

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

DISSERTATION

*Spendervorbehandlung mit warmer HTK-Lösung im
Lebertransplantationsmodell der Ratte reduziert den
Ischämie/Reperfusionsschaden*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Wenzel Schöning

aus *Heidelberg*

Gutachter/in: 1. PD Dr. med. Gero Puhl
 2. Prof. Dr. med. Brigitte Vollmer
 3. Prof. Dr. med. Sven Jonas

Datum der Promotion: 08.04.2011

Inhaltsverzeichnis:

I.	Einführung	5
I.1.	Hypothesen	10
II.2.	Studienendpunkte	10
II.	Material und Methoden	11
II.1.	Die Konservierungslösung HTK	11
II.2.	Versuchstiere	11
II.3.	Mikrochirurgische Technik der Lebertransplantation, Spenderoperation und Organentnahme der transplantierten Lebern nach abgelaufener Beobachtungszeit	13
II.3.1..	Operationsvorbereitungen und Anästhesie	13
II.3.2.	Spenderoperation / Hepatektomie	14
II.3.3.	Empfängeroperation / Leberimplantation	16
II.3.4.	Organentnahme der transplantierten Lebern nach abgelaufener Beobachtungszeit	18
II.4.	Messung der Transaminasen AST/ALT, der LDH und des Bilirubins	18
II.5.	Messung der MMP-Aktivität mittels Gelatin-Zymografie	19
II.5.1.	Die Messmethode Zymografie	19
II.5.2.	Aufbereitung der Leberproben und Proteinextraktion	19
II.5.3.	Gelelektrophorese	19
II.5.4.	Entwicklung, Färbung und densitometrische Messung	20
II.6.	Histologische Analyse	21
II.7.	Statistische Analyse	22
III.	Ergebnisse	23
III.1.	Spender- und Empfängertierdaten	23
III.1.1.	Überleben der Empfängertiere	23
III.1.2.	Kalte Ischämie-Zeit	23
III.1.3.	Die anhepatische Zeit	24
III.1.4.	Die Spender/Empfänger-Gewichts-Ratio	25
III.2.	Leberschädigungsparameter: Transaminasen und Laktatdehydrogenase	26
III.2.1.	Aspartat-Aminotransferase	27
III.2.2.	Alanin-Aminotransferase	29
III.2.3.	Laktatdehydrogenase	32

Inhaltsverzeichnis

III.3.	Bilirubin T und Bilirubin D	36
III.4.	Matrixmetalloproteinase-Aktivität	36
III.4.1.1.	proMMP-2	36
III.4.1.2.	Zeitlicher Verlauf der proMMP2	39
III.4.2.1.	MMP-2	40
III.4.2.2.	Zeitlicher Verlauf der MMP-2	43
III.4.3.1.	proMMP-9	44
III.4.3.2.	Zeitlicher Verlauf der proMMP-9	47
III.4.4.	Histologische Analyse	49
III.4.4.1.	Gesamtschädigung	49
III.4.4.2.	Nekrosen	56
III.4.4.3.	Apoptosen	59
III.4.4.4.	Abräumungsknötchen	60
III.4.4.5.	Gallengangsproliferate	60
III.4.4.6.	Portale Infiltrate	60
III.4.4.7.	Mitosen	63
IV.	Diskussion	64
V.	Zusammenfassung und Schlussfolgerung	70
VI.	Literaturverzeichnis	72
VII.	Anhang	77
VII.1.	Abkürzungsverzeichnis	77
VII.2.	Erklärung	78

I. Einführung

Die Ergebnisse der Lebertransplantation (LTx) haben sich in den letzten Dekaden entscheidend verbessert. So werden mittlerweile an den europäischen Transplantationszentren Ein-Jahres-Überlebensraten von über 90% und Fünf-Jahres-Überlebensraten von über 80% erreicht [1]. Die LTx gilt heute als Standardverfahren zur Therapie von Patienten mit bestimmten schweren irreversiblen Lebererkrankungen.

Die erreichten Fortschritte haben zu einem exponentiellen Zuwachs an Lebertransplantationen innerhalb der letzten zwei Dekaden geführt. Aufgrund der zunehmenden Anzahl an Transplantationen ist der Bedarf an Spenderorganen deutlich höher als das Angebot. Dieser Mangel an Organen führt zu einer zunehmenden Anzahl von Transplantationen so genannter ‚marginaler Organe‘. Obwohl dieses Problem seit beinahe zwanzig Jahren besteht, gibt es bisher keine allgemein gültige, wissenschaftlich anerkannte Definition der Termini ‚marginale Organ‘ oder ‚marginaler Spender‘. Die Termini bilden vielmehr ein Sammelbecken für Transplantat- bzw. Spendereigenschaften, von denen man annimmt, dass sie zu einer beeinträchtigten Transplantatfunktion oder schlechterem Transplantat- oder Empfängerüberleben führen [2]. Die Datenlage zum Thema ‚marginale Organe‘ ist dabei häufig widersprüchlich und schlecht vergleichbar, da für ein bestimmtes Marginalitätskriterium in verschiedenen Arbeiten oft unterschiedliche Ausprägungsgrade als Grenze der Marginalität verwendet werden. Spender- bzw. Transplantatfaktoren, die zu Marginalität führen, sind: Spenderalter, Geschlecht, Rasse, Gewicht, Blutgruppe, Ursache des Hirntods, Länge des Krankenhausaufenthaltes, pulmonale Dekompensation, Katecholaminverbrauch, Hepatitisserologie, Herzstillstand, Leberwerte, kalte Ischämiezeit, Steatosis und Hyponatriämie [3-5].

Von Seiten der Bundesärztekammer wurde eine Definition marginaler Organe für Spenderlebern mit folgenden Kriterien erstellt: HBV oder HCV positiv, Sepsis mit positiver Blutkultur, Meningitis, extrahepatische Tumorerkrankung, Drogenabusus, Spenderalter über 65 Jahre, Fettleber größer als 40% (histologisch gesichert), Serum-Natrium größer als 165 mmol/l, Intensivstation einschließlich Beatmung des Spenders länger als sieben Tage, Adipositas des Spenders mit BMI größer als 30,

1 Einführung

Kaltischämiezeit länger als 13 Stunden, AST oder ALT größer als dreifacher normaler Wert [6].

„Marginale Organe“ zeigen eine höhere Rate an initialer Nicht- bzw. Malfunktion, sowie ein insgesamt schlechteres Outcome für Organe und Patienten [7]. Dies liegt in ihrer geringeren Toleranz gegenüber durch Ischämie und Reperfusion (I/R) bedingten Schäden begründet.

Dem gegenüber führte die Ausweitung der Spenderkriterien zu einer Verkürzung der Wartezeit bis zur Transplantation [8] und zu einer Reduktion der Sterblichkeit auf der Wartelist [9].

Durch Verwendung „marginaler Organe“ stehen nun Herausforderungen an eine Verbesserung der Organkonservierung mit Reduktion des I/R Schadens im Vordergrund. Organkonservierung an sich beinhaltet schon eine deutliche Schädigung des zu transplantierenden Organs, wie sich schon bei „nicht-marginalen Organen“ an erhöhten Transaminasen und reduzierter Prothrombinzeit initial post transplantationem ablesen lässt [5]. Bereits vorgeschädigte „marginale Organe“ gilt es also vor dem I/R Schaden besonders zu schützen.

Hypothermie bzw. Kälte ist weit verbreitet zur Kurzzeit-Lagerung von Zellen, Geweben und Organen zu wissenschaftlichen und vor allem zu klinischen Zwecken. Kälte ist essentiell für die Verlangsamung des Metabolismus und zur Verzögerung durch Sauerstoffmangel oder durch Substratknappheit ausgelöster Schädigungsprozesse. Dennoch kann sie selbst eine Zellschädigung herbeiführen. Beispielsweise lässt sich an kultivierten Hepatozyten sowie hepatischen Endothelzellen durch Kälte Apoptose auslösen. Diese beruht auf der durch Kälte induzierten Freisetzung reaktiver Sauerstoff-Radikale (ROS) [10].

Bei verlangsamt ablaufendem Metabolismus kommt es jedoch nicht nur zur Reduktion von durch Hypoxie bedingten Schädigungen, sondern auch zu einer geringeren Aufnahme von Substraten in die Zelle. Obwohl sich der aerobe Metabolismus um das anderthalb bis zweifache pro Temperaturreduktion um 10°C verringert, geht der anaerobe Metabolismus weiter, dies führt zu Verbrauch von Energie-Reserven (Adenosintriphosphat (ATP)) und begleitend durch Laktatanhäufung zur Bildung eines

1 Einführung

sauren Milieus [11]. Des Weiteren ist die Natrium/Kalium ATPase, welche durch ihre Funktion der aktiven Natrium-Extrusion die osmotische Balance der Zelle aufrechterhält, ebenfalls temperaturabhängig. Je niedriger die Temperatur, desto weniger arbeitet sie. Dies führt zu einer intrazellulären Natriumakkumulation mit konsekutivem Chlorid Einstrom sowie Kaliumverlust. Dies bedingt in der weiteren Folge aufgrund der hohen osmotischen Wirkung nicht-permeabler intrazellulärer Makromoleküle einen passivem Wassereinstrom durch die Zellmembran und schließlich die Zellschwellung [12-14].

Zur idealen Organkonservierung muss also nicht alleine eine Reduktion des Metabolismus, sondern auch eine Bereitstellung von Substraten für den auch in Kälte weiter stattfindenden Metabolismus, sowie ein Puffersystem zur Abfederung der entstehenden sauren Valenzen vorhanden sein.

Als Standard Organkonservierung im Rahmen der Lebertransplantation hat sich die Verwendung kalter (4°C) Histidin-Tryptophan-Ketoglu tarat (HTK)- bzw. University-of-Wisconsin (UW)-Lösung als Perfusions- sowie Lagerungslösung durchgesetzt. [15]

HTK wurde von Bretschneider als Kardioplegie-Lösung zur Verwendung im Temperaturbereich der *Hypothermie* (23 – 32 °C) während herzchirurgischer Eingriffe entwickelt und später auch für die Kaltkonservierung (4°C) von Organen verwendet. Auf der Basis einer *extrazellulären* Lösung verwendet HTK die intrinsischen Komponenten Histidin, Tryptophan und Ketoglutarat. Der große Anteil an Histidin (180 mmol/l) der Lösung bildet einen hervorragenden pH-Puffer. Die Pufferkapazität ist temperaturabhängig und hat ihren größten pk-Wert im Bereich von fünf °C, resultierend in einer Erhöhung des so genannten ‚protektiven Faktors‘ (= Verlängerung der Zeit, in welcher der ATP Gehalt des Hundeherzens auf 4 µmol/g abfällt) auf neun, bei einer Temperatur von 25 °C wird ein protektiver Faktor von sieben, bei 35°C einer von sechs erreicht [16].

UW, von Belzer primär als Konservierungslösung entwickelt, bildet aufgrund seiner Komponenten ein *intrazelluläres* Milieu. Es enthält eine Anzahl von Zell-impermeabler Komponenten (Hydroxy-Äthylstärke, Lactobionat, Raffinose) zur Verhinderung von Zellschwellung während der Kaltischämie. Diese Komponenten führen jedoch auch zu einer deutlich erhöhten Viskosität [17], des Weiteren ist ein hoher Kaliumgehalt zu erwähnen, welcher bei Perfusion der Organe eine initiale Vasokonstriktion auslösen

1 Einführung

kann [18]. In vergleichenden histologischen und elektronenmikroskopischen Analysen direkt nach Perfusion mit Konservierungslösung führte dies zu einer deutlich reduzierten Freispülung zellulärer Blutbestandteile aus den zu konservierenden Organen [19].

Nicht alleine die durch -Kälte induzierte- ROS verursachte Apoptose wurde als Schädigungsmechanismus während der Organkonservierung identifiziert: Auch histologische Grundeigenschaften der Leber selbst, sowie eine damit einhergehende schädigende Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) wurden beschrieben [20, 21].

MMPs werden durch Bestandteile der Konservierungslösungen HTK und UW inhibiert. Für HTK wurde Histidin als entscheidendes Agens, für UW reduziertes Glutathion und Lactobionat identifiziert [22]; die inhibitorischen Effekte waren sowohl bei 4°C wie auch bei 37°C nachweisbar.

Bis zur Identifizierung der MMP-Inhibierenden Wirkung der besagten Komponenten [21, 22] galt vorwiegend die Pufferkapazität des Histidins als entscheidende Wirkung des HTK [23], nun rückt die MMP-Inhibierung in den Vordergrund.

In der klinischen Praxis haben sich viele Vorteile von HTK im Gegensatz zu UW herausgestellt: Geringe Kaliumkonzentration, niedrige Viskosität, keine Partikelbildung, Möglichkeit der in-situ Perfusion, keine Notwendigkeit zur Auswaschung vor Reperfusion, verbesserter Gallengangsschutz, bessere Erholung von mikrozirkulatorischen Veränderungen und nicht zuletzt niedrigere Kosten [24].

Zusammengefasst bestehen zwischen den beiden Standard Konservierungslösungen entscheidende konzeptionelle Unterschiede: UW ist ein visköser, substrat- (=energie-) reicher extrazellulärer Puffer mit anti-ödematösen Eigenschaften, während HTK (bei 4°C) eine um den Faktor 3 geringer visköse, zum Freispülen der zu konservierenden Organe ideal geeignete und nach intrazellulär aufgenommene Lösung ist.

Um ‚marginale Organe‘ der Transplantation zugänglich zu machen, gibt es multiple experimentelle Ansätze. Sie reichen von bestechend einfach durchführbaren Kombinationen der Vorteile beider Standard Konservierungslösungen bis hin zu komplexen, aufwändigen Revitalisierungsversuchen mittels oxigener Maschinenperfusion [25, 26]. Bei der Kombination beider Standard

1 Einführung

Konservierungslösungen erfolgt zunächst eine Perfusion der Organe in situ mittels HTK und danach ‚back-table‘ eine Konservierung mittels UW zur kalten Langzeitlagerung. Somit lässt sich der Vorteil der niedrigen Viskosität des HTK mit dem Substratreichtum und der anti-ödematösen Wirkung des UW verbinden und experimentell ein geringerer histologischer Schaden, eine geringere Freisetzung von Schädigungsparametern (Leber: Transaminasen, Niere: Harnstoff, Krea), eine verbesserte Mikrozirkulation bei der Reperfusion sowie ein besseres Überleben, erreichen [27-29].

Wie bereits erwähnt ist Kälte für Kurz- bzw. Langzeitlagerung der Organe zur Reduktion des Metabolismus unabdingbar. Die intrinsische Kälteschädigung durch Aufsättigen des zu transplantierenden Organs mit schützenden Komponenten bereits *vor Kontakt* mit kalter Konservierungslösung ist ein weiteres, bestechend einfaches Konzept, welches in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll. Da HTK initial als Perfusionslösung bei *Hypothermie* (23 – 32 °C) während herzchirurgischer Eingriffe entwickelt wurde, erscheint es logisch, seine auch in diesem Temperaturbereich vorhandenen protektiven Effekte (Auffüllen der intrazellulären Energiespeicher, Anreicherung der Organe mit MMP-inhibierendem und exzellent pufferndem Histidin sowie Bereitstellung anti-ödematöser Makromoleküle (Manitol)) bereits kurz vor Perfusion mit kalter (4°C) Konservierungslösung zu nutzen.

Hierzu wurde ein etabliertes Model der Lebertransplantation bei Ratten verwendet [27, 28, 30]. Die für die Untersuchung entscheidende Modifikation des Vorgehens lag in einer *Vorbehandlung* des Spendertiers. Vor der wie sonst üblichen Kaltperfusion mit HTK (4°C) erfolgte eine gewichtsadaptierte intravenöse Injektion *warmer* (21°C) HTK-Lösung. Hierdurch wurde versucht, die Leber bereits im Spendertier vor Entstehung jeglichen Schadens mit protektiven Substanzen auszustatten.

Hauptgründe der Verwendung von HTK in dieser Untersuchung sind – neben der postulierten MMP-inhibierenden Wirkung des Histidins – die Anwendbarkeit bei 21 °C und die niedrige Kaliumkonzentration. UW-Lösung ist bei physiologischen Temperaturen toxisch [31, 32] und würde intravenös appliziert durch die hohe Kaliumkonzentration zum Herzstillstand des Spendertieres führen.

1 Einführung

I.1. Hypothesen:

1. Durch warme HTK-Vorbehandlung des Spendertiers wird eine Reduktion der Transplantatschädigung erreicht.
2. Die Reduktion der Transplantatschädigung ist durch eine Inhibition der Gelatinasen (MMP2, MMP-9) begründet.

I.2. Studienendpunkte:

Zur Überprüfung der Hypothesen wurden folgende Studienendpunkte zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (vier Stunden, zwei und fünf Tage nach der Transplantation) festgelegt:

- Blutspiegel der Transaminasen (AST, ALT), der Laktatdehydrogenase (LDH) und des Bilirubins.
- Aktivität der Matrixmetalloproteinasen proMMP-2/MMP-2 und proMMP-9/MMP-9 in den transplantierten Lebern.
- Histologische Analyse der transplantierten Lebern.

II. Material und Methoden

II.1. Die Konservierungslösung HTK:

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete HTK-Lösung wurde als handelsübliches Custodiol® (Dr. F. Köhler Chemie GmbH – Alsbach-Hähnlein) bezogen. Ein Liter HTK-Lösung (Custodiol®) enthält, gelöst in sterilem Wasser, die in Tabelle 1 aufgeführten Bestandteile (Herstellerinformation, www.custodiol.com):

Gelöste Bestandteile	Entsprechend mmol/l
0,8766 g Natrium-Chlorid	15
0,6710 g Kalium-Chlorid	9
0,1842 g Kalium-hydrogen 2-ketoglutarat	1
0,8132 g Magnesium-Chlorid · 6 H ₂ O	4
3,7733 g Histidin · HCl · H ₂ O	18
27,9289 g Histidin	180
0,4085 g Tryptophan	2
5,4615 g Mannitol	30
0,0022 Calcium-Chlorid · 2 H ₂ O	0,015

Tabelle 1. Zusammensetzung der Konservierungslösung HTK (Custodiol®)

II.2. Versuchstiere:

Als Spender- und Empfängertiere dienten männliche Inzucht Wistarratten mit einem Gewicht zwischen 230-260g. Sie wurden bei Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) gekauft und jeweils etwa eine Woche vor Versuchsbeginn (Operation) geliefert. Bei Anlieferung wurden die Tiere untersucht und bis zum Beginn der Versuche in den Stallungen der Charité Campus Virchow Klinikum bei einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus in geeigneten Käfigen artgerecht mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten.

Die Behandlung und Haltung erfolgte nach den nationalen Tierversuchsrichtlinien. Das Versuchsvorhaben wurde bewilligt durch das regionale Ethikkomitee unter Berücksichtigung des Deutschen Tierschutzgesetzes. Die Tiere wurden in drei Behandlungs- und drei Kontrollgruppen unterteilt und jeweils an drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Transplantation getötet, um Blut- und Gewebeproben zur Messung der Leberschädigung sowie Aktivität der MMPs im Gewebe zu erhalten. In jede Gruppe wurden jeweils sechs Tiere eingeschlossen, resultierend in einer

2 Material und Methoden

Gesamtzahl von 72 Tieren (36 Spender-, 36 Empfängertiere, s. Tab 2):

G1 ,HTK Vorbehandlung 4h', (n=6):

Tiere dieser Gruppe erhielten Spender-Lebern von vorbehandelten Tieren. Die Vorbehandlung erfolgte während der Spenderexplantation: 15 Minuten vor der *HTK-Kaltperfusion (30ml)* erhielten die Spendertiere 0,01 ml HTK/g Körpergewicht (KG) als *warme (21 °C)* intravenöse Injektion über die V. cava inferior. Die Empfängertiere wurden vier Stunden nach Transplantation erneut narkotisiert und getötet.

G2 ,NaCl-Kontrolle 4h', (n=6):

Tiere dieser Gruppe erhielten Spender-Lebern von Tieren, die 15 Minuten vor der *HTK-Kaltperfusion (30ml)* 0,01 ml *warmes (21°C)* NaCl 0,9%/g KG als intravenöse Injektion über die V. cava inferior erhalten hatten. Sie wurden vier Stunden nach Transplantation erneut narkotisiert und getötet.

G3 ,HTK Vorbehandlung 2d', (n=6):

Tiere dieser Gruppe erhielten Spender-Lebern von vorbehandelten Tieren. Die Vorbehandlung erfolgte während der Spenderexplantation: 15 Minuten vor der *HTK-Kaltperfusion (30ml)* erhielten die Spendertiere 0,01 ml HTK/g KG als *warme (21 °C)* intravenöse Injektion über die V. cava inferior. Die Empfängertiere wurden zwei Tage nach Transplantation erneut narkotisiert und getötet.

G4 ,NaCl-Kontrolle 2d', (n=6):

Tiere dieser Gruppe erhielten Spender-Lebern von Tieren, die 15 Minuten vor der *HTK-Kaltperfusion (30ml)* 0,01 ml *warmes (21°C)* NaCl 0,9%/g KG als intravenöse Injektion über die V. cava inferior erhalten hatten. Sie wurden zwei Tage nach Transplantation erneut narkotisiert und getötet.

G5 ,HTK Vorbehandlung 5d', (n=6):

Tiere dieser Gruppe erhielten Spender-Lebern von vorbehandelten Tieren. Die Vorbehandlung erfolgte während der Spenderexplantation: 15 Minuten vor der *HTK-Kaltperfusion (30ml)* erhielten die Spendertiere 0,01 ml HTK/g KG als *warme (21 °C)* intravenöse Injektion über die V. cava inferior. Die Empfängertiere wurden fünf Tage nach Transplantation erneut narkotisiert und getötet.

2 Material und Methoden

G6 ‚NaCl-Kontrolle 5d‘, (n=6):

Tiere dieser Gruppe erhielten Spender-Lebern von Tieren, die 15 min vor der *HTK-Kaltperfusion (30ml)* 0,01 ml warmes (21°C) NaCl 0,9%/g KG als intravenöse Injektion über die V. cava inferior erhalten hatten. Sie wurden fünf Tage nach Transplantation erneut narkotisiert und getötet.

Vor der Spender- bzw. Empfänger-Operation wurde eine Nahrungskarenz von 24 Stunden bei freiem Zugang zu Wasser eingehalten. Nach der Empfängeroperation wurden die Tiere unter eine Wärmelampe gelegt und nach dem Aufwachen in Einzelhaltungskäfige gesetzt. Dort hatten sie freien Zugang zu Wasser und Futter. (Details s. II.3.2.)

Beobachtungszeit	HTK-Vorbehandlung		Kontrolle		gesamt
	Spender (n)	Empfänger (n)	Spender (n)	Empfänger (n)	
4 h	6	6	6	6	24
2 d	6	6	6	6	24
5 d	6	6	6	6	24
gesamt	18	18	18	18	72

Tabelle 2: Versuchstierübersicht

II.3. Mikrochirurgische Technik der Lebertransplantation und Spenderoperation

II.3.1. Operationsvorbereitungen und Anästhesie:

Sämtliche operative Eingriffe wurden unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene™, Abott, Wiesbaden), Distickstoffmonoxid und Sauerstoff durchgeführt. Zur Narkoseeinleitung wurden die Versuchstiere in einen Plexiglaszylinder mit Narkosegaszufuhr und Absaugung gesetzt. Nach ausreichend tiefer Narkose wurden sie über dem gesamten Abdomen geschoren, sowie umgehend auf dem Operationstisch wieder an eine Narkosemaske mit entsprechender Absaug-Vorrichtung für Ausatemluft und entweichende Gase angelegt und in Rückenlage mittels an den Extremitäten befestigten Pflasterstreifen auf einem Korkbrett fixiert. Nun erfolgte die Desinfektion des Operationsfeldes mit einer in Hautdesinfektionsmittel (Softasept® N, B. Braun, Melsungen) getränkten Kompresse.

II.3.2. Spenderoperation / Hepatektomie:

Alle Operationen erfolgten in sauberer, nicht-steriler mikrochirurgischer Technik unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (M651™, Leica, Wetzlar) mit sechs- bis 40-facher Vergrößerung und eingebauter Koaxial-Beleuchtung.

Es wurden handelsübliche mikrochirurgische Instrumente verwendet. Für sämtliche Ligaturen wurde 6-0 Seide (Resorba™, Nürnberg) benutzt.

Während des gesamten Eingriffs wurden die zur jeweiligen Zeit nicht präparierten Organe mit einer in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Kompresse bedeckt und mit großer Sorgfalt behandelt.

Die Spenderoperation erfolgte im Wesentlichen der Originalbeschreibung von Lee [33] mit einer Modifikation der Gallengangs- und Arterienpräparation (s.u.): Das Abdomen wurde durch eine mediane Laparotomie von Xiphoid bis Blase eröffnet und der Zugang durch beidseits cranio-lateral verlaufende Schnitte bis zum Rippenbogen erweitert. Die so entstandenen Bauchwandlappen wurden mit Kanülen am Korkbrett fixiert. Das Xiphoid wurde mit einer Klemme nach cranial gezogen, die Leber vorsichtig nach caudal und das Ligamentum falciforme bis zur suprahepatischen V. cava inferior durchtrennt. Nach Durchtrennung der linkslateralen Ligamente der Leber wurde die subphrenische Vene unterfahren, doppelt ligiert und durchtrennt. Anschließend wurden die beiden zentralen Leberlappen nach cranial geklappt und der obere Anteil des Lobus caudatus von Bauchfellüberzug befreit, so dass der hepato-ösophageale Plexus doppelt ligiert und durchtrennt werden konnte. Nun erfolgte die vollständige Mobilisation des unteren Teils des Lobus caudatus. Das Intestinum wurde in einer feuchten Kompresse ohne Zug auf der linken Seite neben dem Spendertier gelagert, wodurch die infrahepatische V. cava inferior und der Leberhilus besser erreicht werden konnten. Es folgte die Präparation der infrahepatischen V. cava inferior aus 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

2 Material und Methoden

Pankreas inzidiert und ein etwa 6 mm langer, an beiden Seiten schräg angeschnittener Polyäthylensplint (abgeschnitten aus einer 22 G Venenverweilkanüle (Becton Dickinson, Heidelberg)) zur Hälfte in die entstandene Öffnung eingeführt und mit einer Ligatur fixiert.

