die erhobenen Daten sprechen insgesamt für eine protektive Wirkung von EPO vor einem Ischämie-/Reperfusionsschaden nach Lebertransplantation. Möglicher Mechanismus ist eine insbesondere kurz nach Reperfusion deutlich geringere Konzentration der proinflammatorischen Cytokine IL 6 und IL 1 β .

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse wurden im März 2009 in Transplantation International veröffentlicht (siehe Publikationsliste).

6 Zusammenfassung

Humanem rekombinantem Erythropoietin (EPO) wird seit einiger Zeit die Fähigkeit zugesprochen, eine starke protektive Wirkung gegen ischämische Schädigung in verschiedenen Geweben auszuüben. Sowohl im Herzen als auch in neuronalem Gewebe wurde durch eine Vorbehandlung mit EPO bereits eine signifikante Reduktion des Zellschadens nach ischämischen Episoden erreicht. Auch im Ischämie-Modell der Leber gibt es bereits Untersuchungen, die auf eine solche Wirkung hinweisen. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen von EPO auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden im Lebertransplantationsmodell bei der Ratte.

Es wurden Lebertransplantationen bei Wistar Ratten mit einer Kaltischämiezeit von 18 Stunden durchgeführt. Dabei wurden die Spendertiere eine halbe Stunde vor Explantation und die Empfängertiere direkt nach Implantation mit jeweils 1000 IE Erythropoietin intraportalvenös behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung mit EPO. Es wurden vier Gruppen gebildet mit Tötungszeitpunkten 4,5, 24 und 48 Stunden sowie sieben Tage postoperativ. In der ersten Gruppe wurde zusätzlich zwei Stunden postoperativ eine Resektion des Lobus triangulatus zur histologischen und molekularbiologischen Aufbereitung entnommen. In allen Gruppen wurden zum Tötungszeitpunkt Blut und Gewebeproben von der Leber entnommen. Es wurden Leberenzyme bestimmt und die Gewebeproben bezüglich Apoptose, Nekrose und Hypoxie untersucht. Die Expression der Cytokine IL6 und IL 1 β wurde mittels Real-Time PCR bestimmt.

Alle gemessenen Leberenzyme lagen in der mit EPO behandelten Gruppe viereinhalb, 24 und 48 Stunden nach Transplantation deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, wobei statistische Signifikanz nur für LDH nach 24 und für ALT nach 48 Stunden erreicht wurde. Die Zahl der hypoxischen und nekrotischen Zellen war in der Behandlungsgruppe zwei und 4,5 Stunden nach Transplantation deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, die Zahl der apoptotischen Zellen konnte bei insgesamt geringer Apoptoserate unter EPO-Behandlung gesenkt werden. IL6 und IL 1 β waren bis zu 24 Stunden nach Transplantation in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe.

Die erhobenen Daten sprechen insgesamt für eine protektive Kapazität von EPO im Falle eines Ischämie-/Reperfusionsschadens nach Lebertransplantation.

Literatur

- 1 Lee, S., A. C. Charters et al.: A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1973, *16(6)*, S.664-9.
- 2 Zimmermann, F. A., G. W. Butcher et al: Techniques for orthotopic liver transplantation in the rat and some studies of of the immunologic response to fully allogenic liver grafts. *Transplantation Proc.* 1979, *11(1)*, S.571-7.
- 3 Nat1-Inst-Health-Consens-Dev-Conf: Liver Transplantation. National Institute of Health Consensus Development. *Hepatology*. 1983, *4(7)*, S.107s-110s.
- 4 Consensus Conference on Indication of Liver Transplantation, Paris, France, June 22-23: Consensus Conference on Indication of Liver Transplantation. *Hepatology*. 1994, *20, Nr.1 Pt 2*, S.1s-68s.
- 5 Starzl, T. E., T. L. Marchioro et al: Homotransplantation of the human liver. *Surg-Gynecol-Obstet.* 1963, *117*, S.659-676.
- 6 Starzl, T. E., T. L. Machioro et al.: Experimental and clinical homotransplantation of the human liver. *Ann NY Sci.* 1964, *120*, S.739-765.
- 7 Starzl, T. E., C. G. Groth et al.: Orthotopic homotransplantation of the human liver. *Ann Surg.* 1968, *168(3)*, S.392-415.
- 8 Everhart, J. E., M. Lombardero et al: Increased waiting time for liver transplantation results in higher mortality. *Transplantation*. 1997, *64(9)*, S.1300-1306.
- 9 Mirza, D. F., B. K. Gunson et al.: Policies in Europe on "marginal quality" donor livers. *Lancet*. 1994, *344*, S.1480-83.
- 10 Todo, S., A. J. Demetris et al.: Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation*. 1989, *47(5)*, S.903-5.
- 11 Markmann, J. F., J. W. Markmann et al: Preoperative factors associated with outcome and their impact on resource use in 1148 consecutive primary liver transplants. *Transplantation*. 2001, *72(6)*, S.1113-1122.
- 12 Starzl, T. E., A. J. Demetris et al.: Liver transplantation. *N Engl J Med.* 1989, *321*, S.1014-1022.
- 13 Kalayoglu, M., R. M. Hoffmann et al.: Results of extended preservation of the liver for clinical transplantation. *Transplant Proc.* 1989, *21*, S.3487-3488.