Nun erfolgte die Durchtrennung des dorsalen Ligaments der Leber zwischen der V. suprarenalis und der suprahepatischen V. cava inferior. Das Spendertier war somit zur Perfusion mit Konservierungslösung vorbereitet.

Zur Applikation der Vorbehandlung erfolgte nun nach vorsichtiger Präparation der venösen Iliacalbifurkation die Kanülierung der infrahepatischen V. cava inferior kurz oberhalb der Bifurkation mit einer 24 G Venenverweilkanüle (Becton Dickinson, Heidelberg). Nach Entfernung des Mandrains der Kanüle erhielten Tiere der Gruppen G1, G3 und G5 umgehend mittels einer handelsüblichen 10 ml Spritze eine langsame, vorsichtige Injektion von 0,01 ml 21 °C warmen Custodiols[®] /g KG über die platzierte Venenverweilkanüle. Tiere der Gruppen G2, G4 und G6 erhielten zu diesem Zeitpunkt eine entsprechende Injektion von 0,01 ml 21 °C warmen NaCl 0,9% /g KG.

Nach erfolgter Injektion wurde die Venenverweilkanüle kurz vor ihrem Eintritt in die V. cava inferior mit einer Moskitoklemme verschlossen.

Nach einer Wartezeit von 15 Minuten erfolgte dann die Leberperfusion mit kalter Konservierungslösung. 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 Custodiol[®]-Lösung ‚hydrostatisch-passiv‘ über ein Infusionssystem mit Dreiwegehahn perfundiert. Hierbei wurde auf eine jeweils gleiche Höhenlokalisation der Perfusionslösung geachtet.

Nach umgehender 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 2 ml 4°C kalter Custodiol[®] – Lösung gespült. Um die suprahepatische V. cava inferior für die Implantation vorzubereiten, wurde sie nun an ihrer Einmündung in das Zwerchfell abgesetzt und mit einem Prolene[™] 7-0 (Ethicon, Norderstedt) Eckfaden versehen. Daraufhin erfolgte die Entnahme der Leber. Dazu wurde die 16G Venenverweilkanüle

2 Material und Methoden

mittels einer unter lediglich schwacher Spannung stehenden Gefäßklemme an der V. portae leberwärts fixiert und mitsamt Dreivegehahn dort belassen, während die V. portae nun vollständig durchtrennt wurde. Die infrahepatische V. cava wurde nach Entfernen der für die Vorbehandlung genutzten Venenverweilkanüle 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 ein Plastikgefäß mit 4°C kalter Custodiol®-Lösung überführt, hier wurde sie bei 4 °C für sechs Stunden gelagert (kalte Ischämiezeit (CIT) = sechs Stunden).

II.3.3. Empfängeroperation / Leberimplantation

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 verblieb.

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 die Empfängerhepatektomie vorbereitet. Die infrahepatische V. cava wurde oberhalb der rechten Nierenvene, die V. portae distal der Ligatur der präpylorischen Vene mit Mikro-Gefäßklemmen versehen. Darauf folgte das Setzen einer Satinsky-Klemme auf die suprahepatische V. cava inferior unter Mitnahme eines schmalen Zwerchfellsaums. Die Leber wurde nun an den entsprechenden Gefäßen lebernah abgeschnitten, hierbei verblieb die Ligatur auf der V. suprarenalis im Empfängertier. Im Situs wurde nun eine mit physiologischer Kochsalzlösung getränkte Kompresse platziert und die Ratte um 180 Grad gedreht, so dass ihr Kopf nun zum Operateur zeigte.

Da Empfängertiere während der anhepatischen Zeit aufgrund des stark erniedrigten Herzzeitvolumens sehr sensibel auf das Inhalations-Anästhetikum reagieren, konnte die Narkosezufuhr stark vermindert werden ohne ein Aufwachen der Tiere zu riskieren.

2 Material und Methoden

Das zuvor mit 30 ml 4°C kalter physiologischer Kochsalzlösung gespülte Transplantat wurde anatomiegerecht im Situs platziert und es erfolgte die Anastomose der suprahepatischen V. cava inferior mit einer fortlaufenden, mikrochirurgischen so genannten ‚knotenlosen Naht‘ mit Prolene™ 7-0 (Ethicon, Norderstedt), wie beschrieben bei Ariyakhagorn [30]. Nach Fertigstellung dieser Anastomose wurde das Tier wieder in Ausgangslage gedreht. Die beiden Gefäßenden der Pfortader wurden identifiziert und ebenfalls mit der besagten ‚knotenlosen Naht‘ nach Ariyakhagorn [30] diesmal mit Prolene™ 8-0 (Ethicon, Norderstedt) anastomosiert.

Vor Freigabe des portalen Blutstroms und vor Lösung der Satinsky-Klemme wurden die Anastomosen jeweils mit warmer (37 °C) physiologischer Kochsalzlösung bedeckt, um Luftembolien zu vermeiden. Die anhepatische Zeit betrug hierbei durchschnittlich 12-13 Minuten (s. III.1.). Nun erfolgte die Rekonstruktion der infrahepatischen Vena cava inferior in gleicher Weise mit 8-0 Prolene™ (Ethicon, Norderstedt).

Sobald der Blutstrom aus der unteren Körperhälfte wieder freigegeben war, erhöhte sich das Herzzeitvolumen und die intraabdominellen Organe 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 (Becton 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 einer deutlich sichtbaren Pulsation in der gesamten A. hepatica.

Zur Gallengangs Anastomose wurde der Gallengang des Empfängertiers distal eingeschnitten, über den Splint im Gallengang des Transplantats gestülpt und anschließend mit zwei gegenüberliegenden Prolene™ 8-0 (Ethicon, Norderstedt) Einzelknopfnähten fixiert. Abschließend wurde das Abdomen inspiziert und mit warmer physiologischer 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. Noch während der Nachwirkung der Narkose erhielten sie Tramal® (Grünenthal Pharma, Stolberg) 20mg / kg KG zur initialen Schmerzmedikation als subcutane Injektion im Bereich der hüftnahen rechten unteren

Extremität. Nach dem Aufwachen erhielten die Tiere freien Zugang zu Wasser und Futter. Als postoperative Schmerzmedikation wurde dem Trinkwasser verdünntes Metamizol (Novaminsulfon ratiopharm[®], Ulm) beigefügt.

Tiere der Gruppen G3-G6 wurden einmal täglich bis zum jeweiligen Ende des Versuchsvorhabens visitiert und auf etwaige Wundinfektionen oder abnormes Verhalten hin untersucht.

II.3.4. Organentnahme der transplantierten Lebern nach abgelaufener Beobachtungszeit

Je nach Behandlungs- bzw. Kontrollgruppe erfolgte die Organentnahme vier Stunden, zwei oder fünf Tage nach der Transplantation. Hierzu erfolgte in Inhalationsnarkose (s. II.3.1.) die mediane Re-Längslaparotomie mit lateraler Erweiterung, wie bei der Spenderoperation (s. II.3.2.). Mittels zwei Wattepräparationstupfern erfolgte das stumpfe Freilegen der Aortenbifurkation. Hier wurde eine 16 G Venenverweilkanüle (Becton Dickinson, Heidelberg) eingebracht und vorsichtig ca. 10 ml Blut mit einer handelsüblichen 10 ml Spritze aspiriert, bis zur nahezu vollständigen Blutleere des Versuchstieres. Das so gewonnen Blut wurde dann umgehend in entsprechend vorbereitete, auf Eis gekühlte, handelsübliche Heparin-Plasma Röhren überführt. Nun erfolgte das zügige Herausschneiden des Transplantats durch Abschneiden aller Anastomosen. Die eine Hälfte der so entnommenen Leber wurde in Eppendorff-Gefäßen in flüssigem Stickstoff umgehend ‚Schock gefroren‘, und dann bei -80°C bis zur weiteren Analyse (s. II.5.) gelagert. Die andere Hälfte wurde in einer handelsüblichen Einbettkassette in ein mit 4%igem Formalin vorgefülltes Plastikgefäß überführt. Nach 24 Stunden wurde das Formalin gegen 70%-iges Ethanol ausgetauscht und im Verlauf das fixierte Präparat entsprechend zur histologischen Analyse durch Parafinisierung aufbereitet (s. II. 6.).

II.4. Messung der Transaminasen AST/ALT, der LDH und des Bilirubins

Die während der Organentnahme der transplantierten Lebern asservierten Blutproben wurden noch am selben Tag zur weiteren Analyse in das Zentrallabor des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Campus Virchow Klinikum gebracht und die entsprechenden Analysen bzgl. AST, ALT, LDH, Bilirubin T und D dort durchgeführt. Der Umgang mit Blutproben von Versuchstieren ist dort etabliert.

II.5. Messung der MMP-Aktivität mittels Gelatin-Zymografie

II.5.1. Die Messmethode Zymografie

Bei der Zymografie handelt es sich um eine elektrophoretische Methode zum direkten, quantitativen Nachweis von Matrix-Metalloproteinasen (z.B. MMP 2 (ca. 68 kDa) und MMP-9 (ca.83 kDa), auch Gelatinase A und B genannt) sowie deren Zymogene pro-MMP-9 (ca. 92 kDa) und pro-MMP-2 (ca. 72 kDa).

Entgegen der ‚normalen‘ Gelelektrophorese enthält das spezielle Gelatin-Zymografie-Gel 0,03% Gelatine. Die Gelatinasen sind unter nicht reduzierenden Bedingungen in der Lage, die Gelatine abzubauen. Dadurch zeigen sich nach der Elektrophorese im mit Coomassie-blue gefärbten Gel entfärbte Banden, die densitometrisch ausgewertet werden können [34, 35].

II.5.2. Aufbereitung der Leberproben und Proteinextraktion

Ca. 100 mg in Flüssigstickstoff schockgefrorenes Gewebe der jeweils entnommenen Rattenleber wurde in kaltem Ripa-Puffer[®] (Fa. Boehringer, Mannheim) mit zugesetztem Proteinase-Inhibitor-Cocktail (complete Protease Inhibitor Cocktail[®], Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ca. 30 Sekunden homogenisiert und lysiert. Die Lysate wurden bei 20.000 g zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand pipettiert und die Pellets verworfen.

Mittels der Bicinchoninsäure (BCA) Methode [36] erfolgte nun die Gesamtprotein Bestimmung und die Lysate wurden auf die gleiche Proteinkonzentration sowie das gleiche Gesamtvolumen eingestellt.

II.5.3. Gelelektrophorese

Jeweils 20 µg Probe wurde in 10%-ige SDS-Polyacrylamidgele mit 0,03% Gelatine (Ready Gel Zymogram Gels[®], Fa. Biorad, München) aufgetragen. Als interne positiv-Kontrolle wurde Zellüberstand konditionierter humaner Fibrosarkomzellen (HT 1080) verwendet. Dieser enthält reichlich MMP-2 und proMMP-9 [37, 38].

Die Elektrophorese wurde mittels eines Biorad MiniProtean II System[®] (Fa. Biorad, München) mit einer kurzen Einlaufzeit mit 80 Volt, anschließend einer ca. zweistündigen Laufzeit mit 110 Volt durchgeführt.

Durch die Elektrophorese wurden die Proteine zunächst nach ihrer Größe proportional der SDS-Anlagerung getrennt. Nun wurden die Gele zweimal 20 Minuten in 2.5 %

2 Material und Methoden

Triton-X-100 ‚geschaukelt‘ und hernach viermal zehn Minuten in aqua bidest. gewaschen.

II.5.4. Entwicklung, Färbung und densitometrische Messung

Durch *dreitägige* Inkubation der Gele in CaCl_2 -haltigem Entwicklungspuffer (Tab. 3) wurden die in den Proben enthaltenen Matrix-Metalloproteinasen bei 37°C aktiviert und unter reduzierenden Bedingungen in die Lage versetzt, die in den Gelen enthaltene Gelatine abzubauen.

In einem Liter aqua dest. gelöst, pH 7,4:
6.05 g Tris
8.766 g NaCl
1,47 g CaCl_2
20 ml Brij 35 Solution 1 %

Tabelle 3: Entwicklungspuffer.

Anschließend wurde mit Triton-X-100[®] (Fa. Sigma-Aldrich, München) das SDS verdrängt. Nach gründlichem Waschen mit aqua bidest. wurden alle Proteine im Gel durch Coomassie Brilliant Blue[®] (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt (Einwirkzeit ca. zwei Stunden) und hernach mit der Coomassie-Destaining-Methode (Einwirkzeit der Destaining-Lösung ca. 2 Stunden, mehrfaches Wechseln der Lösung während des Klärungsvorgangs durch Absaugen) geklärt. Die Gele wurden nun abfotografiert (s. Abb. 1)

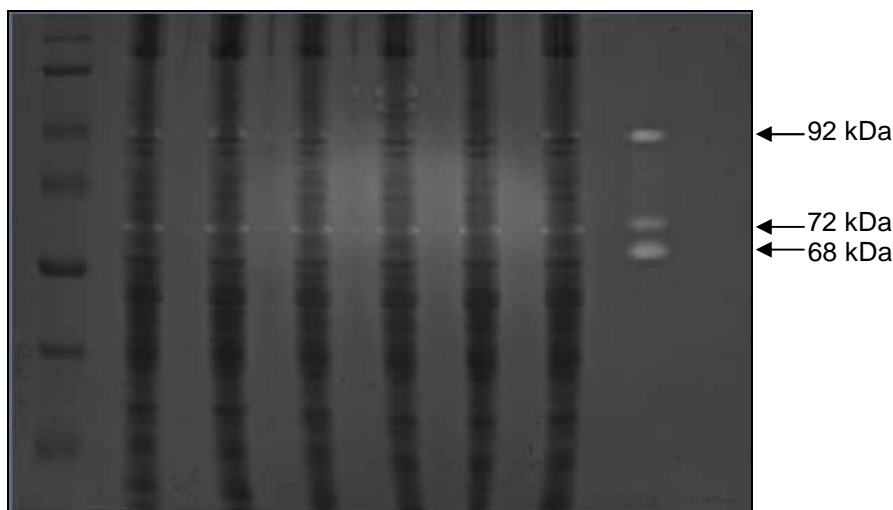


Abbildung 1: Beispiel eines fertigen Zymografie-Gels. Die Banden der sechs Tiere dieser Gruppe sind gut zu erkennen. Ganz Links im Bild ein Größenmarker, ganz rechts im Bild die interne Positivkontrolle mit Banden für 92 kDa (pro-MMP9), 72 kDa (pro-MMP2) und 68 kDa (MMP2).

und in Cellophanfolie getrocknet, sowie mittels eines Densitometers (GS 800 calibrated densitometer[®], Biorad Laboratories, England) und der entsprechenden Software (Quantity one[®], Fa. Biorad, England) ausgewertet.

Hierbei wurde – wegen der *Entfärbung* – darauf geachtet die Banden invers auszuwerten: Starke Banden = starke Entfärbungen = hohe Aktivität = hohe optische Dichte.

Die optische Dichte (OD) wurde in ‚arbitrary units‘ (AU) angegeben und als parametrische Daten der statistischen Auswertung und grafischen Darstellung zugeführt.

II.6. Histologische Analyse

Die Histologische Beurteilung erfolgte an auf Glasobjekträger aufgezogenen und gefärbten Gewebeschnitten. Als Routinefärbung wurde die Hämatoxilin-Eosin-(HE) Färbung verwendet. Hämatoxilin ist ein basischer Farbstoff in saurer Lösung, der in den Schnitten alle sauren Komponenten wie Zellkerne und saure Schleimsubstanzen bläulich anfärbt. Basische Strukturen, wie Zytoplasma, Kollagene und Proteine werden durch das Eosin rosa bis rot gegen gefärbt.

Die in Paraffin eingebetteten Lebern wurden mittels eines Rotationsmikrotoms in 2-4 µm dünne Schnitte überführt. Diese wurden dann entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe bewässert. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte 10-20 Minuten in Harris Hämatoxilin gefärbt und anschließend 20 Minuten in angesäuertem Leitungswasser (pH < 3) gebläut. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mittels Eosin für ca. 2-3 Minuten, woraufhin sich eine kurze Spülung und eine über eine aufsteigende Alkoholreihe erfolgte Entwässerung anschloss. Zum Schluss wurden die gefärbten Schnitte mit lösemittelhaltigem Eindeckmittel als Dauerpräparate eingedeckt.

Die Histologische Beurteilung erfolgte verblindet durch einen Pathologen mit spezieller Expertise in der Beurteilung von Rattenlebern. Anhand eines semiquantitativen Scores wurden Werte von 0-3 (0= keine, 3 stärkste Ausprägung) bezüglich der sechs folgenden Merkmale vergeben: Nekrose, Apoptose, Abräumungsknötchen,

Gallengangsproliferate, portale Infiltrate, Mitosen. Bzgl. der Nekrose-Formation bedeutete dies 0=keine Nekrosen, 1= weniger als 5% Nekrosen, 2= 5% Nekrosen, 3= mehr als 5% Nekrosen. Zur weiteren Beurteilung des Gesamtschadens innerhalb der jeweiligen Behandlungs- bzw. Kontrollgruppe erfolgte noch die Berechnung des Gesamt-Punktwerts (0-18) hinsichtlich aller histologischen Merkmale, sowie zur Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen die Bildung des jeweiligen Gruppenmedians (0-18). (s.a. Ergebnisteil III.5.)

II.7. Statistische Analyse

Sämtliche statistischen Analysen sowie grafischen Darstellungen der Daten erfolgten unter Verwendung von SigmaPlot 2004 for Windows, Version 9.0 (Systat Software Inc., San José, CA, USA).

Parametrische Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$), ordinale Daten als Median und Range ($x; x-x$) dargestellt. Für statistische Tests wurde ein Niveau von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen, sowie in den Abbildungen entsprechend mit unterschiedlichen Indizes (z.B. *) gekennzeichnet. Bei parametrischen Daten erfolgte die Testung auf Signifikanz mittels des bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen üblichen t-tests, bzw. bei Vergleichen zwischen mehreren Gruppen mittels ‚one-way ANOVA‘ und post-hoc Holm-Sidak Methode; bei ordinalen Daten mittels des ‚Mann-Whitney-Rank-Sum- Tests‘.

III. Ergebnisse

III.1. Spender- und Empfängertierdaten

III.1.1. Überleben der Empfängertiere

Das Gesamtüberleben der Empfängertiere in allen Untersuchungsgruppen betrug bis zum jeweiligen Abschluss der Untersuchung 100%.

III.1.2. Kalte Ischämie-Zeit

Die kalte Ischämiezeit betrug im Mittel für G1 $6,00\pm 0,00$ h; für G2 $5,91\pm 0,26$ h; für G3 $5,98\pm 0,26$ h; für G4 $6,38\pm 0,60$ h; für G5 $6,26\pm 0,46$ h und für G6 $5,76\pm 0,31$ h. Es ergaben sich mittels one-way ANOVA keine signifikanten Unterschiede. Somit lagen hinsichtlich dieses Parameters für alle Gruppen die gleichen Bedingungen vor (s. Abb.2).

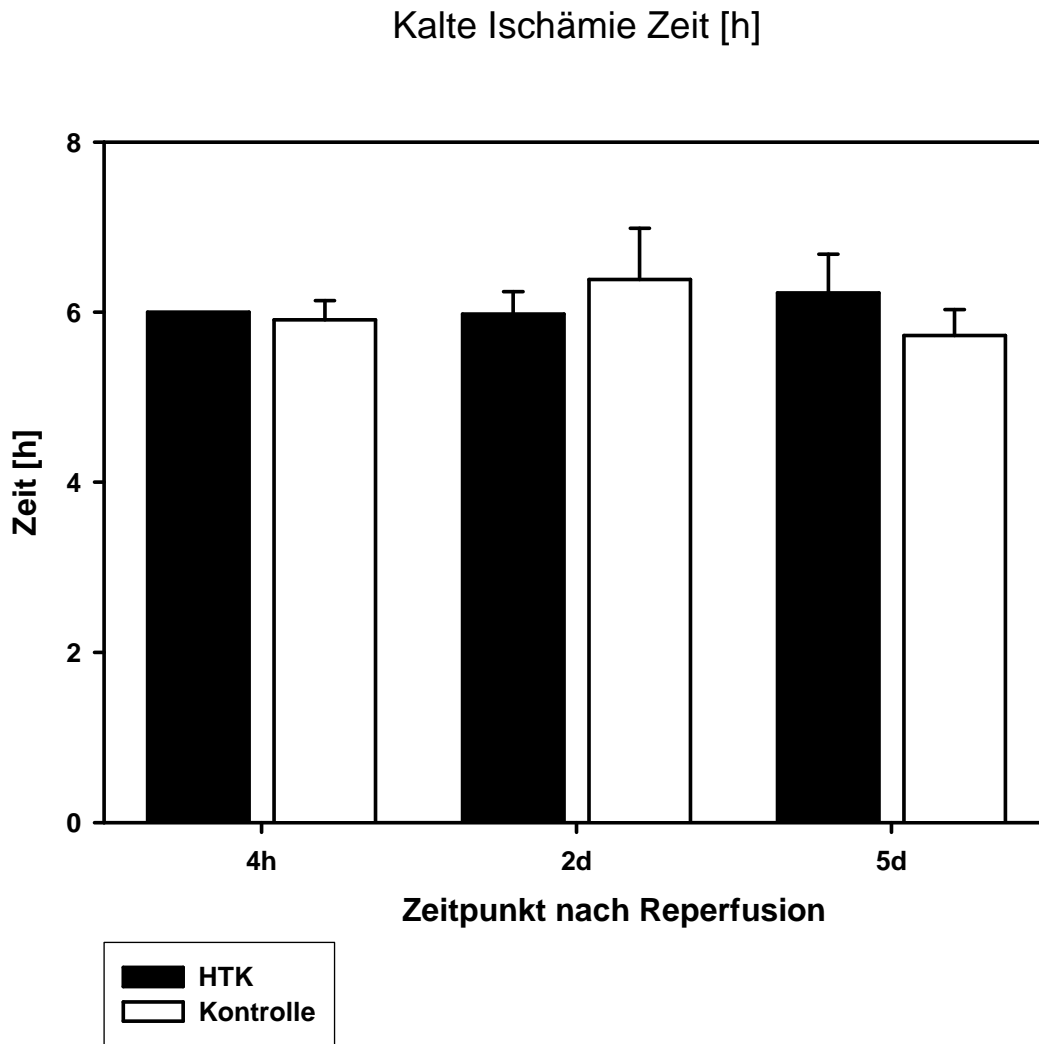


Abbildung 2: Die kalte Ischämie Zeit. Dargestellt sind die jeweiligen Untersuchungsgruppen (G1 und G2 bei 4h) (G3 und G4 bei 2d) (G5 und G6 bei 5d) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren CIT (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppen als schwarze Balken, die Kontrollgruppen als weiße Balken. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

III.1.3. Die anhepatische Zeit:

Die anhepatische Zeit betrug im Mittel für G1 $12,51 \pm 0,74$ min; für G2 $13,48 \pm 2,38$ min; für G3 $12,34 \pm 0,84$ min; für G4 $12,72 \pm 0,88$ min; für G5 $12,81 \pm 1,10$ min und für G6 $12,26 \pm 1,50$ min. Es ergaben sich mittels one-way ANOVA keine signifikanten Unterschiede. Somit lagen hinsichtlich dieses Parameters für alle Gruppen die gleichen Bedingungen vor (s. Abb 3).

3 Ergebnisse

Anhepatische Zeit [min]

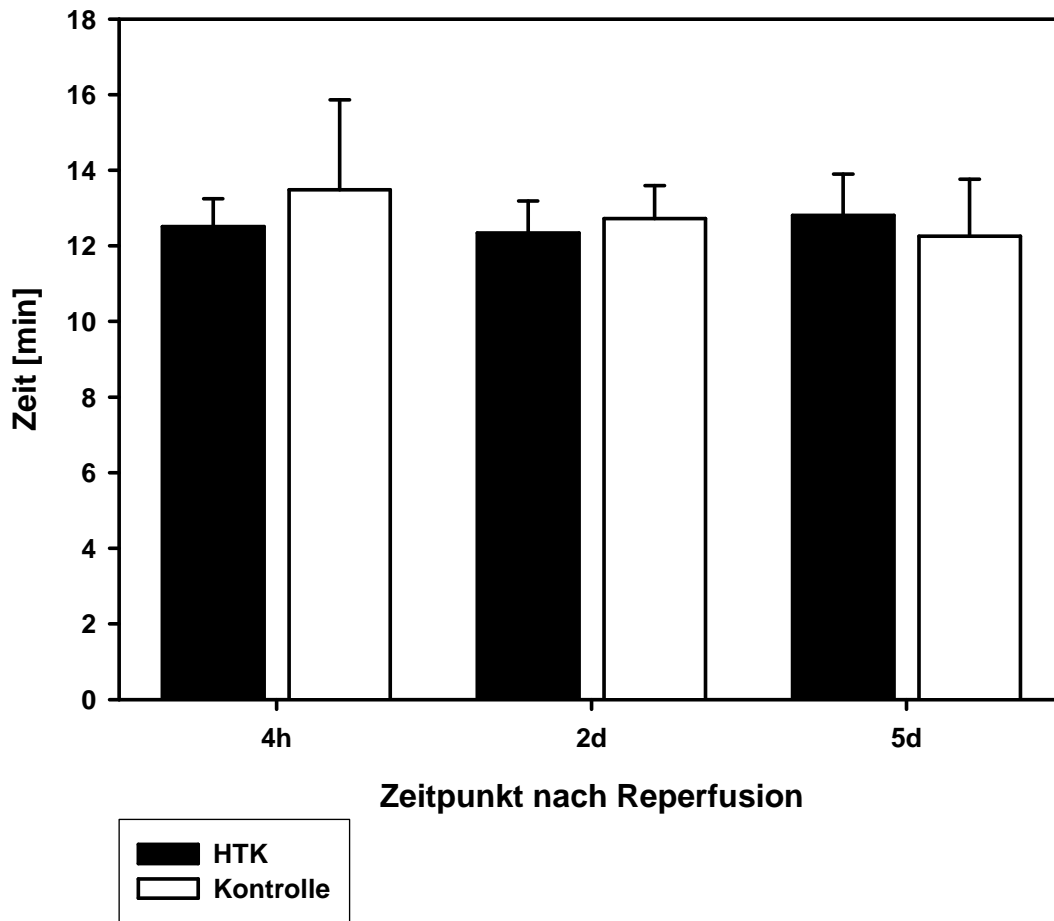


Abbildung 3: Die anhepatische Zeit. Dargestellt sind die jeweiligen Untersuchungsgruppen (G1 und G2 bei 4h) (G3 und 4 bei 2d) (G5 und G6 bei 5d) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren anhepatischen Zeit (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppen als schwarze Balken, die Kontrollgruppen als weiße Balken. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

III.1.4. Die Spender/Empfänger-Gewichts-Ratio

Die Spender/Empfänger-Gewichts-Ratio wurde durch Bildung des Quotienten aus Spendergewicht (g) und Empfängergewicht (g) berechnet. Es ergab sich somit ein dimensionsloses Verhältnis. Sie betrug im Mittel für G1 $0,90 \pm 0,15$; für G2 $0,95 \pm 0,07$; für G3 $0,98 \pm 0,05$; für G4 $0,94 \pm 0,04$; für G5 $1,01 \pm 0,05$ und für G6 $0,93 \pm 0,06$. Es ergaben sich mittels one-way ANOVA keine signifikanten Unterschiede. Somit lagen hinsichtlich dieses Parameters für alle Gruppen die gleichen Bedingungen vor (s.Abb 4).

Spender/Empfänger-Gewichts-Ratio

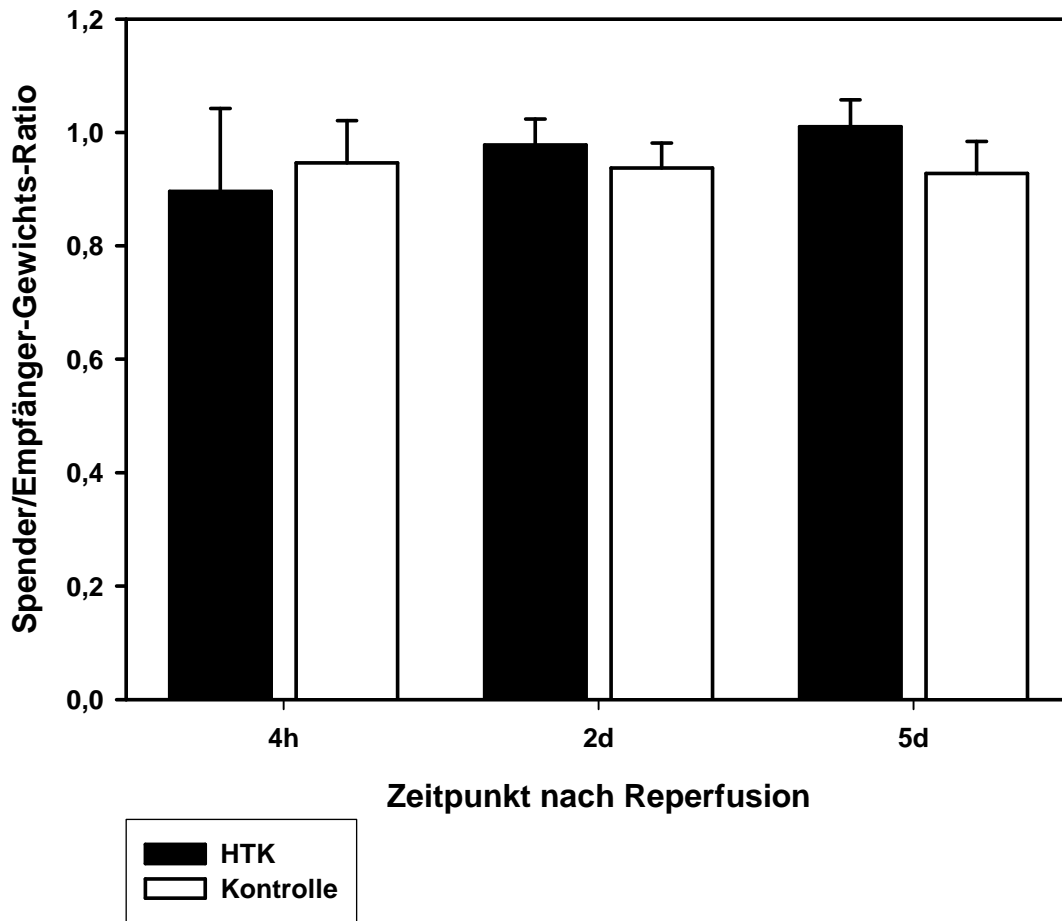


Abbildung 4: Die Spender/Empfänger-Gewichts-Ratio. Dargestellt sind die jeweiligen Untersuchungsgruppen (G1 und G2 bei 4h) (G3 und G4 bei 2d) (G5 und G6 bei 5d) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe berechneten mittleren Spender/Empfänger-Gewichts-Ratio (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppen als schwarze Balken, die Kontrollgruppen als weiße Balken. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

III.2. Leberschädigungsparameter: Transaminasen und Laktatdehydrogenase

Insgesamt zeigten sich nur für den Zeitpunkt vier Stunden nach Reperfusion signifikant niedrigere Werte in der HTK-Vorbehandlungsgruppe G1 gegenüber der Kontrollgruppe G2 bzgl. der Alanin-Aminotransferase und der Laktatdehydrogenase. Zu den anderen Zeitpunkten und bei der Aspartat-Aminotransferase konnten zwar Trends zu niedrigeren Werten in den Behandlungsgruppen, jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede gefunden werden:

3 Ergebnisse

III.2.1. Aspartat-Aminotransferase (AST):

Vier Stunden nach Reperfusion ergab sich in der Gruppe G1 eine niedrigere ($1900 \pm 1228 \text{ U/l}$) AST als in Gruppe G2 ($3811 \pm 1921 \text{ U/l}$), dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,067$, t-test); Zwei Tage nach Reperfusion wurde in Gruppe G3 eine niedrigere ($162 \pm 48 \text{ U/l}$) AST als in Gruppe G4 ($203 \pm 49 \text{ U/l}$) gemessen, ebenfalls nicht signifikant ($p=0,175$, t-test) und fünf Tage nach Reperfusion betrug die AST in Gruppe G5 ($113 \pm 66 \text{ U/l}$) im Vergleich zu ($176 \pm 197 \text{ U/l}$) in Gruppe G6, hier lag ebenfalls kein signifikanter Unterschied vor ($p=0,818$, t-test). (s. Abb. 5-7)

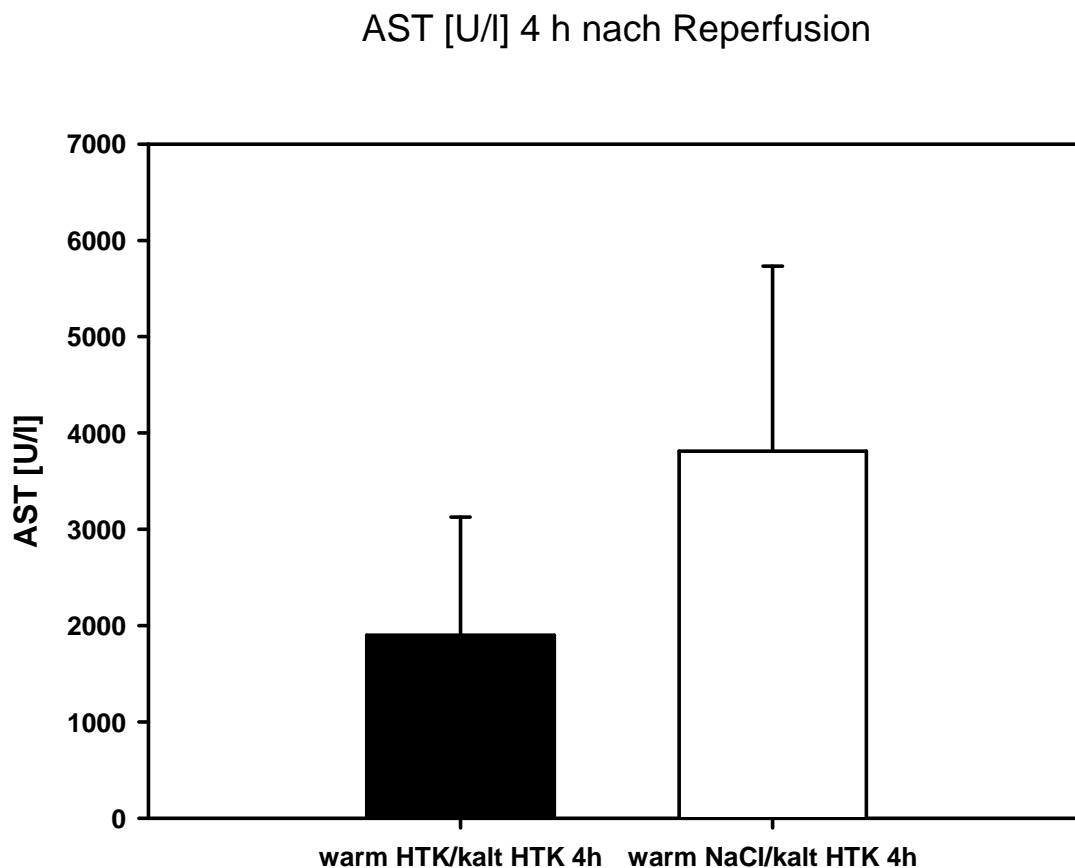


Abbildung 5: Die Aspartataminotransferase (AST) vier Stunden nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G1) und die Kontrollgruppe (G2) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren AST (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

3 Ergebnisse

AST [U/l] 2d nach Reperfusion

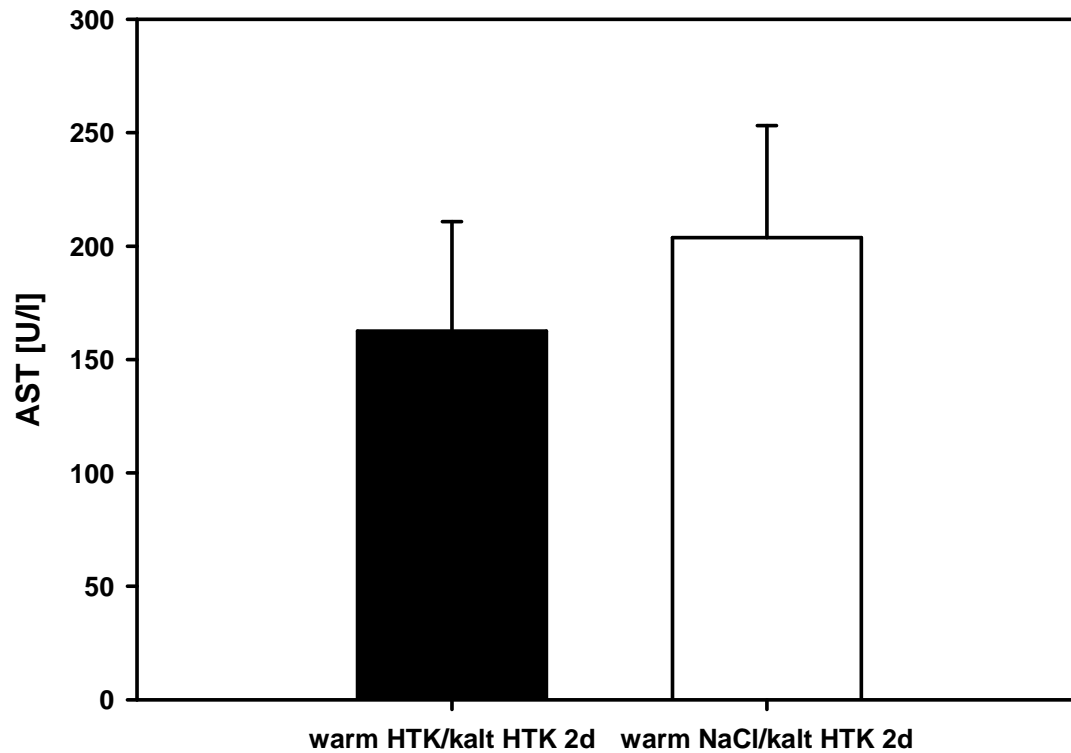


Abbildung 6. Die Aspartataminotransferase (AST) zwei Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G3) und die Kontrollgruppe (G4) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren AST (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

AST [U/l] 5d nach Reperfusion

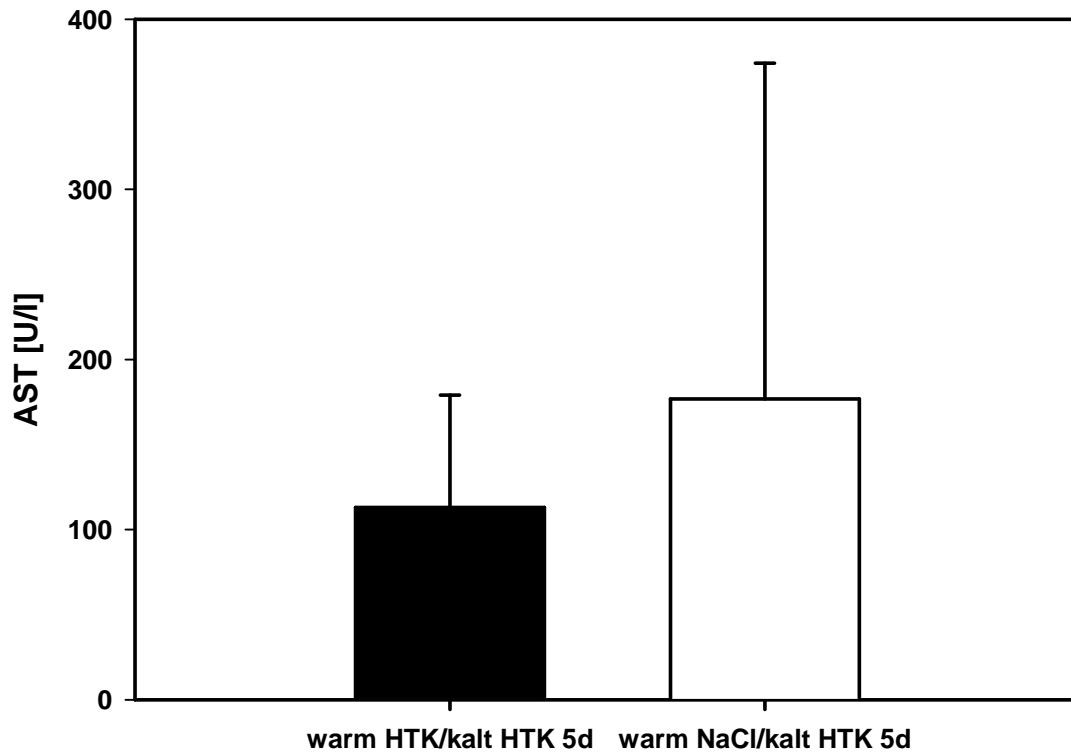


Abbildung 7: Die Aspartataminotransferase (AST) fünf Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G5) und die Kontrollgruppe (G6) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren AST (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lagen keine signifikanten Unterschiede vor.

III.2.2. Alanin-Aminotransferase (ALT):

Vier Stunden nach Reperfusion konnten für die ALT signifikant unterschiedliche Werte zwischen HTK-Vorbehandlungsgruppe G1 ($789 \pm 339 \text{ U/l}$) und Kontrollgruppe G2 ($2505 \pm 1131 \text{ U/l}$) gemessen werden ($p=0,005$, t-test). Zwei bzw. fünf Tage nach Reperfusion bestanden zwischen den Gruppen G3 ($78 \pm 21 \text{ U/l}$) und G4 ($117 \pm 47 \text{ U/l}$) ($p=0,095$, t-test), bzw. G5 ($56 \pm 38 \text{ U/l}$) und G6 ($64 \pm 49 \text{ U/l}$) hingegen keine messbaren signifikanten Unterschiede mehr ($p=0,818$, t-test) (Abb. 8 bis 10)

3 Ergebnisse

ALT 4 h nach Reperfusion

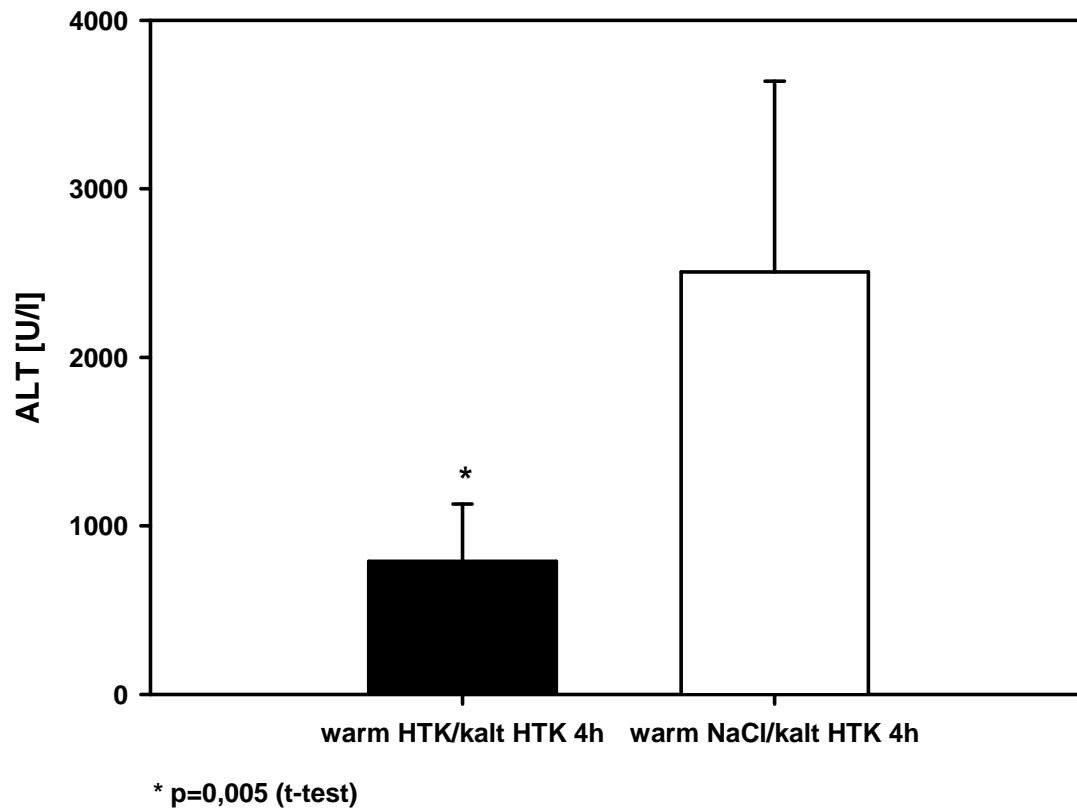


Abbildung 8: Die Alaninaminotransferase (ALT) vier Stunden nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G1) und die Kontrollgruppe (G2) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren ALT (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag ein mit * gekennzeichnete signifikanter Unterschied vor.

ALT [U/l] 2d nach Reperfusion

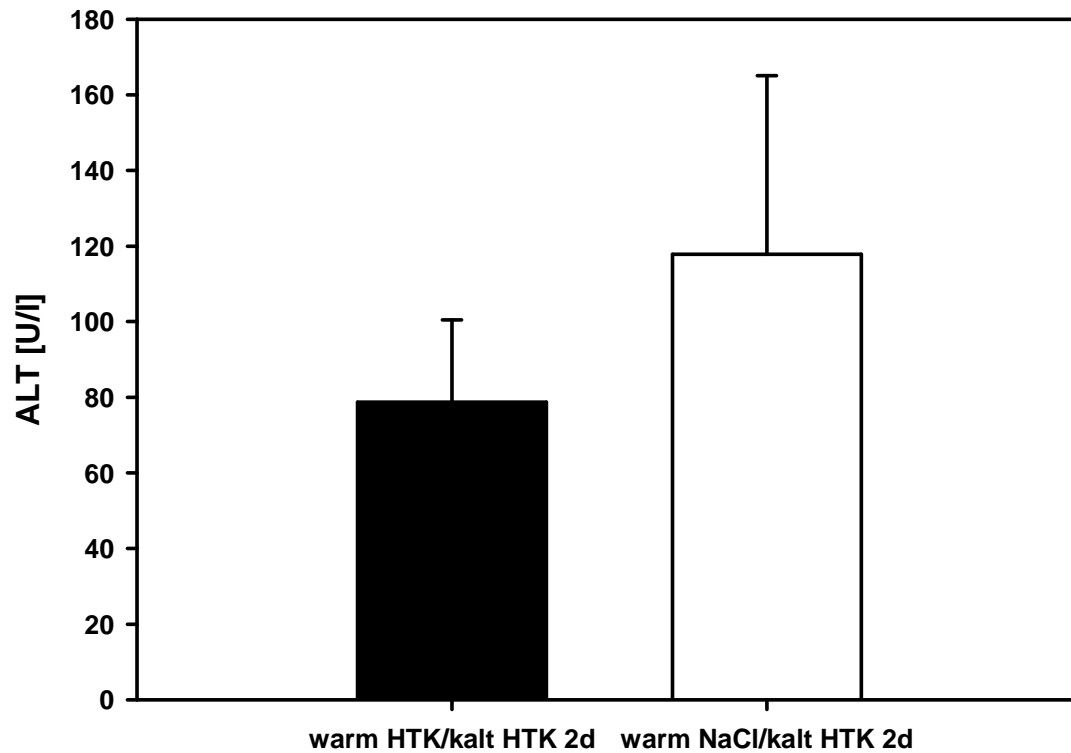


Abbildung 9: Die Alaninaminotransferase (ALT) zwei Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G3) und die Kontrollgruppe (G4) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren ALT (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

ALT [U/l] 5d nach Reperfusion

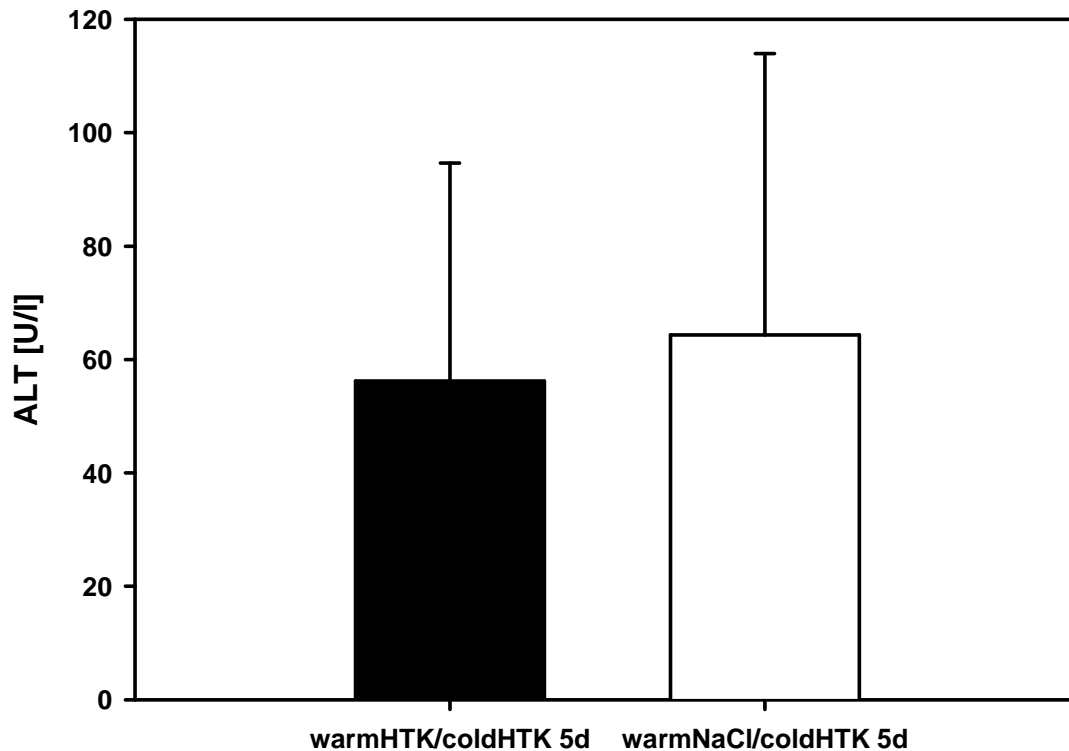


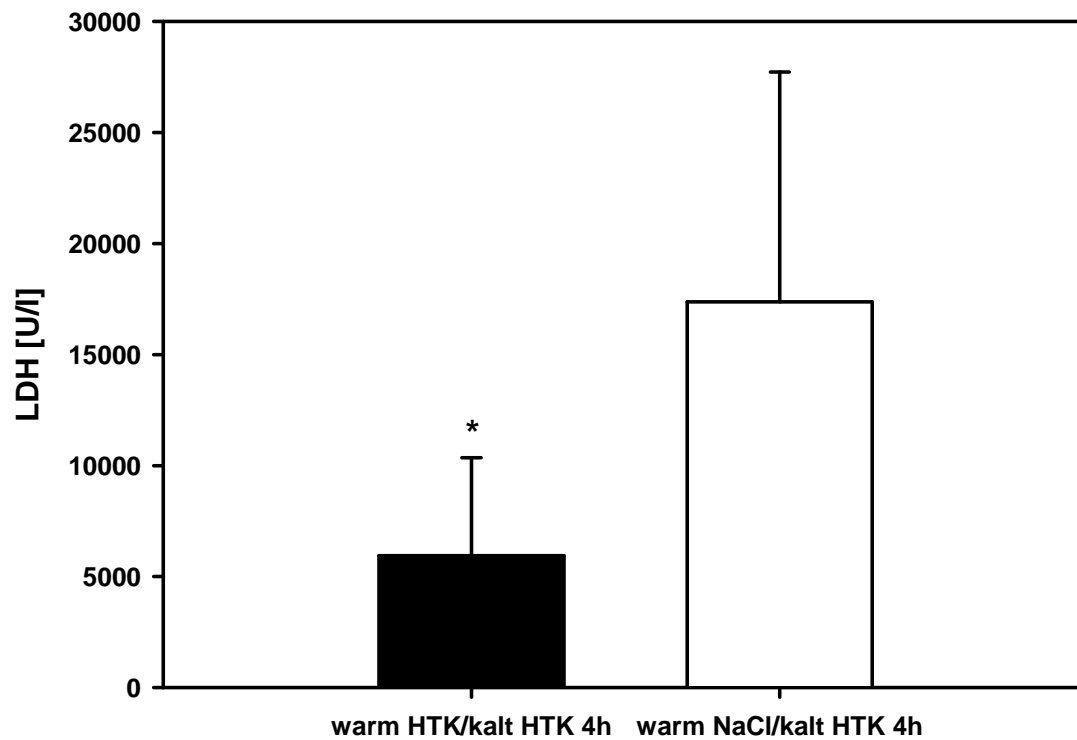
Abbildung 10: Die Alaninaminotransferase (ALT) fünf Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G5) und die Kontrollgruppe (G6) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren ALT (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

III.2.3. Laktatdehydrogenase (LDH):

Vier Stunden nach Reperfusion fanden sich für die LDH signifikant niedrigere Werte in G1 ($5938 \pm 4415 \text{ U/l}$) verglichen mit G2 ($17383 \pm 10346 \text{ U/l}$), ($p=0,035$, t-test). Zwei und fünf Tage nach Reperfusion bestanden keine Signifikanzen mehr: G3 ($590 \pm 526 \text{ U/l}$) vs. G4 ($265 \pm 149 \text{ U/l}$), ($p=0,390$, t-test) und G5 ($457 \pm 216 \text{ U/l}$) vs. G6 ($479 \pm 387 \text{ U/l}$), ($p=0,906$, t-test) (s. Abb. 11-13).