- 14 Todo, S., J. Nery et al.: Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA*. 1989, *21*, S.711-714.
- 15 Greig, P. D., G. M. Woolf et al: Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation*. 1989, *48*, S.447-453.
- 16 Ploeg, R. J., A. M. D'Alessandro et al.: Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation-A multivariate analysis. *Transplantation*. 1993, *55*, S.807-813.
- 17 Belzer, F. O., J. H. Southard: Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988, *45*, S.673-6.
- 18 Momii, S., A. Koga: Time-related morphological changes in cold-stored rat livers: a comparison of Euro-collins solution with UW solution. *Transplantation*. 1990, *50*, S.745-750.
- 19 Todo, S., J. Nery et al.: Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA*. 1989, *261*, S.711-714.
- 20 D'Alessandro, A. M., M. Kalayoglu: The predictive value of donor liver biopsies on the development of primary non-function after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*. 1991, *23*, S.1536-7.
- 21 Furukawa, H., S. Todo: Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation*. 1991, *51*, S.1000-1004.
- 22 Moreno-Sanz, C., C. Jimenez-Romero et al.: Primary dysfunction after liver transplantation. Is it possible to predict this complication?. *Rev Esp Enferm Dig*. 1999, *91*, S.401-419.
- 23 Porte, R. J., R. J. Ploeg et al.: Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischemia and primary dysfunction. European Multicenter Study Group. *Transpl Int* . 1998, *11 (Suppl)*, S.164-7.
- 24 Szabo, A., U. Heemann: Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transpl Proc*. 1998, *30*, S.4281-4.
- 25 Lowes, J. R., S. G. Hubscher et al.: Chronic rejection of the liver allograft. *Gastroenterol Clin North Am*. 1993, *22*, S.401-420.
- 26 Howard, T. K., G. B. Klintmalm: The Influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation*. 1990, *49*, S.103-7.
- 27 Clavien, P. A., P. R. C. Harvey et al.: Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. *Transplantation*. 1992, *53*, S.957-978.

- 28 Klar, E., M. Angelescu et al.: Definition of maximum cold ischemia time without reduction of graft quality in clinical liver transplantation. *Transplant Proc.* 1998, 30, S.3683-5.
- 29 Janny, S., A. Sauvanet et al.: Outcome of liver grafts with more than 10 hours ischemia. *Transplant Proc.* 1997, 29, S.2346-7.
- 30 Schön, M. R., O. Kollmar: Cold ischemia affects sinusoidal endothelial cells while warm ischemia affects hepatocytes in liver transplantation. *Transplant Proc.* 1998, 30, S.2318-2320.
- 31 Otto, G., H. Woll: Preservation Damage in liver transplantation: electron microscopic findings. *Transplant Proc.* 1984, 16, S.1247-9.
- 32 Ikeda, T., K. Yanaga et al.: Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology.* 1992, 16, S.454-461.
- 33 Belzer, F. O., J. H. Southard: Principles of solid organ preservation by cold storage. *Transplantation.* 1988, 45, S.673-6.
- 34 Leaf, A.: Maintenance of concentration gradients and regulation of cell volume. *Biochem J.* 1956, 62, S.241.
- 35 Hansen, T. N., P. E. Dawson et al.: Effects of hypothermia upon endothelial cells: mechanisms and clinical importance. *Cryobiologie.* 1994, 31, S.101-106.
- 36 Schanne, F. A., A. B. Young et al.: Calcium dependence of toxic cell death: a common final pathway. *Science.* 1979, 206, S.700-702.
- 37 Cheung; J. Y., J. V. Bonventre: Calcium and ischemic injury. *N Engl J Med.* 1986, 314, S.1670-6.
- 38 Kurokawa T., H. Takagi: Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Transpl. Proc.* 1999, 31, S.1775-6.
- 39 Woods, H. F., H. A. Krebs et al.: Lactate production in the perfused rat liver. *Biochem J.* 1971, 125, S.129-139.
- 40 Bonventre, J. V., J. Y. Cheung: effects of metabolic acidosis on viability of cells exposed to anoxia. *Am J Physiol.* 1985, 249, S.149-159.
- 41 Currin, R. T., G. J. Gores et al.: Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. *FASEB J.* 1991, 5, S.207-210.
- 42 McCord, J. M.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985, 312, S.159-63.