3 Ergebnisse

LDH [U/l] 4 h nach Reperfusion



* $p=0,035$ (t-test)

Abbildung 11: Die Laktatdehydrogenase (LDH) vier Stunden nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G1) und die Kontrollgruppe (G2) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren LDH (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag ein mit * gekennzeichnete signifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

LDH [U/l] 2 d nach Reperfusion

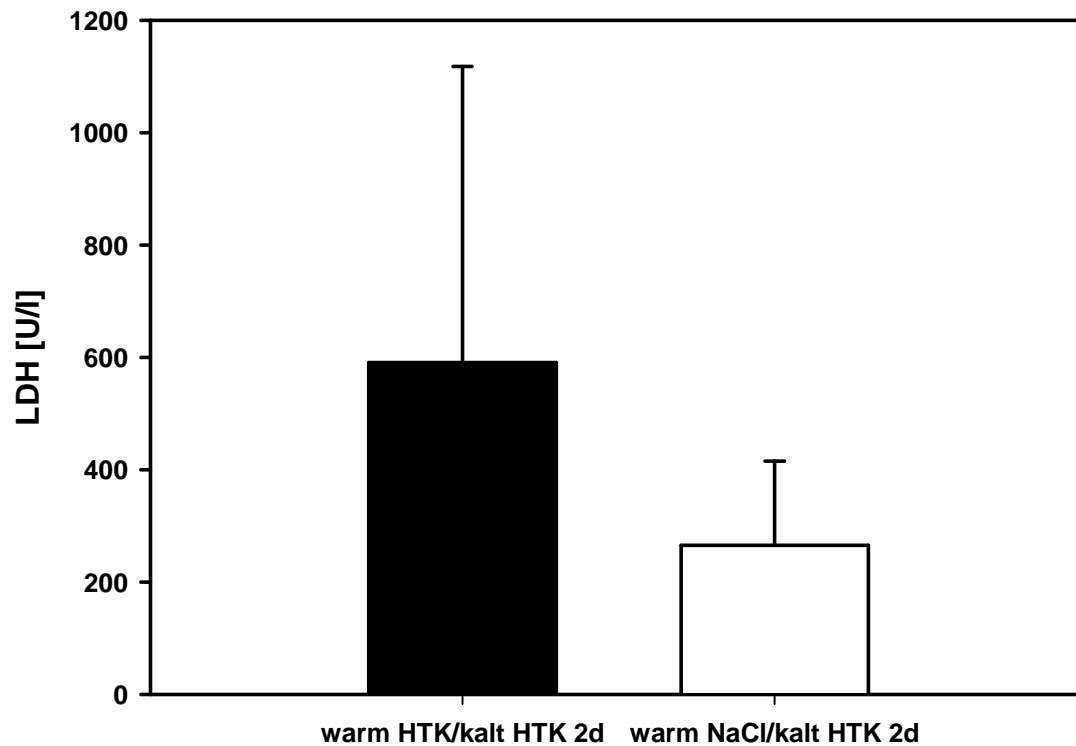


Abbildung 12: Die Laktatdehydrogenase (LDH) zwei Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G3) und die Kontrollgruppe (G4) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren LDH (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

LDH [U/l] 5d nach Reperfusion

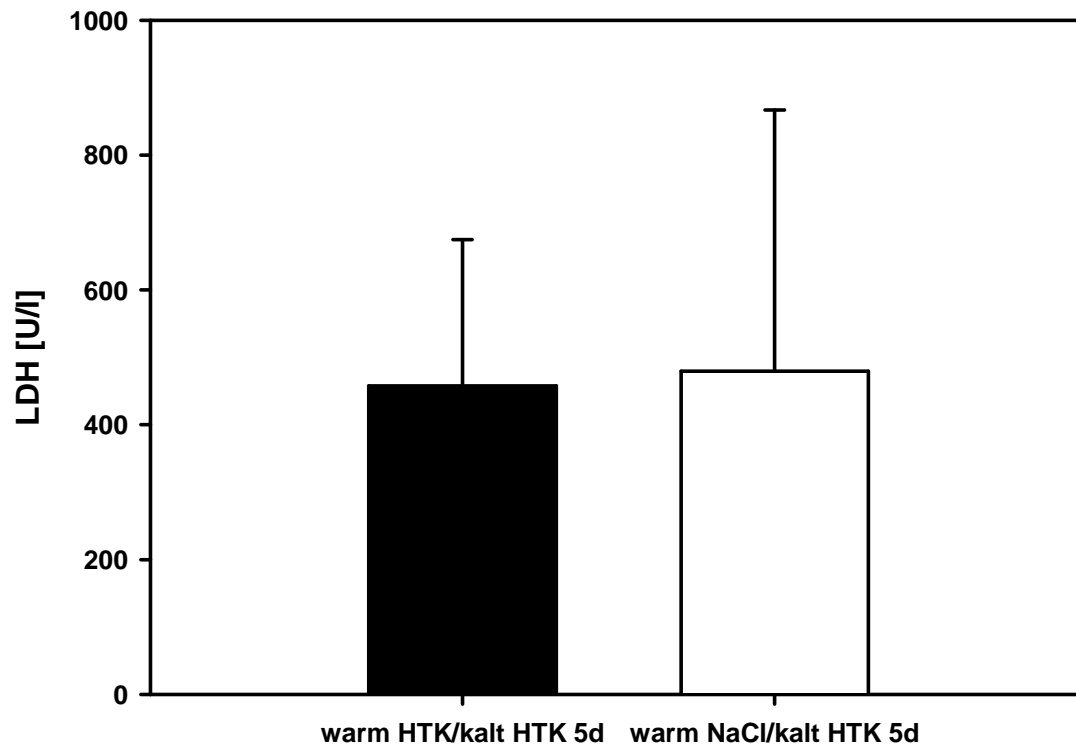


Abbildung 13: Die Laktatdehydrogenase (LDH) fünf Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G5) und die Kontrollgruppe (G6) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren LDH (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

III.3. Bilirubin T und Bilirubin D

Bezüglich des Bilirubin T und D ergaben sich weder pathologische Werte noch signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen (s. Tab.4). Insgesamt zeigten sich zwei und fünf Tage nach Reperfusion geringere Bilirubin-Werte in den Vorbehandlungsgruppen gegenüber den Kontrollgruppen, ohne Signifikanz.

	4h		2d		5d	
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Bili T	0,48±0,59	0,45±0,54	0,10±0,00	0,33±0,57	0,40±0,59	0,53±0,65
Bili D	0,33±0,36	0,28±0,28	0,10±0,00	0,27±0,41	0,23±0,28	0,38±0,44

Tabelle 4: Totales und Direktes Bilirubin (Mittelwert ± SD) im Plasma in den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen. Alle Werte sind in mg/dl angegeben. Es lagen weder pathologische Werte noch signifikante Unterschiede vor (G1 vs. G2, G3 vs. G4 und G5 vs. G6, $p > 0,05$, t-test).

III.4. Matrixmetalloproteinase-Aktivität

In den Gelen fanden sich nach der Zymografie an drei Stellen auswertbare Banden, welche anhand einer internen Kontrolle, als Banden von pro-MMP2, MMP-2 und pro-MMP-9 identifiziert werden konnten. Für MMP-9 konnte somit nur das Zymogen pro-MMP-9 nachgewiesen werden. Zwischen sowie innerhalb der Behandlungs- und Kontrollgruppen ergaben sich signifikante Unterschiede in der Expression der unterschiedlichen MMPs (s.u.).

III.4.1.1. pro-MMP-2

Vier Stunden nach Reperfusion fand sich im Lebergewebe der HTK-vorbehandelten Gruppe G1 ($0,027 \pm 0,007$ AU) eine – nahezu – gleich hohe pro-MMP-2-Aktivität wie in der entsprechenden Kontrollgruppe G2 ($0,026 \pm 0,009$ AU) (s. Abb. 14). Nach zwei Tagen zeigte sich in den Lebern der Vorbehandlungs-Gruppe G3 ($0,025 \pm 0,009$ AU) eine signifikant ($p = 0,031$, t-test) niedrigere pro-MMP-2 Aktivität, als in der diesbezüglichen

3 Ergebnisse

Kontrollgruppe G4 ($0,036 \pm 0,006 \text{ AU}$) (s. Abb. 15). Nach fünf Tagen konnte erneut eine signifikant ($p=0,029$, t-test) niedrigere pro-MMP-2 Aktivität in der HTK-vorbehandelten Gruppe G5 ($0,020 \pm 0,007 \text{ AU}$) im Vergleich zur Kontrollgruppe G6 ($0,046 \pm 0,024 \text{ AU}$) gemessen werden. (s. Abb.16)

proMMP-2, 4 h nach Reperfusion

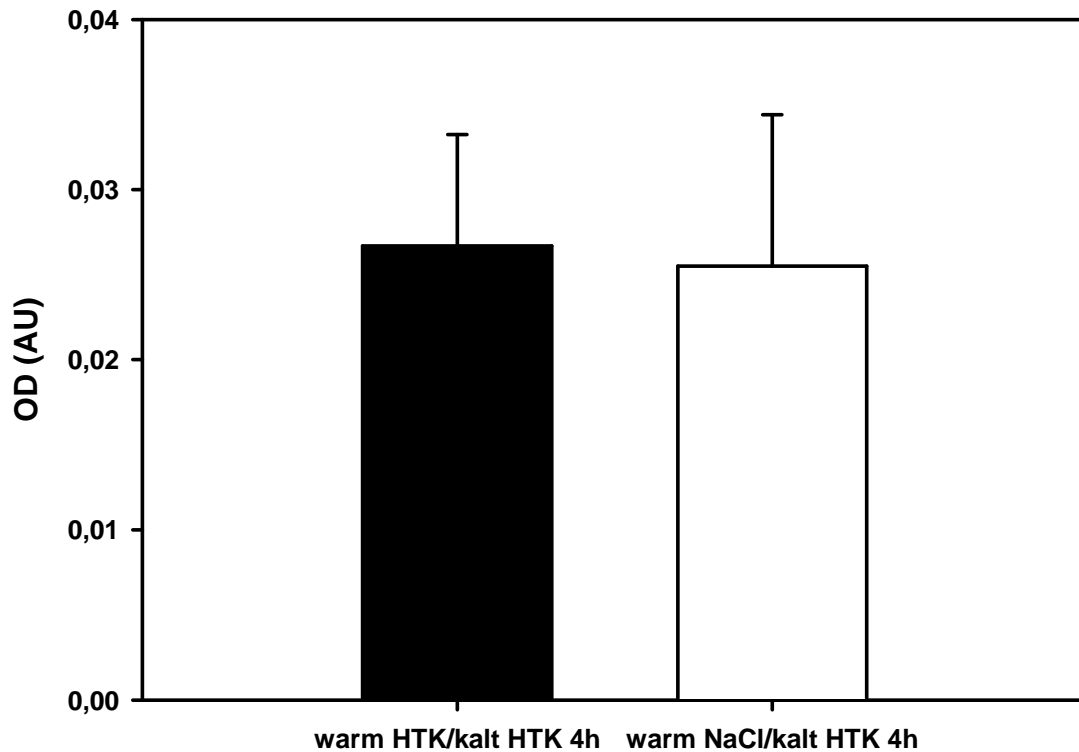


Abbildung 14: Die pro-MMP-2 Aktivität vier Stunden nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G1) und die Kontrollgruppe (G2) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

proMMP-2, 2d nach Reperfusion

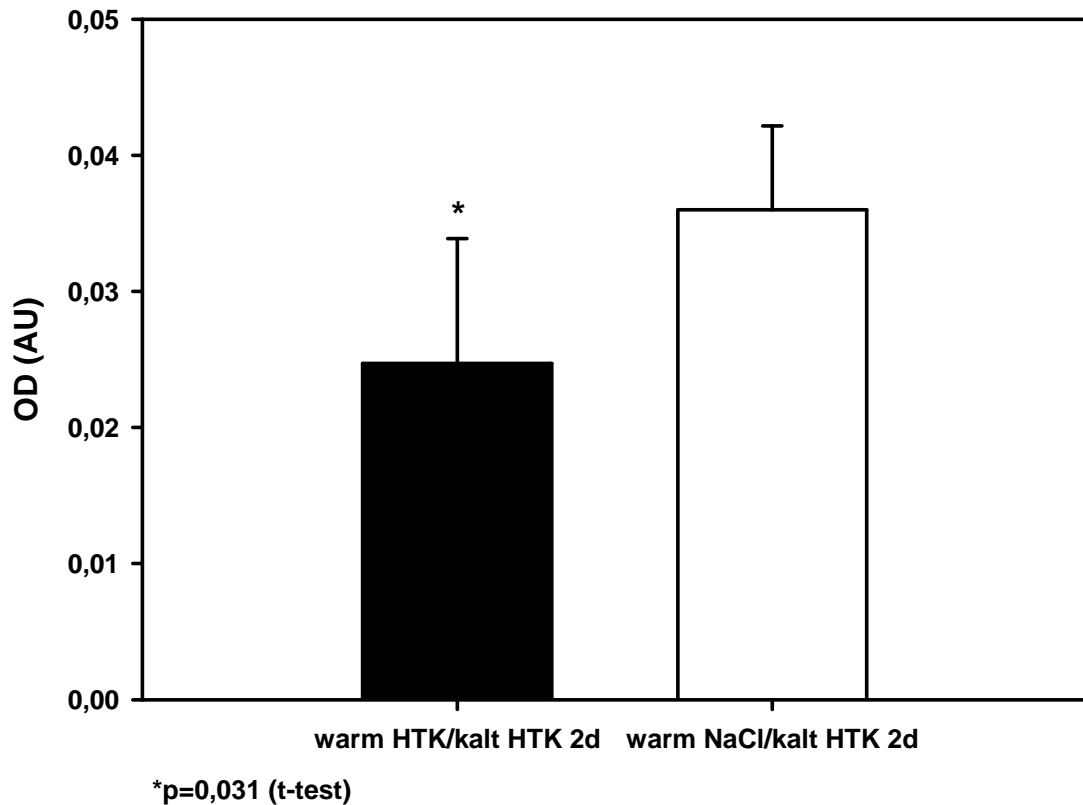


Abbildung 15: Die pro-MMP-2 Aktivität zwei Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G3) und die Kontrollgruppe (G4) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität, gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag ein mit * gekennzeichnete signifikanter Unterschied vor.

proMMP-2, 5d nach Reperfusion

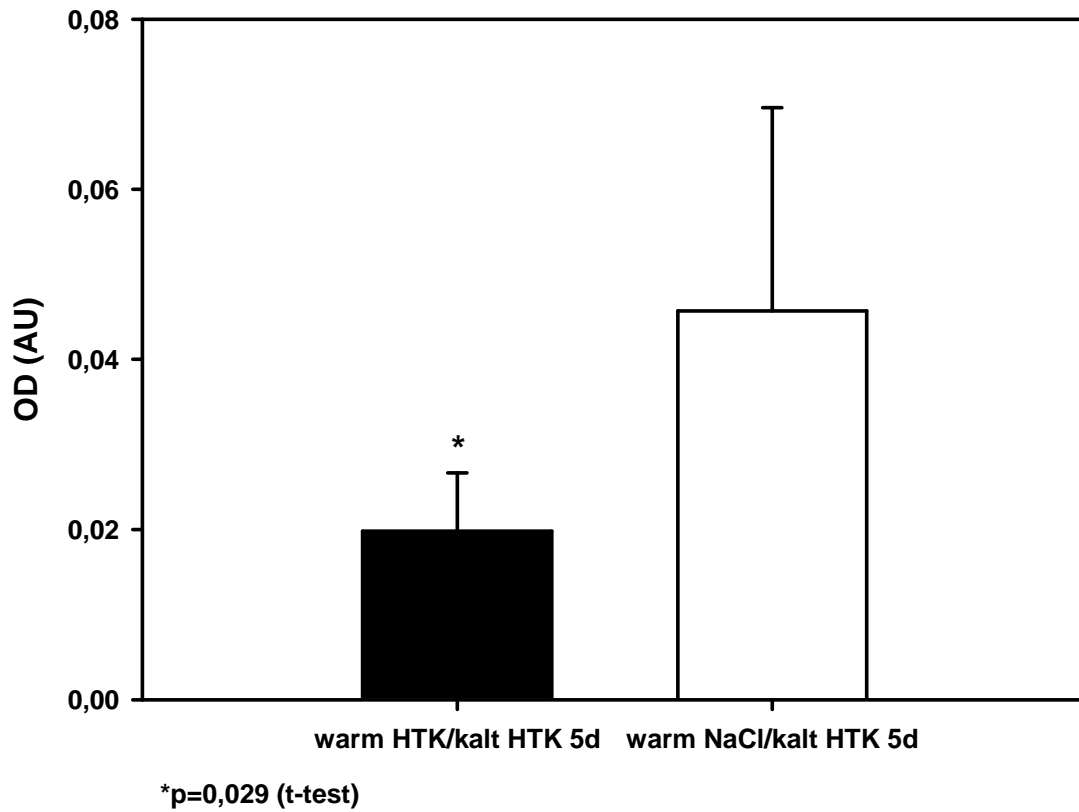


Abbildung 16: Die pro-MMP-2 Aktivität fünf Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G5) und die Kontrollgruppe (G6) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität, gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag ein mit * gekennzeichnete signifikanter Unterschied vor.

III.4.1.2. Zeitlicher Verlauf der pro-MMP-2

Zur Verdeutlichung der zeitlichen Dynamik der pro-MMP-2 Aktivität erfolgt hier noch einmal die grafische Darstellung der bereits einzeln zu den drei verschiedenen Beobachtungszeitpunkten beschriebenen Werte. Während die Kontrollgruppenwerte einen kontinuierlichen, jedoch in einer one-way ANOVA Analyse (G2 vs. G4 vs. G6) nicht signifikanten ($p=0,084$) Anstieg der pro-MMP2 Aktivität über die Zeit zeigten, erwies sich die pro-MMP2 Aktivität innerhalb der HTK-vorbehandelten Tiere (G1 vs. G3 vs. G5, one-way ANOVA $p=0,307$) als eher konstant bis leicht abfallend über die Zeit (s. II.4.1.1. und Abb. 17).

Zeitlicher Verlauf pro MMP2

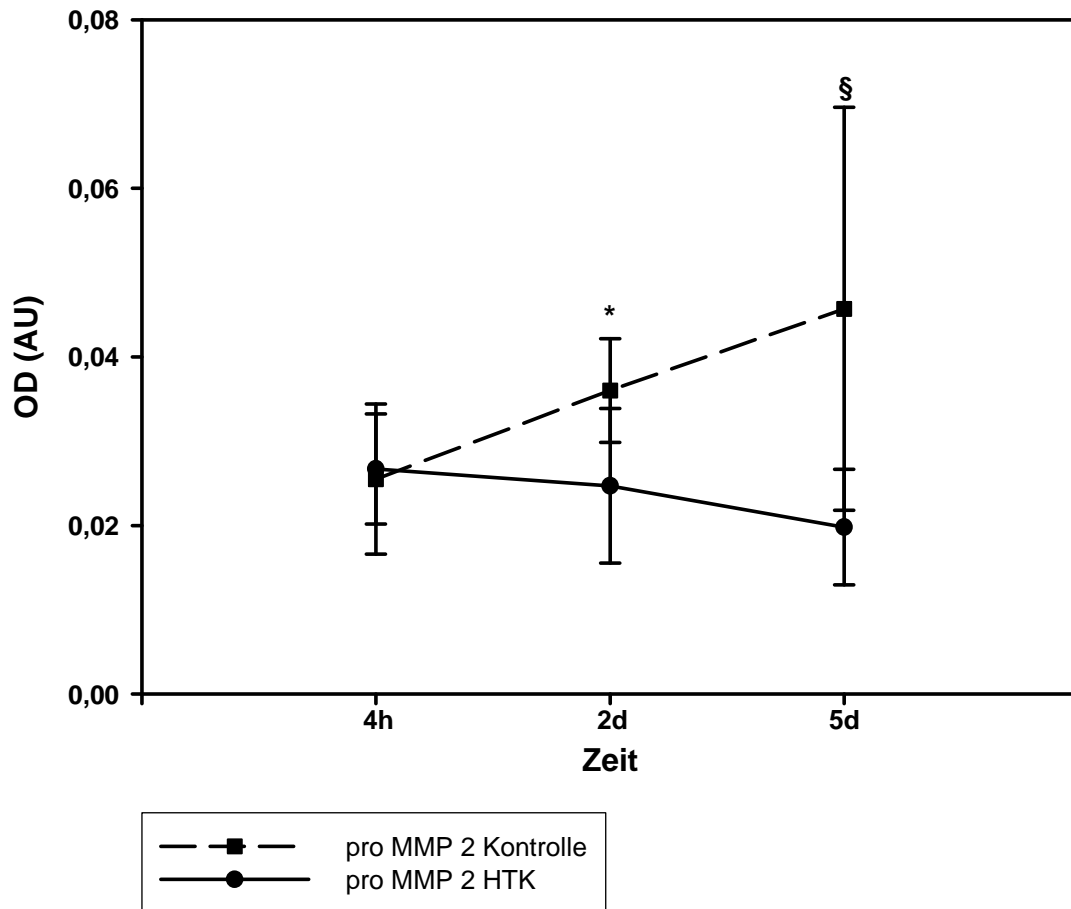


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf von pro-MMP-2. Dargestellt ist die mittlere gemessene optische Dichte (OD) (\pm SD) zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt. Die HTK-Vorbehandlungsgruppen als Kreise verbunden mit einer durchgezogenen Linie, die Kontrollgruppen als Quadrate verbunden mit einer gestrichelten Linie. Mit * ($p=0,031$, t-test) und § ($p=0,029$, t-test) gekennzeichnet sind die bereits in Abb. 15 und 16 dargestellten signifikanten Unterschiede zwischen HTK-Vorbehandlungs- und Kontrollgruppen (G3 vs. G4 und G5 vs. G6).

III.4.2.1 MMP-2

Nach vier Stunden zeigte sich in der HTK-Vorbehandlungsgruppe G1 eine MMP-2 Aktivität von ($0,016\pm 0,005$ AU) gegenüber einer Aktivität von ($0,020\pm 0,009$ AU) in der Kontrollgruppe G2 und somit zwar ein geringerer Mittelwert, jedoch keine Signifikanz ($p=0,792$, t-test). (s. Abb.18) Nach zwei Tagen wurde in der Behandlungsgruppe G3 ($0,015\pm 0,006$ AU) eine signifikant niedrigere MMP-2 Aktivität im Vergleich zu der

3 Ergebnisse

entsprechenden Kontrollgruppe G4 ($0,026 \pm 0,010 \text{ AU}$) gemessen ($p=0,035$, t-test) (s. Abb. 19). Nach fünf Tagen erneut geringere, jedoch nicht signifikant ($p=0,126$, t-test) erniedrigte Aktivität der MMP-2 in der HTK-vorbehandelten Gruppe G5 ($0,016 \pm 0,007 \text{ AU}$) vs. Kontrollgruppe G6 ($0,031 \pm 0,016 \text{ AU}$) (s. Abb.20).

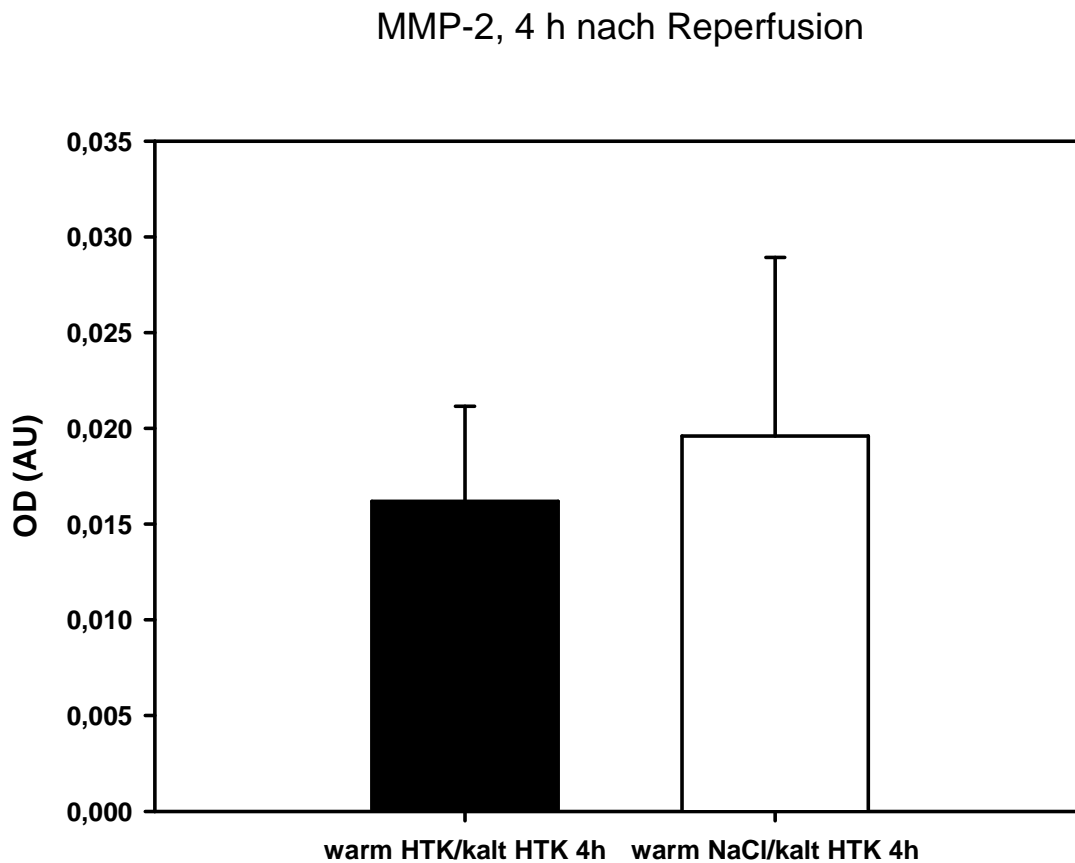


Abbildung 18: Die MMP-2 Aktivität vier Stunden nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G1) und die Kontrollgruppe (G2) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität, gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

MMP-2, 2 d nach Reperfusion

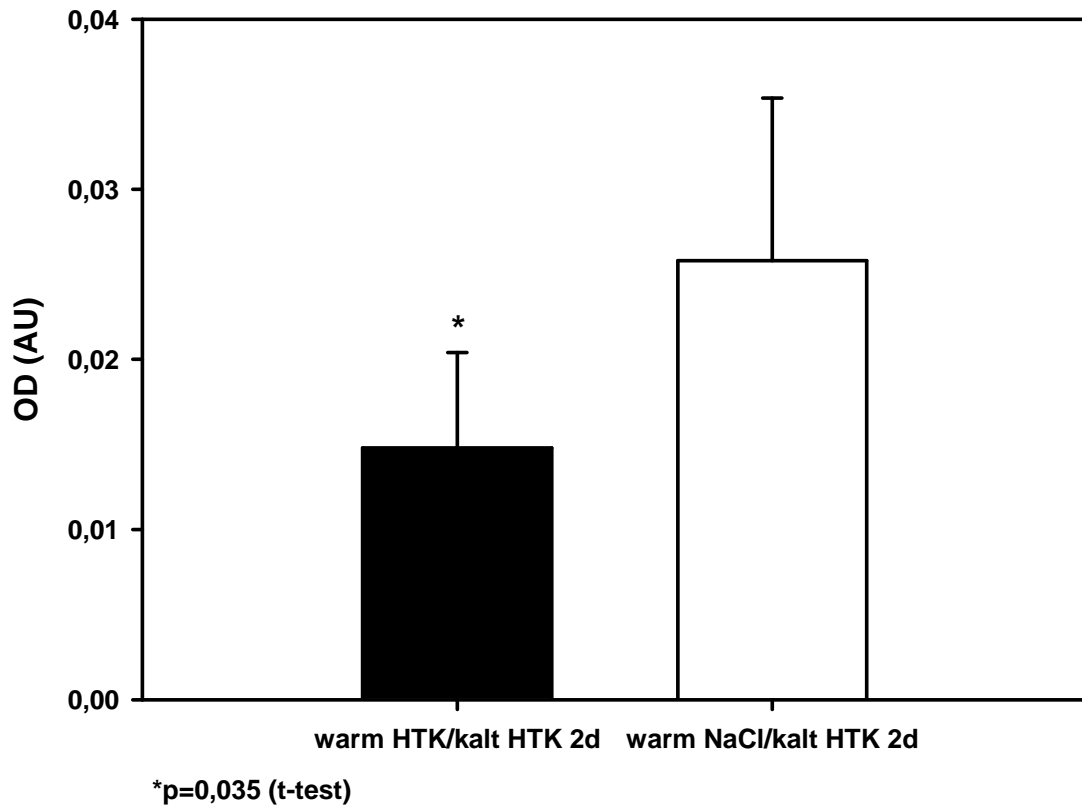


Abbildung 19: Die MMP-2 Aktivität zwei Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G3) und die Kontrollgruppe (G4) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität, gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag ein mit * gekennzeichnete signifikanter Unterschied vor.

MMP-2, 5d nach Reperfusion

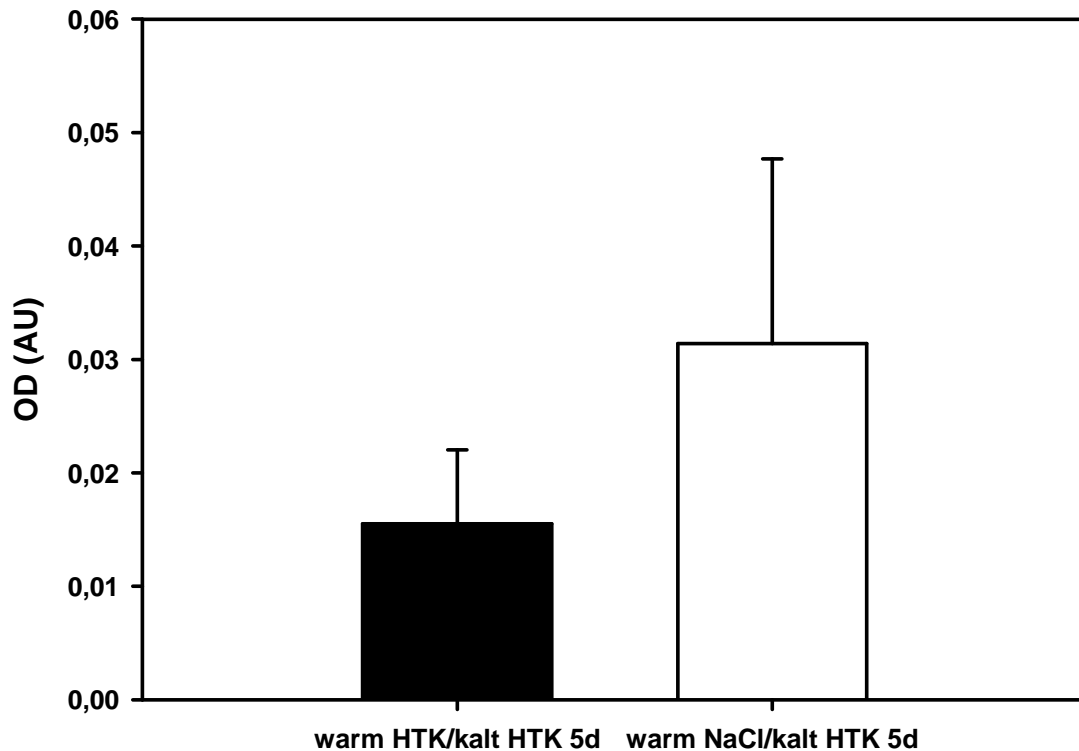


Abbildung 20: Die MMP-2 Aktivität fünf Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G5) und die Kontrollgruppe (G6) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität, gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

III.4.2.2 Zeitlicher Verlauf der MMP-2

Zur Verdeutlichung der zeitlichen Dynamik der MMP-2 Aktivität erfolgt hier noch einmal die grafische Darstellung der bereits einzeln zu den drei verschiedenen Beobachtungszeitpunkten beschriebenen Werte. Es ergibt sich in etwa das gleiche Bild wie beim zeitlichen Verlauf der pro-MMP-2. Während die Kontrollgruppenwerte einen kontinuierlichen, jedoch in einer one-way ANOVA Analyse (G2 vs. G4 vs. G6) nicht signifikanten ($p=0,328$) Anstieg der MMP-2 Aktivität über die Zeit zeigten, erwies sich die MMP-2 Aktivität innerhalb der HTK-vorbehandelten Tiere (G1 vs. G3 vs. G5, one-way ANOVA $p=0,200$) als eher konstant über die Zeit (s. II.4.2.1. und Abb. 21).

Zeitlicher Verlauf von MMP-2

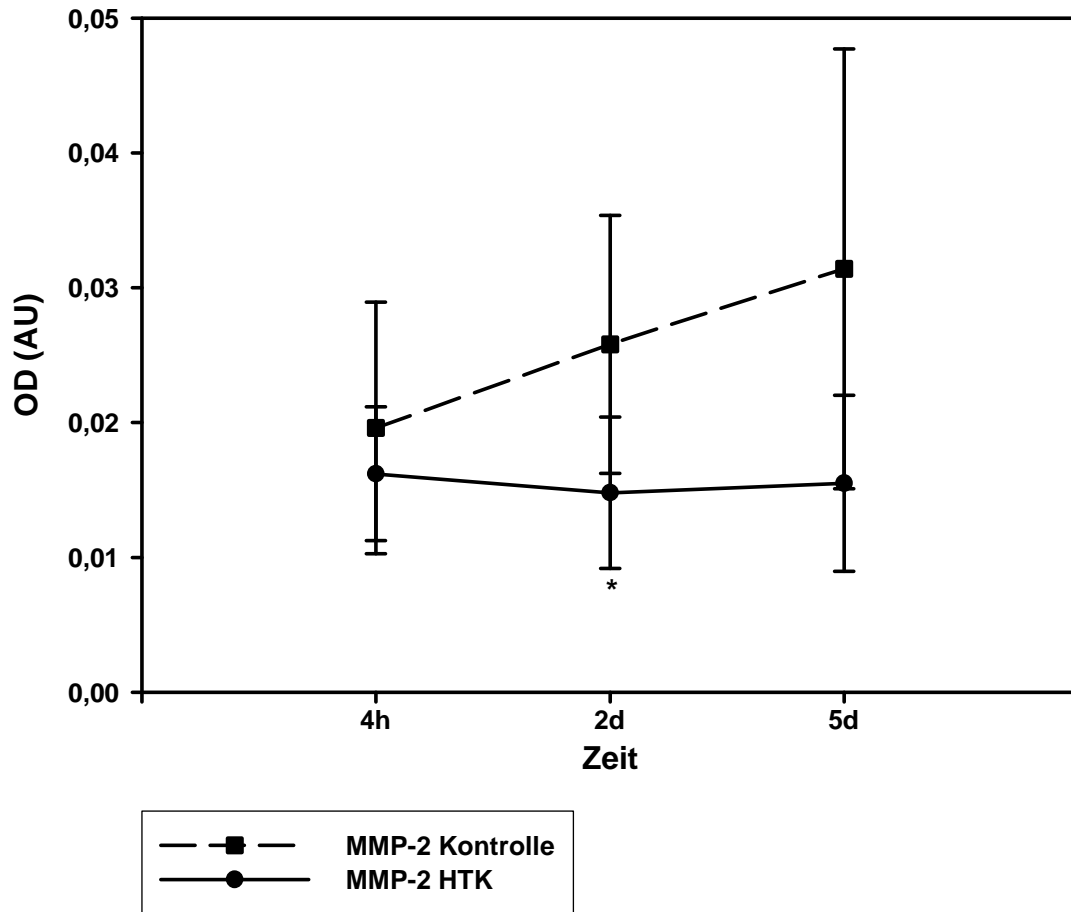


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der MMP-2. Dargestellt ist die mittlere gemessene optische Dichte (OD) (\pm SD) zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt. Die HTK-Vorbehandlungsgruppen als Kreise verbunden mit einer durchgezogenen Linie, die Kontrollgruppen als Quadrate verbunden mit einer gestrichelten Linie. Mit * ($p=0,035$, t-test) gekennzeichnet der bereits in Abb. 19 dargestellte signifikante Unterschied zwischen Kontroll- (G4) und HTK-Vorbehandlungsgruppe (G3) zwei Tage nach Reperfusion.

III.4.3.1 pro-MMP-9

Vier Stunden nach Reperfusion ergab sich in der HTK-vorbehandelten Gruppe G1 ($0,031 \pm 0,008$ AU) eine signifikant ($p=0,001$, t-test) höhere pro-MMP-9 Aktivität als in der entsprechenden Kontrollgruppe G2 ($0,013 \pm 0,003$ AU). Nach zwei Tagen hingegen wurde in der HTK-vorbehandelten Gruppe G3 ($0,014 \pm 0,005$ AU) eine signifikant ($p=0,027$, t-test) niedrigere pro-MMP-9 Aktivität gemessen als in der Kontrollgruppe G4

3 Ergebnisse

($0,033 \pm 0,013$ AU). Nach fünf Tagen zeigte sich weiterhin eine niedrigere pro-MMP-9 Aktivität in der Behandlungsgruppe G5 ($0,019 \pm 0,007$ AU) im Vergleich zur Kontrollgruppe G6 ($0,024 \pm 0,010$ AU), dies war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,311$, t-test) (s. Abb. 22 bis 24)

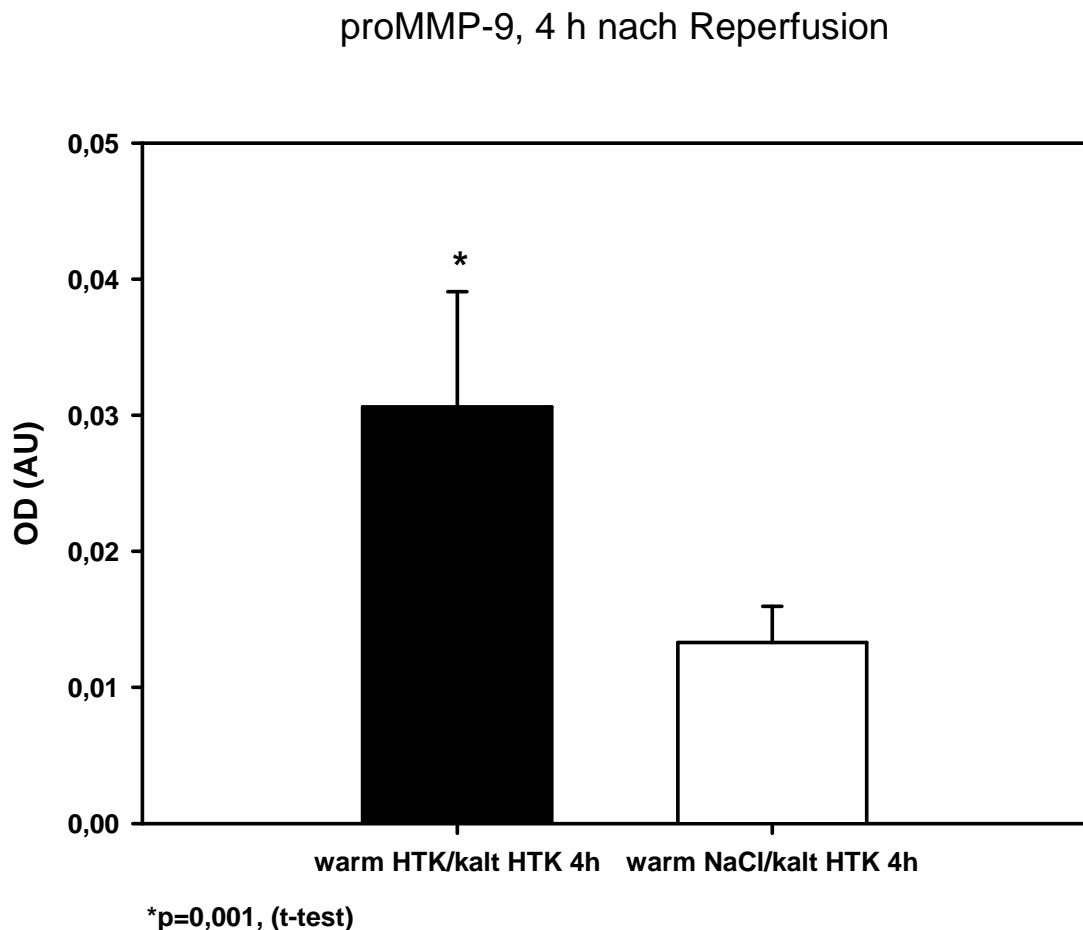


Abbildung 22: Die pro-MMP-9 Aktivität vier Stunden nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G1) und die Kontrollgruppe (G2) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität, gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag ein mit * gekennzeichnete signifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

proMMP-9, 2 d nach Reperfusion

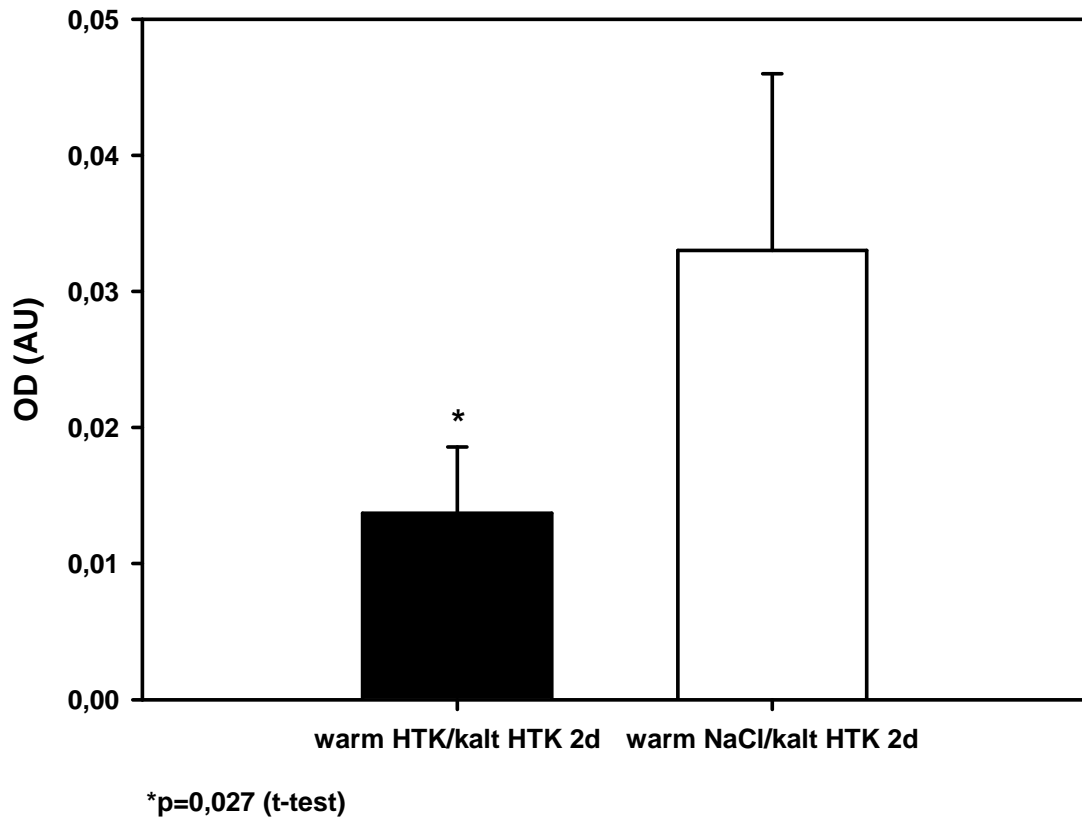


Abbildung 23: Die pro-MMP-9 Aktivität zwei Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G3) und die Kontrollgruppe (G4) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität, gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag ein mit * gekennzeichnete signifikanter Unterschied vor.

proMMP-9, 5 d nach Reperfusion

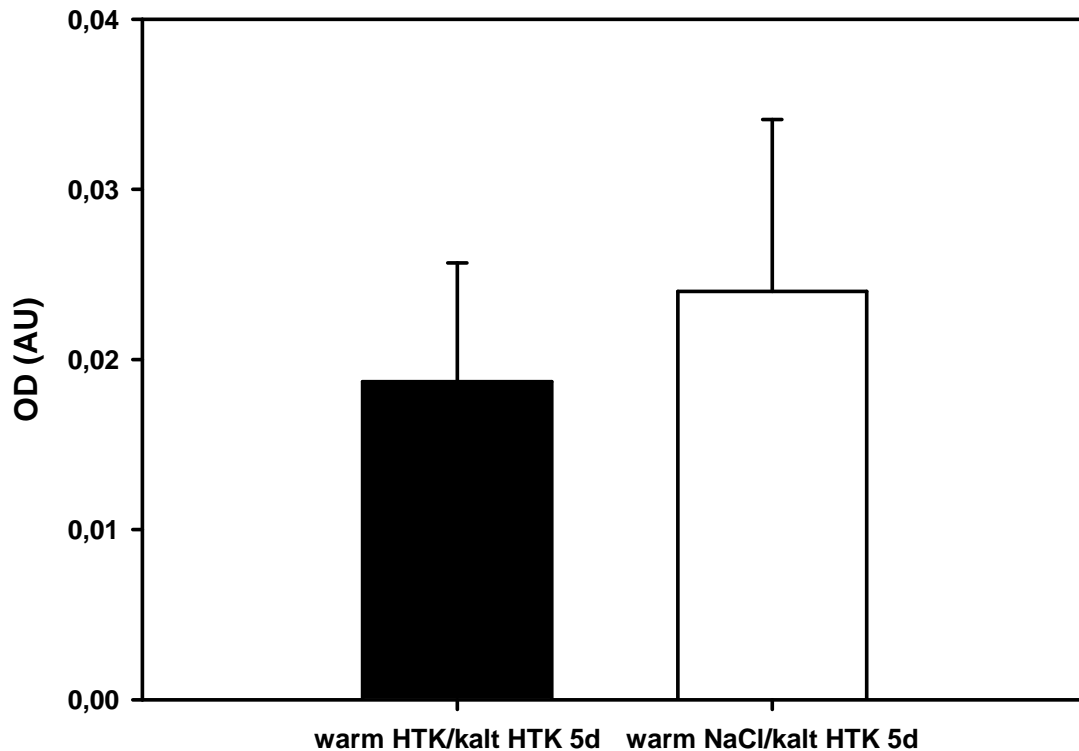


Abbildung 24: Die pro-MMP-9 Aktivität fünf Tage nach Reperfusion. Dargestellt sind die Vorbehandlungsgruppe (G5) und die Kontrollgruppe (G6) gegenüber der in der jeweiligen Gruppe gemessenen mittleren Aktivität, gemessen als optische Dichte (OD) in künstlichen Einheiten (AU) (+SD als Fehlerbalken). Die Vorbehandlungsgruppe als schwarzer Balken, die Kontrollgruppe als weißer Balken. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

III.4.3.2 Zeitlicher Verlauf der pro-MMP-9

Zur Verdeutlichung der zeitlichen Dynamik der pro-MMP-9 Aktivität erfolgt hier noch einmal die grafische Darstellung der bereits einzeln zu den drei verschiedenen Beobachtungszeitpunkten beschriebenen Werte. Innerhalb der Kontroll-Gruppen (G2, G4, G6) ergaben sich unterschiedlich hohe Aktivitäten des pro-MMP-9 mit einem signifikanten Peak nach 2 Tagen (G2 vs. G4, $p=0,012$ (one-way ANOVA, Holm Sidak)). Innerhalb der HTK-Vorbehandlungsgruppen (G1, G3, G5) zeigte sich hingegen ein initialer Peak mit folgendem signifikanten Abfall (G1 vs. G3 und G5, $p=0,010$ (one way ANOVA, Holm-Sidak) (s. Abb 25). Die Unterschiede zwischen HTK-Vorbehandlung und jeweiliger Kontrollgruppe sind bereits in II.4.3.1 beschrieben.