- 43 Pardini, R. S.: TOxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. Arch Insect Biochem Physiol. 1995, 29, S.101-18.
- 44 Adkinson, D., M. E. Höllwarth et al.: Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury in the liver. Acta Physiol Scand. 1986, 548 (Suppl.), S.101-7.
- 45 DelMaestro, R. F.: AN approach on free radicals in medicine and biology. Acta Physiol Scand. 1980, 492, S.153.
- 46 Shiraori, Y., H. Fukushi et al.: Modulation of ischemia-reperfusion-induced hepatic injury by Kupffer cells. Dig Dis Sci. 1994, 39, S.1265-72.
- 47 Jaeschke, H., A. Farhood: Neutrophil and Kupffer cell-induce oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. Am J Physiol. 1991, 260, S.355-62.
- 48 Koo, A., H. Komatsu: Leukocyte interactions with sinusoid endothelial cells in ischemic reperfused rat livers. Hrsg.: Wisse, E., Knook, D. L., McCuskey, R. S.: Cells of the hepatic sinusoids. Leiden, Kupffer Cells Foundation, 1991 S.364.
- 49 Grisham, M. B., L. A. Hernandez et al.: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. Am J Physiol. 1986, 251, S.567-74.
- 50 Thornton, A. J., R. M. Strieter et al.: Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. J Immunol. 1990, 144, S.2609-13.
- 51 Pober, J. S.: Cytokine-mediated activation of vascular endothelium: physiology and pathology. Am J Pathol. 1998, 133, S.426-33.
- 52 Takei, Y, I. Marzi et al.: Leukocyte adhesion and cell death following orthotopic liver transplantation in the rat. Transplantation. 1991, 51, S.959-65.
- 53 Clavien, P. A., P. R. C. Harvey et al.: Preservation and Reperfusion injuries in liver allografts. Transplantation. 1992, 53, S.957-78.
- 54 Caldwell-Kenkel, J. C., R. G. THurman et al.: Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. Transplantation. 1987, 45, S.834-7.
- 55 Clavien, P. A. : Sinoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. Hepatology. 1998, 28, S.281-5.
- 56 McKeown, C. M. B., V. Edwards et al.: Sinoidal linig cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. Transplantation. 1988, 46, S.178-191.