Zeitlicher Verlauf von proMMP-9

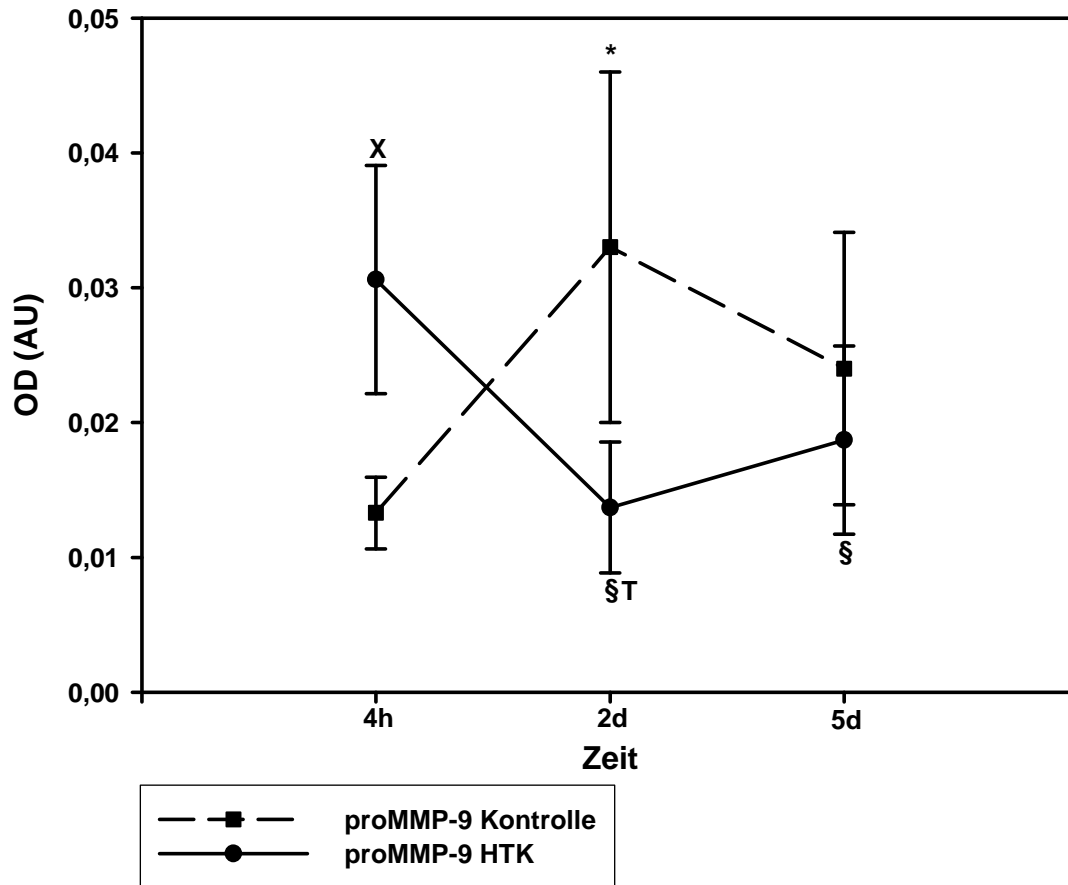


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der proMMP-9 Aktivität: Dargestellt ist die mittlere gemessene optische Dichte (OD) (\pm SD) zum jeweiligen Beobachtungszeitpunkt. Die HTK-Vorbehandlungsgruppen als Kreise verbunden mit einer durchgezogenen Linie, die Kontrollgruppen als Quadrate verbunden mit einer gestrichelten Linie. Mit * versehen der signifikante Unterschied innerhalb der Kontrollgruppen ($p=0,012$ G2 vs G4 (one-Way ANOVA, Holm-Sidak)), mit § versehen der signifikante Unterschied innerhalb der HTK-Vorbehandlungsgruppe ($p=0,010$ G1 vs G3 und G5 (one way ANOVA, Holm-Sidak)), mit ^X und ^T versehen die signifikanten Unterschiede zwischen HTK-Vorbehandlungs- und Kontrollgruppe (^X $p=0,001$ G1 vs G2 (t-test), ^T $p=0,027$ G3 vs G4 (t-test)).

3 Ergebnisse

III.4.4. Histologische Analyse

III.4.4.1. Gesamtschädigung

Generell zeigten alle Untersuchungsgruppen nur geringe histologische Veränderungen. Die Bildung des Gesamtschädigungs-Scores erfolgte durch Addieren der jeweiligen Punkte der jeweiligen Unterkriterien (s. II.6.). Es ergab sich folgende Schädigung (Tab. 4). Maximal erreichbare Punkte (18) und somit maximal mögliche Schädigung wurde in keiner der Untersuchungsgruppen erreicht.

	4h		2d		5d	
	G1	G2	G3	G4	G5	G6
Nekrose	0 (0-2)	0,5 (0-2)	1 (0-1)	1 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-2)
Apoptosen	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-3)
Abräumungsknötchen	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0,5 (0-1)	0 (0-1)
Gallengangsproliferate	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-1)
Portale Infiltrate	0,75(0-1)	0 (0-0)*	0 (0-0)	0,75(0-1)	0,5(0-1)	0 (0-3)
Mitosen	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)
Gesamtscore	0,75(0-3)	0,5(0-2)	1 (0-1)	2 (0-4)	1,75(0-4)	2 (0-7)

Tabelle 4: Histologische Auswertung. Dargestellt sind die semi-quantitativen Beurteilungswerte als Mediane (mit Range) für die entsprechenden Unterkriterien in den verschiedenen Gruppen, sowie der Median (mit Range) des Gesamtwerts der jeweiligen Gruppe. Mit * gekennzeichnet der signifikante Unterschied ($p=0,015$, Mann-Whitney Rank Sum Test) zwischen HTK-Vorbehandlungsgruppe G1 gegenüber Kontrollgruppe G2 hinsichtlich des Unterkriteriums ‚portale Infiltrate‘.

Die geringe histologisch nachweisbare Schädigung zeigt sich auch in Darstellung der Medianwerte des Gesamt-Schädigungsscores. (s. Abb. 26), sowie in den histologischen Beispiel-Abbildungen (Abb. 27 bis 32). Die Statistische Analyse der Gesamtscore-Werte ergab keine Signifikanz zwischen HTK-Vorbehandlungsgruppe G1 und Kontrollgruppe G2 ($p=0,485$, Mann-Whitney Rank Sum Test), ebenfalls nicht zwischen den Vergleichsgruppen G3 und G4 ($p=0,093$, Mann-Whitney Rank Sum Test) und auch nicht fünf Tage nach Reperfusion für die Vergleichsgruppen G5 und G6 ($p=0,818$, Mann-Whitney Rank Sum Test).

3 Ergebnisse

Histologischer Schaden (gesamt)

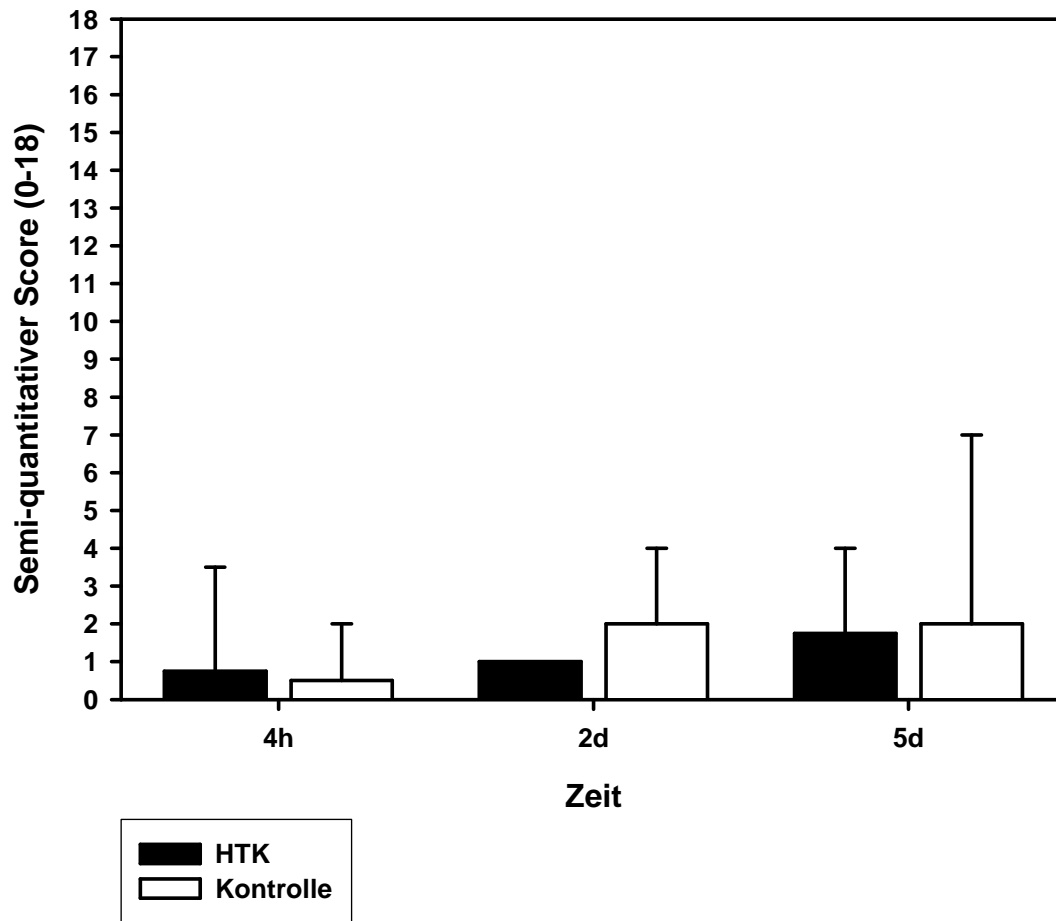


Abbildung 26: Der Gesamt-Score-Werte der histologischen Auswertung. Als schwarze (HTK-Vorbehandlung) bzw. weiße (Kontrollgruppen) Balken; dargestellt sind die in der jeweiligen Gruppe berechneten Medianwerte. Der maximal in der jeweiligen Gruppe erreichte Gesamt-Score-Wert als Fehlerbalken. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3 Ergebnisse

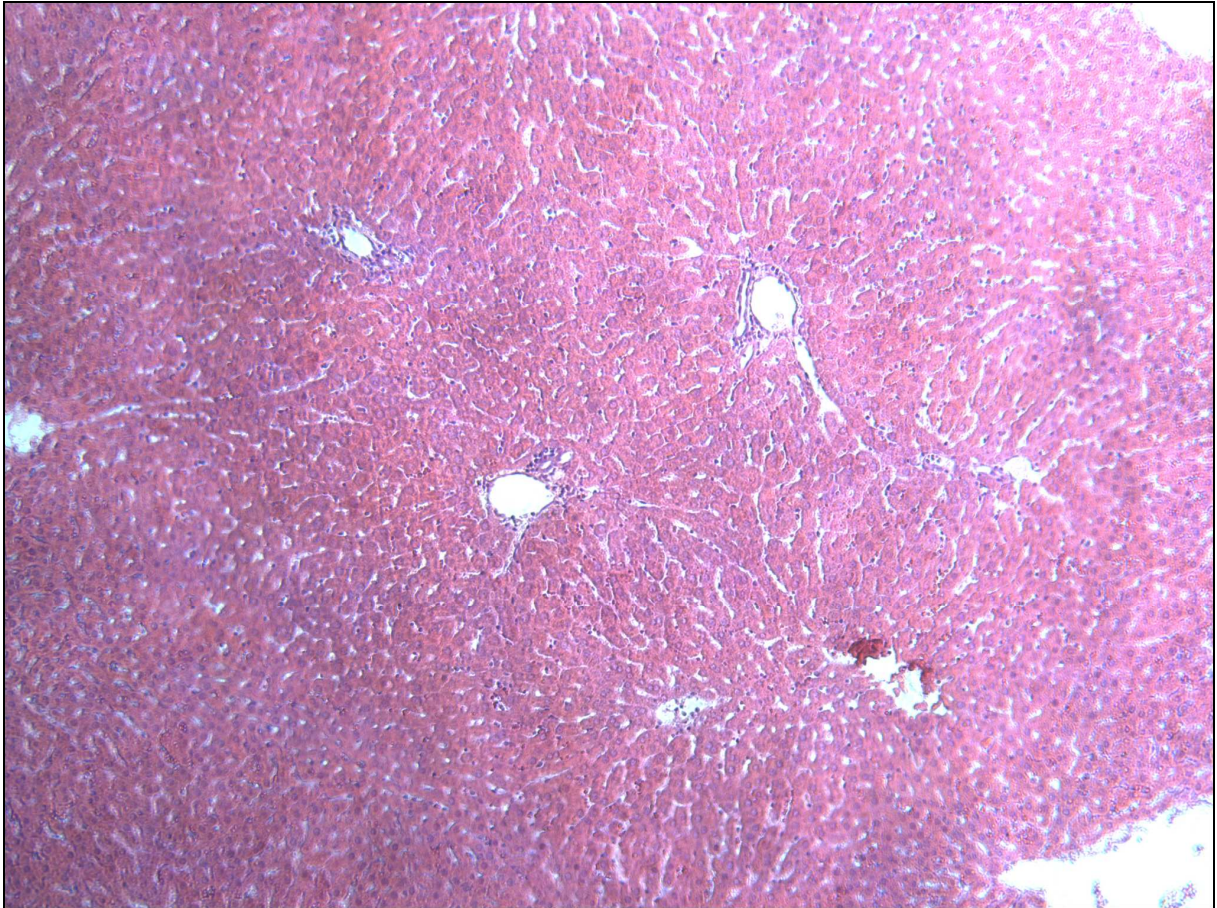


Abbildung 27: HE, 100-fach, G1, Tier G33. Es zeigt sich eine annähernd normale Rattenleber-Histologie. Nekrosen (0), Apoptosen (0), Abräumungsknötchen (0), Gallengangproliferate (0), portale Infiltrate (0), Mitosen (0), Gesamtscore (0)

3 Ergebnisse

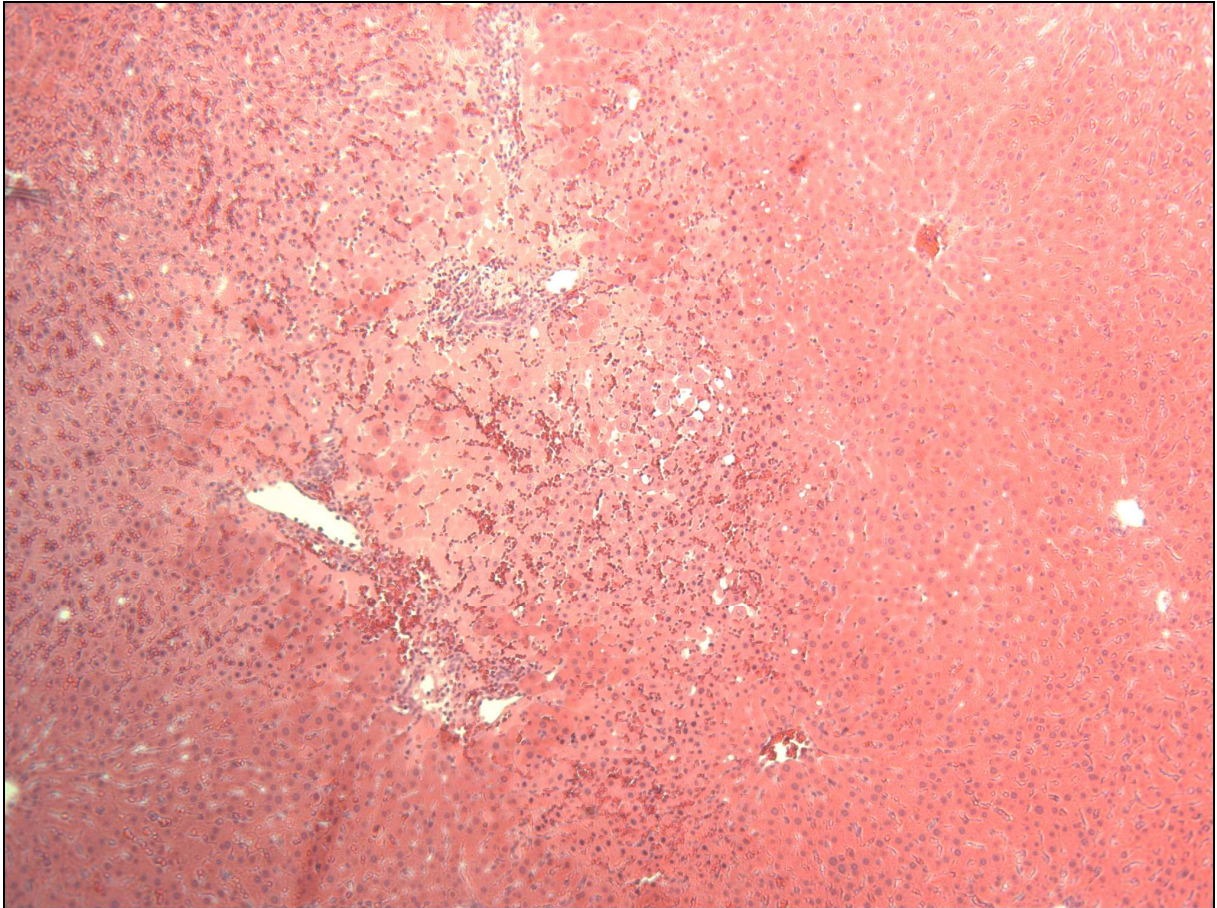


Abbildung 28: HE, 100-fach, G2, Tier G37. Darstellung einer Nekrose-Zone neben normalem Lebergewebe. Nekrosen (2), Apoptosen (0), Abräumungsknötchen (0), Gallengangproliferate (0), portale Infiltrate (0), Mitosen (0), Gesamtscore (2)

3 Ergebnisse

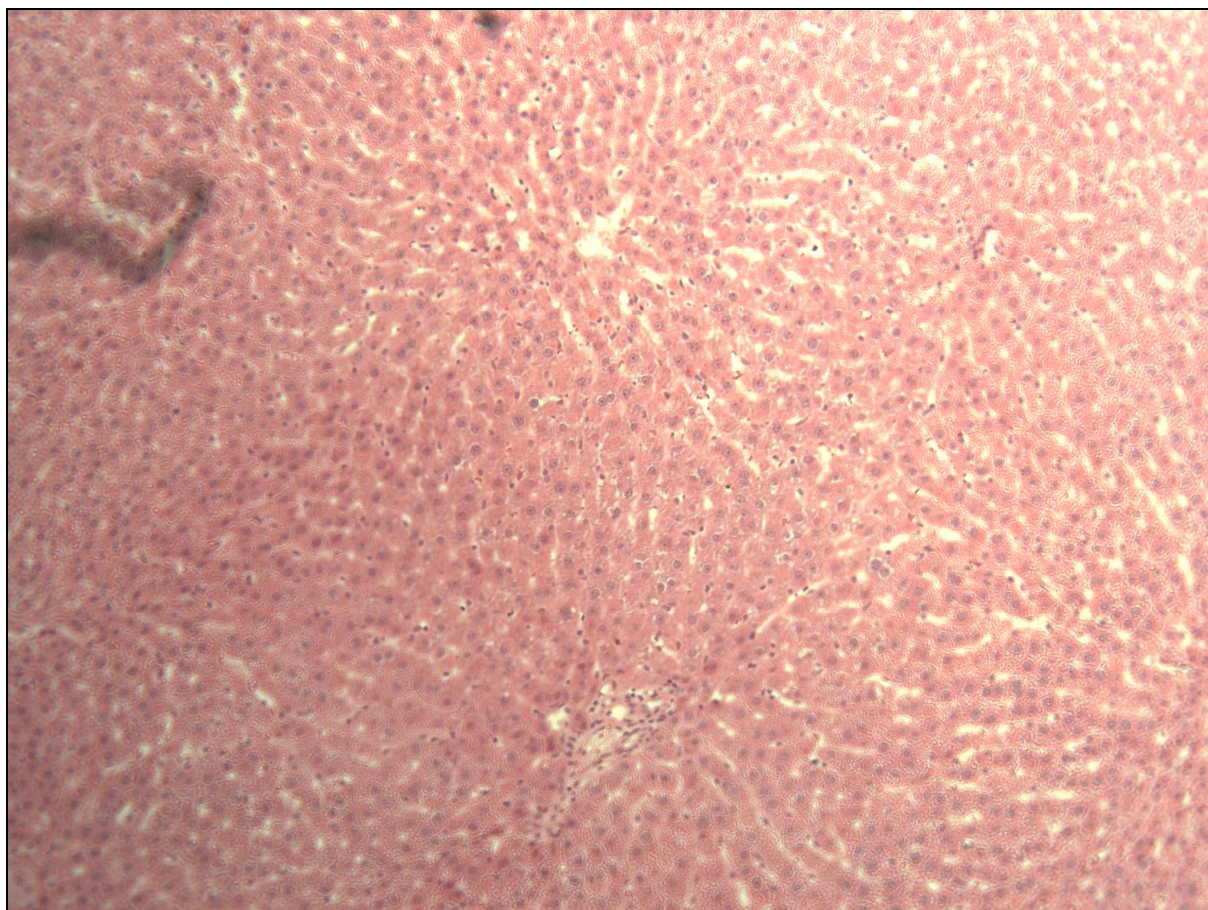


Abbildung 29: HE, 200-fach, G3, Tier G91. Nekrosen (0), Apoptosen (0), Abräumungsknötchen (0), Gallengangsproliferate (0), portale Infiltrate (0), Mitosen (0), Gesamtscore (0).

3 Ergebnisse

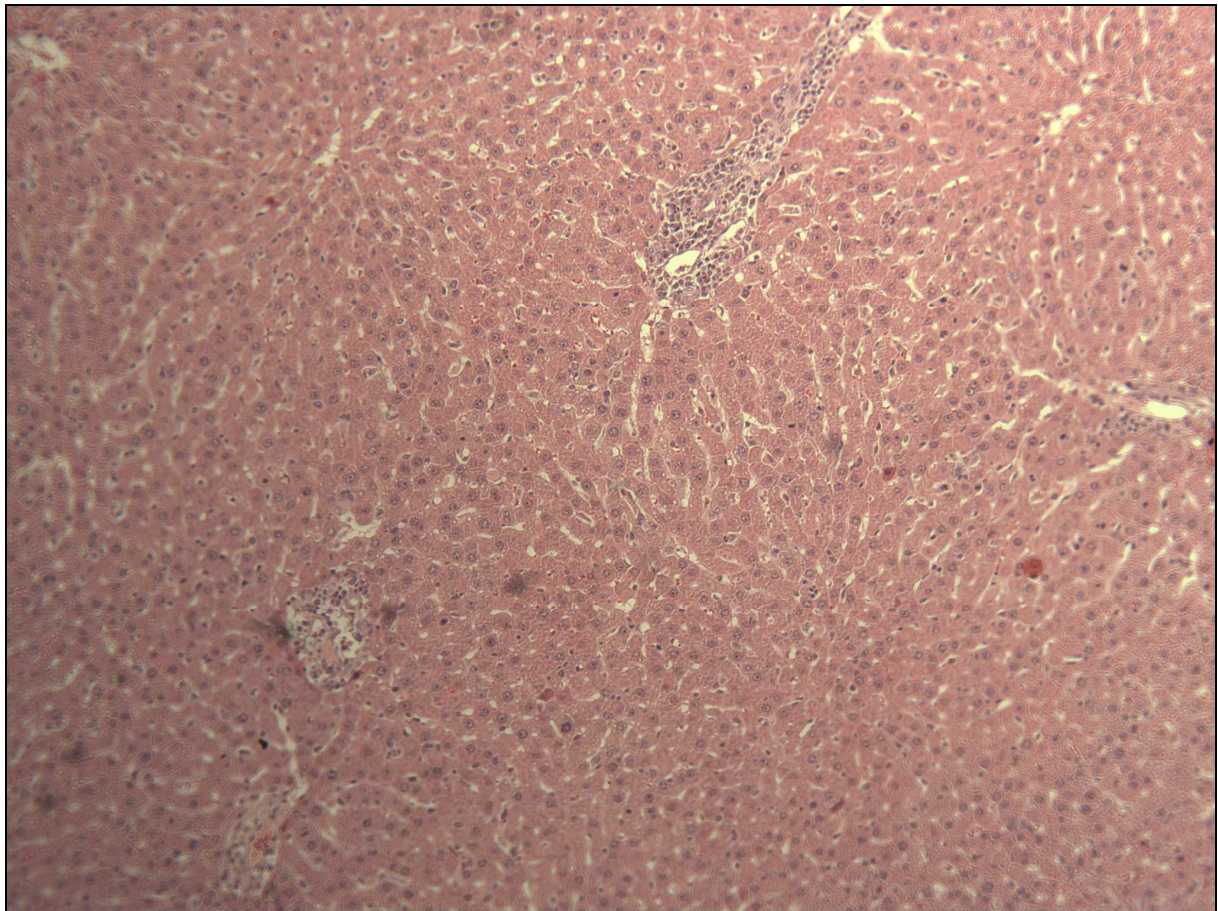


Abbildung 30: HE, 100-fach, G4, Tier G95. Nekrosen (0), Apoptosen (1), Abräumungsknötchen (1), Gallengangsproliferate (0), portale Infiltrate (1), Mitosen (1), Gesamtscore (4).

3 Ergebnisse

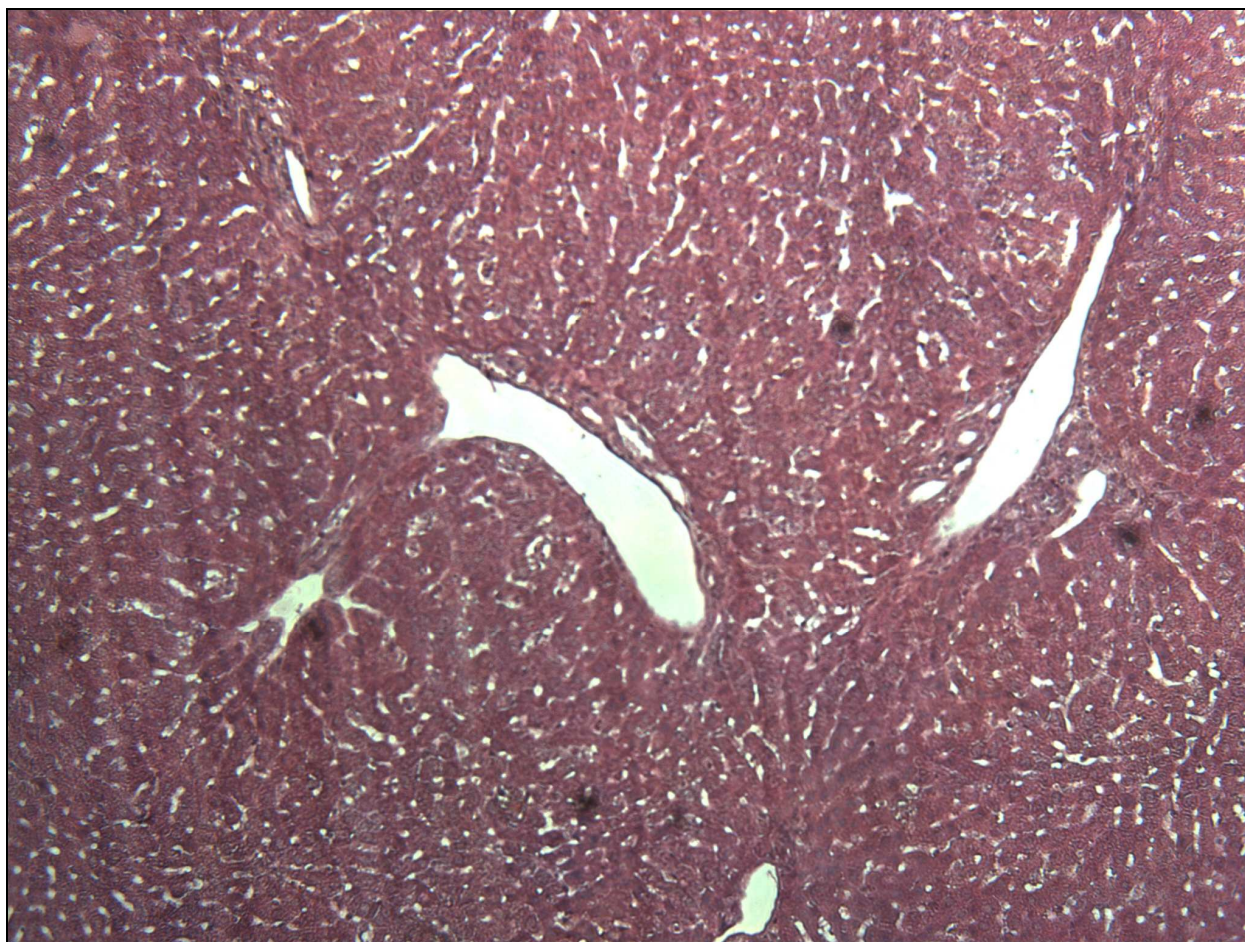


Abbildung 31: HE, 100-fach, G5, Tier G45. Annähernd normales Lebergewebe. Nekrosen (0), Apoptosen (0), Abräumungsknötchen (0), Gallengangsproliferate (0), portale Infiltrate (0), Mitosen (0), Gesamtscore (0).

3 Ergebnisse

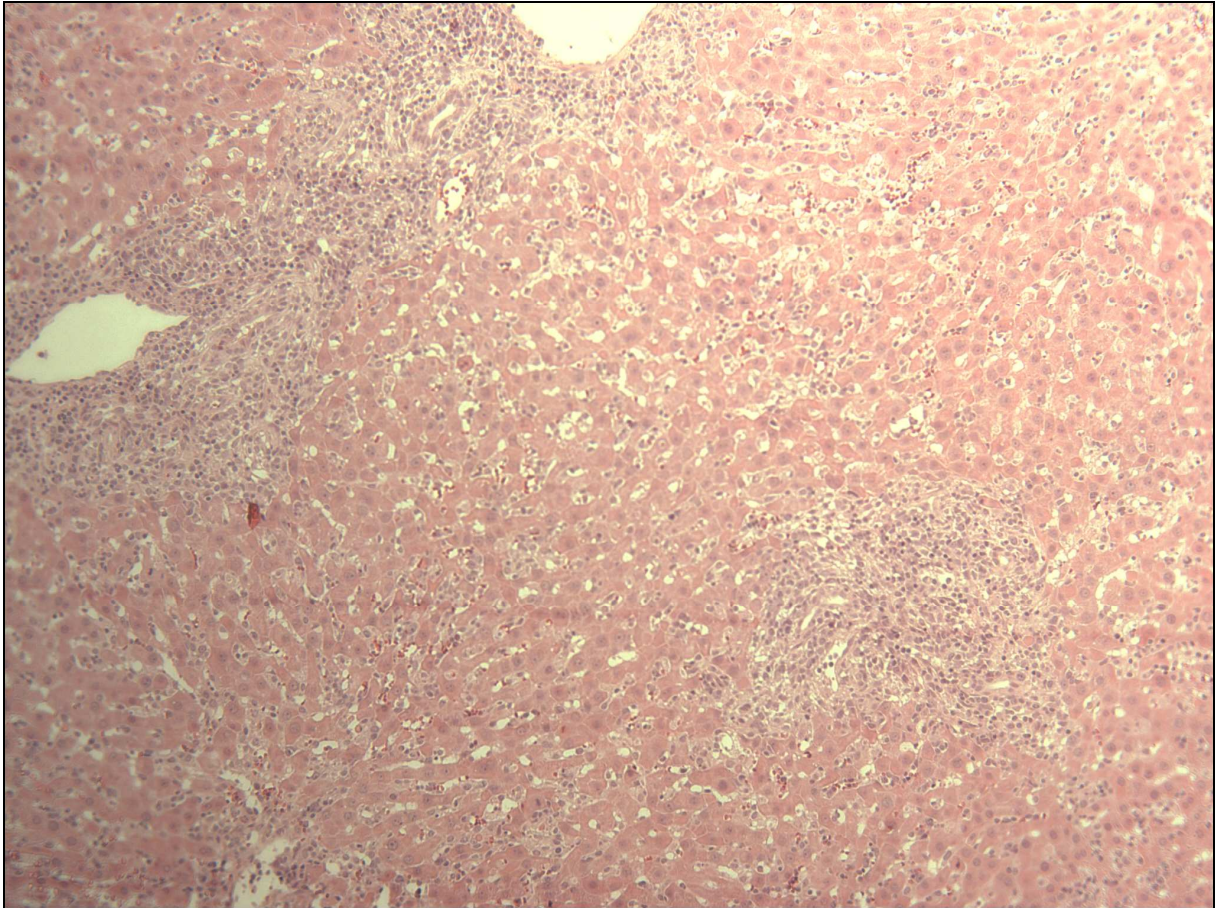


Abbildung 32: HE 100-fach, G6, Tier G54. Nekrosen (0), Apoptosen (3), Abräumungsknötchen (0), Gallengangsproliferate (1), portale Infiltrate (3), Mitosen (0), Gesamtscore (7).

III.4.4.2. Nekrosen

Bezüglich des Unterkriteriums ‚Nekrosen‘ ergab sich vier Stunden nach Reperfusion in der HTK-Vorbehandlungsgruppe G1 (0; 0-2) ein geringerer Median des Score-Wertes im Vergleich zur Kontrollgruppe G2 (0,5; 0-2), allerdings ohne Signifikanz ($p=0,699$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (s. Abb. 33). Nach zwei Tagen ergaben sich die gleichen Medianwerte für die Behandlungsgruppe G3 (1; 0-1) und die Kontrollgruppe G4 (1; 0-2) ohne signifikanten Unterschied ($p=0,818$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (s. Abb.34). Nach fünf Tagen ebenfalls die gleichen Medianwerte in den Vergleichsgruppen G5 (0; 0-0) gegenüber G6 (0; 0-2), auch in diesem Fall ohne Signifikanz ($p=0,349$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (s. Abb. 35).

3 Ergebnisse

Nekrosen 4 h nach Reperfusion

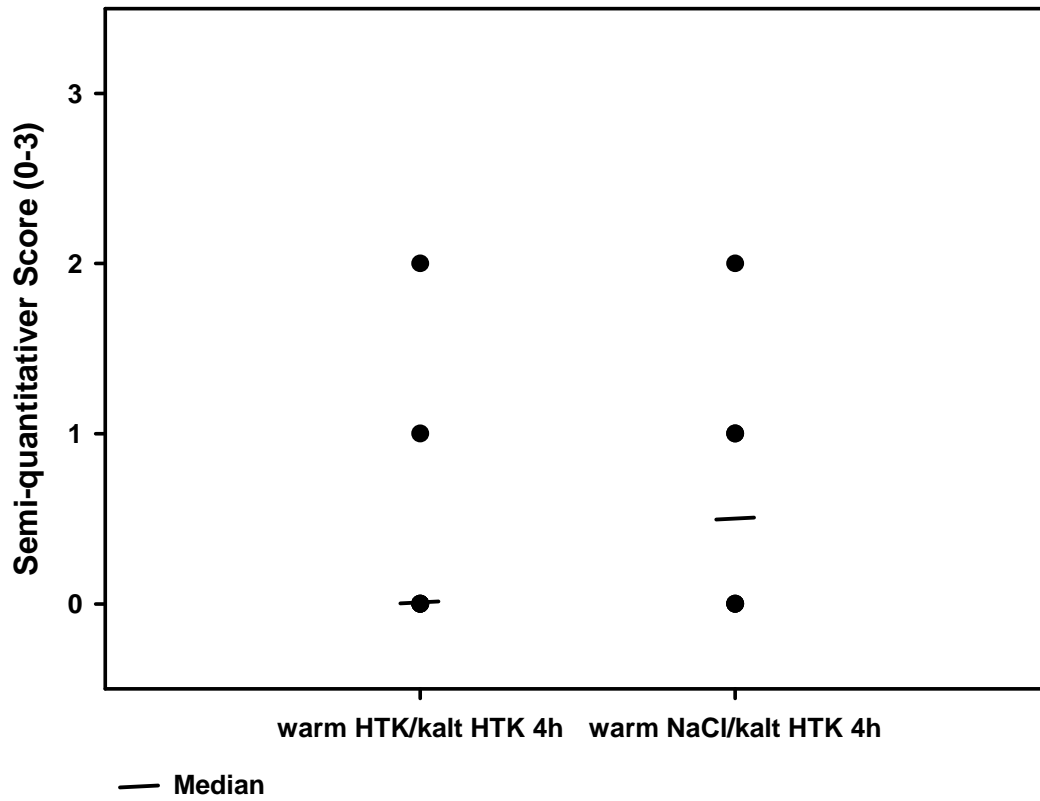


Abbildung 33: Darstellung der Score-Werte bzgl. des Kriteriums ‚Nekrosen‘ in den Vergleichsgruppen G1 und G2. Dargestellt sind alle in der jeweiligen Gruppe vergebenen Punktwerte. Aufgrund von Mehrfachnennungen sind trotz Auswertung aller sechs Tiere der jeweiligen Gruppe weniger als sechs Punkte sichtbar. Der Median ist entsprechend mit einem – gekennzeichnet. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

Nekrosen 2 d nach Reperfusion

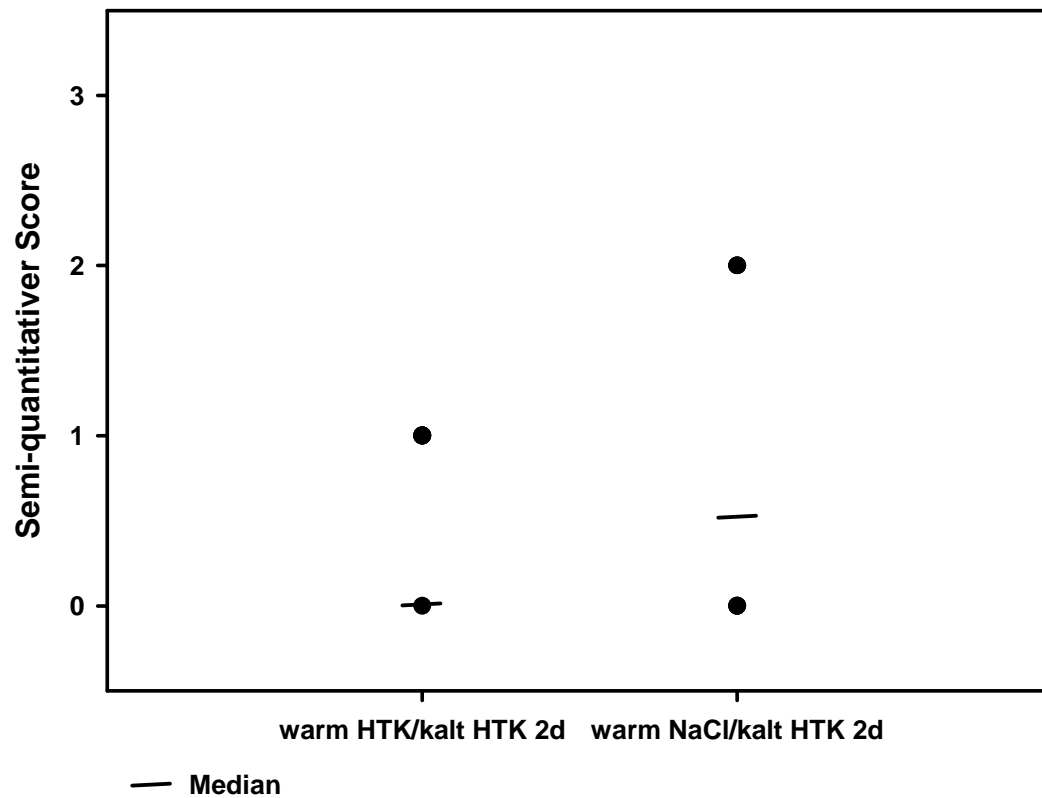


Abbildung 34: Darstellung der Score-Werte bzgl. des Kriteriums ‚Nekrosen‘ in den Vergleichsgruppen G3 und G4. Dargestellt sind alle in der jeweiligen Gruppe vergebenen Punktwerte. Aufgrund von Mehrfachnennungen sind trotz Auswertung aller sechs Tiere der jeweiligen Gruppe weniger als sechs Punkte sichtbar. Der Median ist entsprechend mit einem – gekennzeichnet. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

Nekrosen 5 d nach Reperfusion

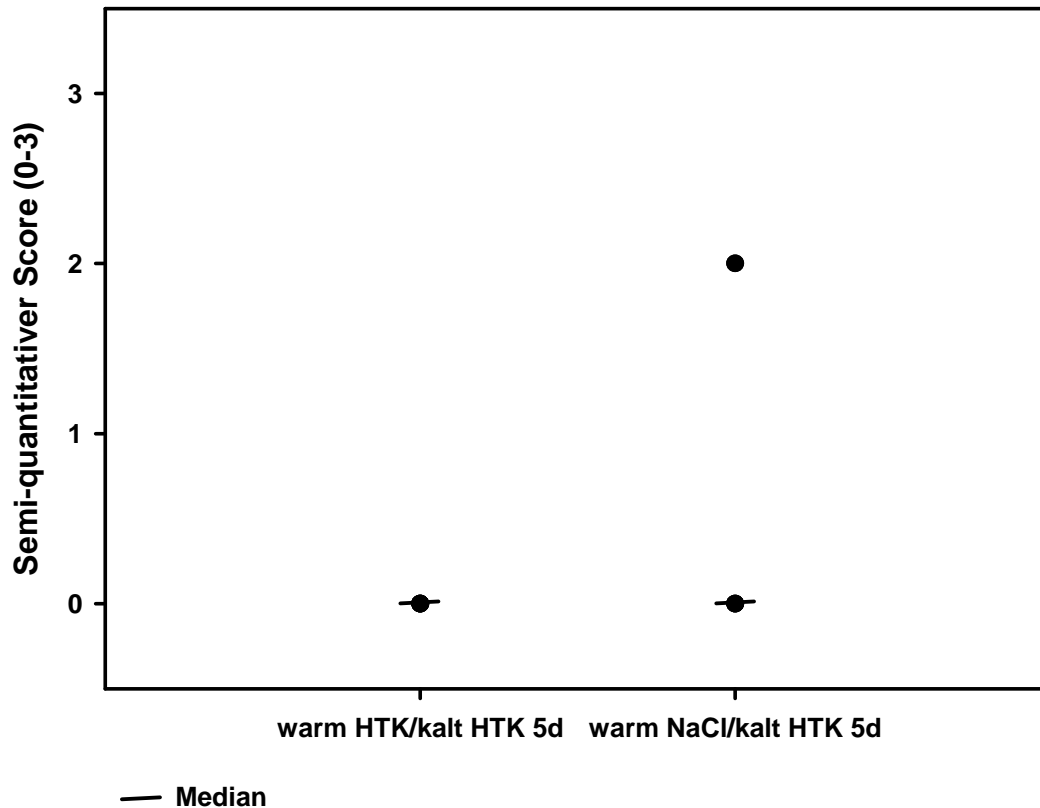


Abbildung 35: Darstellung der Score-Werte bzgl. des Kriteriums ‚Nekrosen‘ in den Vergleichsgruppen G5 und G6. Dargestellt sind alle in der jeweiligen Gruppe vergebenen Punktwerte. Aufgrund von Mehrfachnennungen sind trotz Auswertung aller sechs Tiere der jeweiligen Gruppe weniger als sechs Punkte sichtbar. Der Median ist entsprechend mit einem – gekennzeichnet. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

III.4.4.3. Apoptosen

Bezüglich des Unterkriteriums ‚Apoptosen‘ ergaben sich zu allen Beobachtungszeitpunkten in den jeweiligen Vergleichsgruppen die gleichen Mediane (0). Es lagen keinerlei statistisch signifikante Unterschiede vor: G1 (0; 0-0) vs. G2 (0; 0-0) ($p=1,00$, Mann-Whitney Rank Sum Test) bzw. G3 (0; 0-0) vs. G4 (0; 0-1) ($p=0,699$, Mann-Whitney Rank Sum Test) und G5 (0; 0-1) vs. G6 (0; 0-3) ($p=0,589$, Mann-Whitney Rank Sum Test).

3 Ergebnisse

III.4.4.4. Abräumungsknötchen

Bezüglich des Unterkriteriums ‚Abräumungsknötchen‘ ergaben sich, außer bei der HTK-Vorbehandlungsgruppe G5 (0,5; 0-1), zu allen Beobachtungszeitpunkten in den jeweiligen Vergleichsgruppen die gleichen Mediane (0). Es lagen keinerlei statistisch signifikante Unterschiede vor: G1 (0; 0-0) vs. G2 (0; 0-0) ($p=1,00$, Mann-Whitney Rank Sum Test) bzw. G3 (0; 0-0) vs. G4 (0; 0-1) ($p=0,699$, Mann-Whitney Rank Sum Test) und G5 (0,5; 0-1) vs. G6 (0; 0-1) ($p=0,240$, Mann-Whitney Rank Sum Test).

III.4.4.5. Gallengangsproliferate

Bezüglich des Unterkriteriums ‚Gallengangsproliferate‘ ergaben sich, sich zu allen Beobachtungszeitpunkten in den jeweiligen Vergleichsgruppen die gleichen Mediane (0). Es lagen keinerlei statistisch signifikante Unterschiede vor: G1 (0; 0-0) vs. G2 (0; 0-0) ($p=1,00$, Mann-Whitney Rank Sum Test) bzw. G3 (0; 0-0) vs. G4 (0; 0-0) ($p=1,00$, Mann-Whitney Rank Sum Test) und G5 (0; 0-2) vs. G6 (0; 0-1) ($p=0,589$, Mann-Whitney Rank Sum Test).

III.4.4.6. Portale Infiltrate

Hinsichtlich des Unterkriteriums ‚portale Infiltrate‘ fand sich nach vier Stunden ein signifikant ($p=0,015$, Mann-Whitney Rank Sum Test) erhöhter Median in der HTK-Vorbehandlungsgruppe G1 (0,75; 0-1) gegenüber der Kontrollgruppe (0; 0-0). (s. Abb. 36). Nach zwei Tagen zeigte sich dann eine geringere portale Infiltration in der HTK-Vorbehandlungsgruppe G3 (0; 0-0) gegenüber der Kontrollgruppe G4 (0,75; 0-1), ohne Signifikanz ($p=0,065$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (s. Abb. 37); und nach fünf Tagen erneut eine stärkere portale Infiltration in der HTK-Vorbehandlungsgruppe G5 (0,5; 0-1) gegenüber der Kontrollgruppe G6 (0; 0-3) ebenfalls ohne Signifikanz ($p=0,818$, Mann-Whitney Rank Sum Test) (s. Abb. 38).

3 Ergebnisse

portale Infiltrate 4 h nach Reperfusion

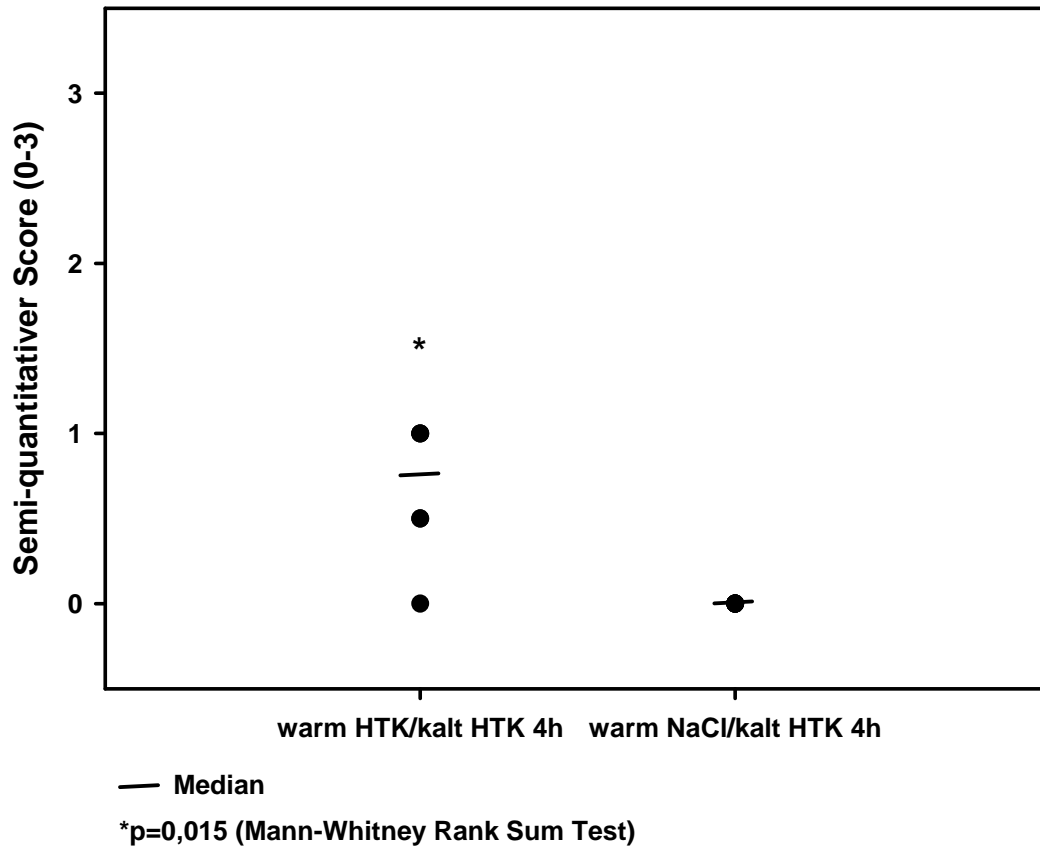


Abbildung 36: Darstellung der Score-Werte bzgl. des Kriteriums ‚portale Infiltrate‘ in den Vergleichsgruppen G1 und G2. Dargestellt sind alle in der jeweiligen Gruppe vergebenen Punktwerte. Aufgrund von Mehrfachnennungen sind trotz Auswertung aller sechs Tiere der jeweiligen Gruppe weniger als sechs Punkte sichtbar. Der Median ist entsprechend mit einem – gekennzeichnet. Es lag ein mit * gekennzeichnete signifikanter Unterschied vor.