-
- 57 Borghi-Scoazeg, G., J. Y. Scoazeg et al.: Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl Surg.* 1997, 3, S.407-15.
- 58 Miyagawa, Y., H. Imamura et al.: Fate of hepatocyte and sinusoidal lining cell function and kinetics after extended cold preservation and transplantation of rat liver. *Liver Transpl.* 2002, 4, S.370-81.
- 59 Nicotera, P., M. Leist et al.: ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett.* 1998, 28, S.102-3, 139-42 .
- 60 Colletti, L.M., S. L. Kunkel: The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology.* 1996, 23, S.506-14.
- 61 Shingawa, T., K. Yoshioka et al.: Apoptosis in cultured rat hepatocytes: The effects of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Pathol.* 1991, 165, S.247-53.
- 62 Murry, C. E., R. B. Jennings et al.: Preconditioning with ischemia: a delay in lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986, 74, S.1124-36.
- 63 Peralta, C., G. Hotter et al.: The protective role of adenosine in including nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology.* 1999, 29, S.126-32.
- 64 Peralta, C., R. Bartrons et al.: Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia. *Am J Physiol.* 2000, 279, S.G163-71.
- 65 Peralta, C., R. Bartrons et al.: Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology.* 2001, 34, S.1164-73.
- 66 Peralta, C., L. Fernandez et al.: Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat. *Hepatology.* 2001, 33, S.100-13.
- 67 Clavien, P. A., S. Yadav et al.: Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg.* 2000, 232, S.163-5.
- 68 Zhang, S.-J., S. Chen: The role of ischemic preconditioning in rat liver graft. *Transpl Proc.* 2004, 36, S.1970-2.
- 69 Zhang, X. J., H. Cao et al.: How ischemic preconditioning affects cell apoptosis in I/R injury during liver graft. *Chin J Hepatol.* 2000, 8, S.221.

-
- 70 Calvillo, L., R. Latini et al.: Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodelling. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2003, *100*, S.4802-6.
- 71 Cai, Z., D.J. Manalo et al: Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2003, *108 (1)*, S.79-85.
- 72 Bogoyevitch, M.A.: An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection of erythropoietin and the lessons learned from studies in neuroprotection. *Cardiovascular Research*. 2004, *63 (2)*, S.208-16.
- 73 Yang, C.W., C. Li et al.: Preconditioning with erythropoietin protects against subsequent ischemia-reperfusion injury in the rat kidney. *FASEB Journal*. 2003, *17 (12)*, S.1754-5.
- 74 Agnello, D., P. Bigini et al: Erythropoietin exerts anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Research*. 2002, *952 (1)*, S.128-34.
- 75 Villa, P., P. Bigini et al: Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*. 2003, *198 (6)*, S.971-5.
- 76 Bergelson, S., U. Klingmuller et al: Tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor mediate activation of the AP-1 transcription factors . *Journal of Biological Chemistry*. 1998, *273 (4)*, S.2396-2401.
- 77 Liu, X., W. Xie et al: Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion. *Life Sciences*. 2006, *78 (19)*, S.2255-64.
- 78 Digicaylioglu, M., S.A. Lipton: Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature*. 2001, *412*, S.641-7.
- 79 Siren, A. L., F. Knerlich et al: Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2001, *202*, S.271-6,
- 80 Chong, Z. Z., J. Q. Kang et al: Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt 1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation*. 2001, *104*, S.253-6.

- 81 Lipsic, E., P. van der Meer et al: Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004, *44*, S.473-9.
- 82 Tramontano, A. F., R. Muniyappa et al: Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003, *308*, S.990-4.
- 83 Parsa, C. J., A. Matsumoto et al: A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest.* 2003, *112*, S.999-1007.
- 84 Broudy, V.C., N. Lin et al: Erythropoietin receptor characteristics in human erythroid cells. *Blood.* 1991, *77*, S.22583-2590.
- 85 Hewitson, K. S., L. A. McNeill et al.: Modulating the hypoxia-inducible factor signalling pathway: Applications from cardiovascular disease to cancer. *Curr Pharm Des.* 2004, *10*, S.821-833.
- 86 Nagai, A., E. Nakagawa et al.: Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001, *60*, S.386-392.
- 87 Maiese, K., L. Faqi, et al.: Erythropoietin in the brain: Can the promise to protect be fulfilled?. *Trends Pharmacol Sci.* 2004, *25(11)*, S.577-83.
- 88 Digicaylioglu M., S.A. Lipton et al.: Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature.* 2001, *412(6847)*, S.641-7.
- 89 Damen, J. E., H. Wakao et al.: Free in PMC Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation. *EMBO J.* 1995, *14(22)*, S.5557-68.
- 90 Chong, Z. Z., J. Q. Kang et al.: Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation.* 2002, *106*, S.2973-9.
- 91 Chong, Z. Z., J. Q. Kang et al.: Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003, *23*, S.220-30.
- 92 Matsuzaki, H., M. Tamatani et al.: Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in Bcl-2 and Bax expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem.* 1999, *73*, S.2037-46.

- 93 Chong, Z.Z., J. Q. Kang et al.: Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol.* 2003, *138*, S.1107-18.
- 94 Chong, Z. Z., S. H. Lin et al.: Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *Neurosci Res.* 2003, *71*, S.659-69.
- 95 Putcha, G. V., M. Deshmukh et al.: BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, BCL-2, and caspases. *J Neurosci.* 1999, *19*, S.7476-85.
- 96 Reed, J. C.: Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med.* 2001, *7*, S.314-9.
- 97 Wang, C. Y., M. W. Mayo et al.: NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science.* 1998, *281*, S.1680-3.
- 98 Tang, G., Y. Minemoto et al.: Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature .* 2001, *414*, S.313-7.
- 97 De Smaele, E., F. Zazzeroni: Induction of gadd45beta by NF-kappaB downregulates pro-apoptotic JNK signalling. *Nature.* 2001, *414*, S.208-313.
- 98 Figueroa, Y. G., A. K. Chan et al.: NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression. *Exp Hematol.* 2002, *30*, S.1419-27.
- 99 Bel-Price, A., G. C. Brown et al.: Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J Neurochem.* 2000, *75*, S.1455-64.
- 100 Kang, J., Q., Z. Z. Chong et al.: Critical role for Akt1 in the modulation of apoptotic phosphatidylserine exposure and microglial activation. *Mol Pharmacol.* 2003, *64*, S.557-69.
- 101 Zhou, H., X. M. Li et al.: Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol.* 2000, *151*, S.483 – 94.
- 102 Marti HH: Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol.* 2004, *207*, S.3233-3242,
- 103 Vesey D. A., C. Cheung et al: Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2004, *19*, S.348-355.

-
- 104 Sepodes B., R. Maio et al: Recombinant human Erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int.* 2006, *19*, S.919-926.
- 105 Schmeding M., U. P. Neumann: Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Eur Surg Res.* 2007, *39*, S.189-197.
- 106 Sepodes B., R. Maio et al: Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int.* 2006, *11*, S.919-26.
- 107 Arteel, G. E., R. G. Thurman et al: Evidence that hypoxia markers detect oxygen gradients in liver: pimonidazole and retrograde perfusion of rat liver. *Br J Cancer.* 1995, *72*, S.889-895.

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Ulf Neumann für die Überlassung des Themas und die beständige Unterstützung. Sein Vertrauen hat mich motiviert und seine Begeisterung war mir ein Vorbild.

Herrn Prof. Dr. Peter Neuhaus danke ich für die Möglichkeit in seiner Abteilung meine Arbeit durchführen zu können.

Frau Sabine Boas-Knoop danke ich für ihre während meiner Arbeit entstandene Freundschaft und ihre Hilfe in allen Lebenslagen.

Ich danke Herrn Dietrich Polenz für die Einführung in die experimentelle Lebertransplantation bei der Ratte und für seine stets hilfreiche Begleitung und Orientierung während meiner Arbeit.

Meiner Arbeitsgruppe danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz und die freundliche, kompetente Hilfe. Besonders gedankt sei hier Herrn Steffen Lippert für das große Engagement bei der Tätigkeit im Labor.

Meinem Freund und Kollegen Herrn Dr. Peter Olschewski danke ich für seine wertvolle Hilfe bei der Ausarbeitung der Promotionsschrift.

Herrn Sebastian Rademacher danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Ich danke Herrn Dr. Maximilian Schmeding für seine fachliche Unterstützung und seine praktische Hilfe.

Lebenslauf

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

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Publikationsliste

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

Schmeding M, Hunold G, Ariyakhagorn V et al.

Transpl Int. 2009 Mar 20. [Epub ahead of print]

“Improved microcirculation by low-viscosity histidine- tryptophan-ketoglutarate graft flush and subsequent cold storage in University of Wisconsin solution: results of an orthotopic rat liver transplantation model.”

Olschewski P, Hunold G, Schöning W et al.

Transpl Int. 2008 Dec;21(12):1175-80. Epub 2008 Aug 5.

“Low viscosity histidine-tryptophan-ketoglutarate graft flush improves subsequent extended cold storage in University of Wisconsin solution in an extracorporeal rat liver perfusion and rat liver transplantation model.”

Puhl G, Olschewski P, Schöning W, Hunold G et al.

Liver Transpl. 2006 Dec;12(12):1841-9