3 Ergebnisse

portale Infiltrate 2 d nach Reperfusion

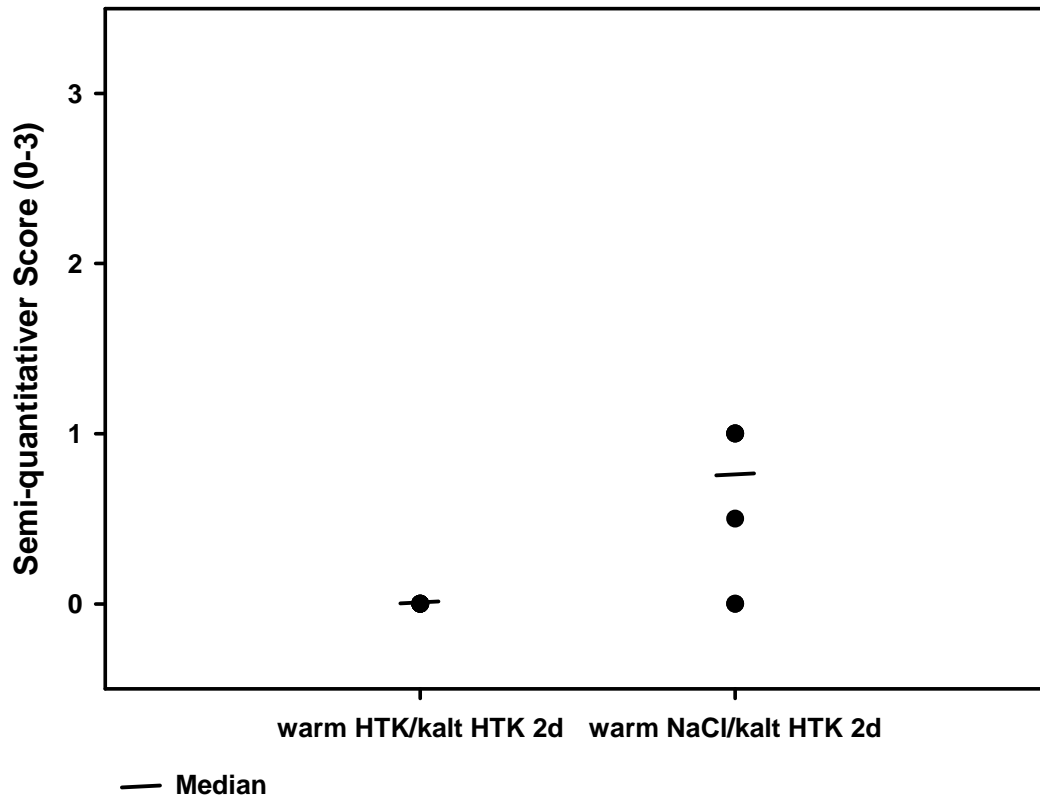


Abbildung 37: Darstellung der Score-Werte bzgl. des Kriteriums ‚portale Infiltrate‘ in den Vergleichsgruppen G3 und G4. Dargestellt sind alle in der jeweiligen Gruppe vergebenen Punktwerte. Aufgrund von Mehrfachnennungen sind trotz Auswertung aller sechs Tiere der jeweiligen Gruppe weniger als sechs Punkte sichtbar. Der Median ist entsprechend mit einem – gekennzeichnet. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

portale Infiltrate 5d nach Reperfsuion

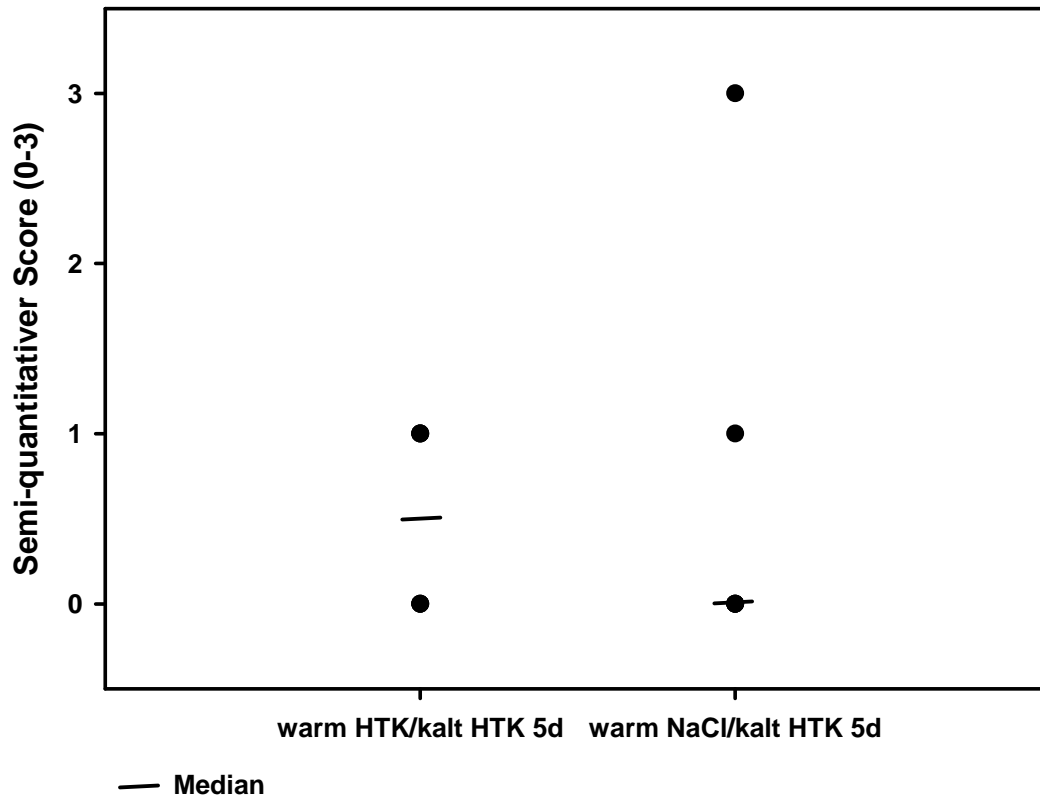


Abbildung 38: Darstellung der Score-Werte bzgl. des Kriteriums ‚portale Infiltrate‘ in den Vergleichsgruppen G5 und G6. Dargestellt sind alle in der jeweiligen Gruppe vergebenen Punktwerte. Aufgrund von Mehrfachnennungen sind trotz Auswertung aller sechs Tiere der jeweiligen Gruppe weniger als sechs Punkte sichtbar. Der Median ist entsprechend mit einem – gekennzeichnet. Es lag kein signifikanter Unterschied vor.

III.4.4.7. Mitosen

Bezüglich des Unterkriteriums ‚Mitosen‘ ergaben sich, sich zu allen Beobachtungszeitpunkten in den jeweiligen Vergleichsgruppen die gleichen Mediane (0). Es lagen keinerlei statistisch signifikante Unterschiede vor: G1 (0; 0-0) vs. G2 (0; 0-0) ($p=1,00$, Mann-Whitney Rank Sum Test) bzw. G3 (0; 0-0) vs. G4 (0; 0-1) ($p=0,662$, Mann-Whitney Rank Sum Test) und G5 (0; 0-0) vs. G6 (0; 0-0) ($p=1,00$, Mann-Whitney Rank Sum Test)

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte im Lebertransplantationsmodell der Ratte mit Spendervorbehandlung durch warme (21°C) HTK-Lösung (0,01 ml/g KG i.v., 15 Minuten vor Perfusion mit kaltem (4°C) HTK) eine verbesserte Konservierung der vorbehandelten Lebern gegenüber Lebern der Kontrolltiere (0,01 ml/g KG 0,9% NaCl (21°C) i.v., 15 Minuten vor Perfusion mit kaltem (4 °C) HTK) gezeigt werden. Die Vorbehandlung mittels warmer HTK-Lösung im Rahmen der Spenderoperation war einfach durchführbar und führte bei keinem der vorbehandelten Tiere zu Nebenwirkungen.

Die bessere Konservierung zeigte sich einerseits in signifikant niedrigerer Freisetzung der Schädigungsparameter ALT und LDH vier Stunden nach der Transplantation, sowie in einer Tendenz zu niedrigeren Werten der AST vier Stunden, zwei und fünf Tage und der ALT zwei Tage post transplantationem. Des Weiteren zeigte sich eine signifikant niedrigeren Aktivität der proMMP-2 im Lebergewebe zwei und fünf Tage nach Transplantation sowie der MMP-2 und proMMP-9 zwei Tage nach der Transplantation. Eine Tendenz zur niedrigeren Aktivität der MMPs bestand für die MMP-2 nach vier Stunden und fünf Tagen sowie für die proMMP-9 nach fünf Tagen.

Die histologische Analyse zeigte ebenfalls eine Tendenz zu einer geringeren Schädigung nach zwei und fünf Tagen für die HTK-vorbehandelten Lebern.

Bei dem für die Untersuchung angewandten Lebertransplantationsmodell handelt es sich um ein etabliertes Standardmodell, welches in vorherigen Studien bereits reproduzierbare Ergebnisse liefern konnte [27, 28, 30]. Die erreichte anhepatische Zeit lag im Rahmen, bzw. teilweise sogar leicht unterhalb der in anderen Studien angegebenen Zeit [30, 39-41].

Die Modifikation mittels Spendervorbehandlung durch intravenöse Infusion warmen (21°C) HTKs beruht auf der Idee, die zu transplantierende Leber bereits vor dem Kontakt mit kalter, und somit auch schädigender, Konservierungslösung mit protektiven Substanzen auszustatten. Auch mit der ‚idealen‘ Konservierungslösung wird sich während der Kaltlagerung der Transplantatschaden vergrößern. Dies ist einerseits

4 Diskussion

proportional zur Lagerungszeit, andererseits direkt spezifisch für Kälte an sich [42]. Dass Kälte für sich alleine bereits für die zu transplantierenden Lebern schädlich ist, konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden: Beispielsweise lässt sich an kultivierten Hepatozyten sowie hepatischen Endothelzellen durch Kälte Apoptose auslösen. Diese beruht auf der durch Kälte induzierten Freisetzung reaktiver Sauerstoff-Radikale (ROS) [10]. Bei verlangsamt ablaufendem Metabolismus kommt es nicht nur zur Reduktion von durch Hypoxie bedingten Schädigungen, sondern auch zu einer geringeren Aufnahme von Substraten in die Zelle. Während sich der aerobe Metabolismus um das 12- bis 13-fache bei der Abkühlung von 37°C auf 0°C verringert [43], geht der anaerobe Metabolismus weiter, dies führt zu Verbrauch von Energie-Reserven (Adenosintriphosphat (ATP)) und begleitend durch Laktatanhäufung zur Bildung eines sauren Milieus [11]. Des Weiteren ist die Natrium/Kalium ATPase, welche durch ihre Funktion der aktiven Natrium-Extrusion die osmotische Balance der Zelle aufrecht erhält, ebenfalls temperaturabhängig. Je niedriger die Temperatur, desto weniger arbeitet sie. Dies führt zu einer intrazellulären Natriumakkumulation mit konsekutivem Chlorid Einstrom sowie Kaliumverlust. Dies bedingt in der weiteren Folge aufgrund der hohen osmotischen Wirkung nicht-permeabler intrazellulärer Makromoleküle einen passivem Wassereinstrom durch die Zellmembran und schließlich die Zellschwellung [12-14].

Es gilt also, die zu transplantierende Leber bereits vor Kontakt mit Kälte mit protektiven Substanzen auszustatten. HTK wurde initial als Perfusionslösung bei *Hypothermie* (23 – 32 °C) während herzchirurgischer Eingriffe entwickelt und angewandt [16, 44-47]. Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, wie anhand der niedrigeren Transaminasen und geringeren histologischen Schädigung ersichtlich, dass die protektiven Effekte des HTK (Auffüllen der intrazellulären Energiespeicher, Anreicherung der Organe mit MMP-inhibierendem und exzellent pufferndem Histidin sowie Bereitstellung anti-ödematöser Makromoleküle (Manitol)) im Rahmen der Lebertransplantation durch Vorbehandlung des Spenders noch besser genutzt werden können.

Um Schädigungen durch Kälte zu vermeiden werden auch bei der subnormothermen Maschinenperfusion Perfusionstemperaturen um 20°C empfohlen; so können deutlich bessere Konservierungsergebnisse als bei geringeren Temperaturen erreicht werden

4 Diskussion

[25, 26, 48, 49]. Die Autoren vermuten bei subnormothermen Bedingungen einen deutlich effektiveren Aufbau der Energiespeicher als bei Kaltperfusion ($< 20^{\circ}\text{C}$), was aufgrund der in diesem Temperaturbereich noch arbeitenden Enzymsysteme plausibel ist. Diesen Effekt macht sich das in der vorliegenden Arbeit verwendete Vorgehen der Spendervorbehandlung mit warmer (20°C) HTK-Lösung zu nutze.

Vermutete Ursache des positiven Effekts der HTK-Vorbehandlung ist die Aufsättigung der Spender-Leber mit protektiven Substanzen. Insbesondere Histidin zeigte sich in anderen Arbeiten als ein effektiver Hemmer von Matrix-Metalloproteinasen bzw. ihrer Zymogene (proMMP2/MMP-2 und proMMP-9/MMP-9) [21, 22]. Wie anhand der signifikant niedrigeren Aktivität der proMMP-2 im Lebergewebe zwei und fünf Tage nach Transplantation sowie der MMP-2 und proMMP-9 zwei Tage nach der Transplantation und auch der Tendenz zur niedrigeren Aktivität der MMP-2 nach vier Stunden und fünf Tagen sowie der proMMP-9 nach fünf Tagen ersichtlich, ist es mit dem untersuchten Konzept gelungen, die zu transplantierende Leber bereits im Spender mit MMP-inhibierendem Histidin nachhaltig aufzusättigen.

Die MMP-Aktivität ist auf multiplen Ebenen reguliert: Gen-Transkription und Synthese der inaktiven Zymogene, posttranslationale Aktivierung der Zymogene und Interaktionen der sezernierten MMPs mit den Gewebe-Inhibitoren der Metalloproteinasen (TIMPs) [50, 51]. Tatsächlich sind MMPs in biologischen Proben häufig als inaktive Komplexe mit ihren endogenen Inhibitoren (TIMPs) enthalten [35]. Um eine zusätzliche Sicherheit im Aktivitätsnachweis zu erhalten, empfehlen einige Autoren [34, 52] ergänzende Analysen mittels in-situ Zymografie, oder reverser Zymografie welche die Balance zwischen abbauender Aktivität einer MMP und inhibierender Aktion der TIMPs zeigt. Dies ist in den meisten publizierten Studien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, nicht erfolgt. Auch wenn keine weitere Aktivitätskontrolle durchgeführt wurde, bestanden bei der vorgelegten Arbeit zwischen den Vergleichsgruppen signifikante Unterschiede des Vorkommens der entsprechenden MMPs bzw. ihrer Zymogene im Lebergewebe, was als ausreichend für die entsprechenden Interpretationen angesehen wird.

Ein reduzierter I/R-Schaden nach MMP-Hemmung bzw. bei geringerer MMP-Aktivität konnte in vielen Studien belegt werden: In einem Rattentransplantationsmodell steatotischer Zuckerratten konnten Fondevila et al [53] durch Gabe eines

4 Diskussion

Interaktionshemmers zwischen Fibronectin und Zellmembranintegrinen (cRDG), welche wichtig für die Leukozytenadhäsion im Rahmen des I/R-Schadens sind, auch eine verminderte MMP9 Expression induzieren. Die so behandelten Tiere und Lebertransplantate zeigten weniger Transaminasen, deutlich weniger histologischen Schaden, insbesondere weniger Leukozyteninvasion, und überlebten deutlich länger als Kontrolltiere. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich signifikant niedrigere pro-MMP9 Werte in den Lebern der HTK-vorbehandelten Tiere, was eine proMMP-9 Inhibition durch HTK beweist. cRDG wurde von Fondevila et al allerdings erst nach der Organexplantation ex-situ über die Portalvene vor der Kaltlagerung und dann anschließend über drei Tage post transplantationem intra-peritoneal gegeben. Ob eine noch deutlichere Protektion bei Gabe *vor* der Explantation als Spendervorbehandlung erreichbar ist, wäre eine interessante Fragestellung für weitere experimentelle Arbeiten.

Soccal et al [54] zeigten in der experimentellen Lungentransplantation, dass durch kombinierte Administration eines unselektiven MMP-Inhibitors (Batimastat) im Spender (als Vorbehandlung) und postoperativ im Empfänger ein geringerer I/R Schaden als bei nicht behandelten Kontrollen auftritt. Die gemessenen Aktivitäten von proMMP2/MMP-2 und proMMP-9/MMP-9 waren bei den behandelten Tieren deutlich reduziert. Interessanterweise verwendeten die Autoren Euro-Collins-Lösung als Konservierungslösung, welche deutlich geringere MMP-inhibierende Eigenschaften als HTK oder UW zeigt [21]. Dies unterstützt die zweite Hypothese der vorliegenden Arbeit: Die Inhibition der MMPs verringert den Transplantatschaden. Vorteil bei der vorliegenden Arbeit ist, dass kein zusätzlicher non-selektiver MMP-Inhibitor gegeben werden muss; das Histidin ist bereits im HTK enthalten.

Ilmakunnas et al [55] zeigten einen deutlichen Anstieg der Serum-MMP-9 im Rahmen der Reperfusion während der humanen Lebertransplantation. Ihre Schlussfolgerungen waren ein relativer Mangel an MMP hemmenden Substanzen während der Reperfusion und ein daraus resultierender Beitrag zum Transplantatschaden. Sie konnten eine Korrelation zwischen postoperativ gemessenem Bilirubin bzw. ALT und dem während der Transplantation gemessenen Gradienten an endogenen MMP-Inhibitoren zeigen: Je weniger endogene Inhibitoren der MMPs gemessen wurden, desto höher war die postoperative ALT bzw. das postoperative Bilirubin. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit suggerieren eine Angriffsmöglichkeit genau an diesem Punkt. Durch Inhibition

4 Diskussion

der proMMP-9 und proMMP-2/MMP-2 durch warme HTK Vorbehandlung des Spendertiers gelang es in der vorliegenden Arbeit einen, anhand der ALT gemessenen, geringeren Transplantatschaden zu induzieren. Dies reflektierte sich in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht im postoperativ gemessenen Bilirubin, welches in Behandlungs- und Kontrollgruppen keinerlei Unterschied zeigte.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der proMMP-9, so fällt auf, dass bei den Kontrollgruppentieren ein signifikant höherer Wert zum zweiten Beobachtungszeitpunkt gegenüber dem ersten gemessen wurde. Bei den HTK-vorbehandelten Tieren hingegen zeigte sich ein zu Beginn (nach vier Stunden) signifikant höherer Wert als nach zwei und fünf Tagen. Dieser Wert bei vier Stunden war auch signifikant höher als in der Vergleichskontrollgruppe. Korrespondierend hierzu findet sich in der Histologie nach vier Stunden eine signifikant stärkere portale Infiltration in der HTK-Vorbehandlungsgruppe als in der Kontrollgruppe.

Der zeitliche proMMP-9 Verlauf der Kontrollgruppe steht im Gegensatz zu der bei Cursio [56] beschriebenen MMP-Dynamik nach *warmem* I/R. Diese Arbeit beschreibt einen Peak der MMP9 m-RNA Expression und des tatsächlich vorhandenen Zymogens und Enzyms, gemessen mit Zymografie, nach einem Tag mit raschem Abfall bis zwei Tage nach dem I/R Ereignis.

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der proMMP2 und MMP2 so zeigt sich in der Kontrollgruppe ein stetiger Anstieg. Zwei und fünf Tage nach Reperfusion erreicht dies dann ein signifikant höheres Niveau als in den Behandlungsgruppen. Dies entspricht den Daten von Cursio, welcher den Peak der pro-MMP2 und MMP2 nach ca. zweieinhalb Tagen beschreibt. [56] Cursio folgerte aus der Dynamik, dass die Rolle des MMP-9 im Rahmen der Inflammation und Apoptose, respektive Nekrose, liegt, während die Rolle des MMP-2 wichtig ist im Zusammenhang mit Gewebeumbau und Regeneration der Leber. Auch in der vorliegenden Arbeit fanden sich nach vier Stunden bzw. zwei Tagen post transplantationem eine Tendenz zu höheren Nekrose-Score-Werten in der Kontrollgruppe korrespondierend zu signifikant höheren proMMP-9 Werten zwei Tage nach Transplantation. Dies unterstützend sind die Ergebnisse von Ilmakunnas et al [55], die schon innerhalb der ersten Minuten nach Reperfusion eine Dynamik für MMP-9 Plasmaspiegel zeigen konnten.

4 Diskussion

Während in der vorliegenden Arbeit die Werte der Kontrollgruppen einen kontinuierlichen, jedoch nicht signifikanten, Anstieg der pro-MMP-2 und MMP-2 Aktivität zeigen, erweist sich die pro-MMP-2 und MMP-2 Aktivität innerhalb der HTK-vorbehandelten Tiere als eher konstant bis leicht abfallend über die Zeit. Dies legt die Vermutung auf einen nachhaltigen Effekt der HTK-Vorbehandlung nahe. Mit weniger Schaden, auch wenn keine signifikanten Transaminasenunterschiede mehr messbar sind; einhergehend mit weniger Notwendigkeit zu Gewebeumbau, da weniger Schaden entstanden ist.

Der histologisch nachweisbare Schaden war in allen Untersuchungsgruppen der vorgelegten Arbeit sehr niedrig, dennoch ergab sich für die Tiere zwei Tage nach Transplantation ein geringerer Median des Gesamtschädigungsscores in der Behandlungsgruppe. Das zur Untersuchung gewählte Model erzeugte also nicht genug Schaden, um die protektiven Effekte der HTK-Vorbehandlung auch histologisch eindeutig nachweisen zu können. Dies liegt zum einen in der wahrscheinlich zu kurz gewählten kalten Ischämiezeit bzw. der Verwendung gesunder Spender- und Empfängertiere. Dennoch gelang es mit der vorliegenden Arbeit einen guten Grundstein für weitere experimentelle Arbeiten und ggf. klinisch Anwendungen zu legen. Die Methode der Spendervorbehandlung mit warmem (21°C) HTK lies sich ohne besonderen Aufwand durchführen und zeigte bereits bei gesunden Spendertieren hinsichtlich der Transaminasen und MMPs eine geringere Transplantatschädigung als bei mit NaCl vorbehandelten Kontrolltieren.

Untersuchungen mit tatsächlich marginalen Spendertieren (wie z.B. steatotischen Zucker-Ratten [53] oder im ‚non-heart-beating-donor‘ Model [49]) könnten die These der Protektion durch Spendervorbehandlung mit warmer HTK-Lösung noch ausbauen und in der Folge zu einer Vergrößerung der Anzahl transplantierbarer Organe führen.

V. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Durch die Verbesserung der Ergebnisse der Lebertransplantation in den letzten Dekaden hat sich ein schwerwiegender Organ-Mangel entwickelt. Dies führt zu einer zunehmenden Anzahl an Transplantationen von Organen sog. ‚marginaler Spender‘. Diese Organe sind empfindlicher gegenüber durch Ischämie und Reperfusion verursachter Schäden. Verbesserungen der Organkonservierung sind zu einer Ausweitung des Spenderpools um ‚marginale Spender‘ unbedingt erforderlich. Ein neuer Verbesserungsansatz ist die *Vorbehandlung* der Spender mit warmer (21°C) HTK-Lösung.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte in einem etablierten Lebertransplantationsmodell mit männlichen Inzucht Wistar-Ratten (KG 230-260g) die *Vorbehandlung* der Spender mit warmer (21°C) HTK-Lösung, bzw. in den Kontrollgruppen mit warmer (21°C) NaCl 0,9% Lösung. Nach Vorbehandlung mit HTK bzw. NaCl erfolgte bei Behandlungs- und Kontrolltieren die Perfusion mit kalter (4°C) HTK-Lösung sowie die Explantation und kalte Lagerung in HTK für sechs Stunden, gefolgt von der Lebertransplantation. Die transplantierten Tiere wurden zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (vier Stunden, zwei Tage, fünf Tage) getötet und Blutproben hinsichtlich AST, ALT, LDH und Bilirubin, sowie Leber-Gewebeproben hinsichtlich histologischem Schaden (mittels eines semiquantitativen Scores) und Matrixmetalloproteinasen-Aktivität (proMMP-2/MMP2, pro-MMP-9) mittels Zymografie analysiert. Dies resultierte in sechs untersuchten Behandlungs- bzw. Kontrollgruppen á sechs Versuchstieren.

Die Vorbehandlung mittels warmer (21°C) HTK-Lösung war einfach durchführbar und führte bei keinem der Versuchstiere zu unerwünschten Nebenwirkungen. Die Behandlungsgruppen zeigten eine signifikant niedrigere Freisetzung der Schädigungsparameter ALT und LDH vier Stunden nach der Transplantation, sowie eine Tendenz zu niedrigeren Werten der AST vier Stunden, zwei und fünf Tage und der ALT zwei Tage post transplantationem im Vergleich mit den Kontrolltieren. Des Weiteren zeigte sich bei den Behandlungsgruppen eine signifikant niedrigere Aktivität der proMMP-2 im Lebergewebe zwei und fünf Tage nach Transplantation sowie der MMP-2 und proMMP-9 zwei Tage nach der Transplantation. Eine Tendenz zu niedrigerer Aktivität der MMPs bei den Behandlungsgruppen bestand für die MMP-2

5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

nach vier Stunden und fünf Tagen sowie für die proMMP-9 nach fünf Tagen gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen. Die histologische Analyse zeigte ebenfalls eine Tendenz zu einer geringeren Schädigung nach zwei und fünf Tagen für die Behandlungsgruppen, allerdings ohne Signifikanz.

In der vorgelegten Arbeit konnte somit eine verbesserte Konservierung durch Vorbehandlung der Spendertiere mit warmer (21°C) HTK-Lösung gezeigt werden.

Untersuchungen mit tatsächlich marginalen Spendertieren könnten die These der Protektion durch Spendervorbehandlung mit warmer HTK-Lösung noch ausbauen und in der Folge zu einer Vergrößerung der Anzahl transplantierbarer Organe führen.

In direktem Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit entstanden im Rahmen von Vorarbeiten vier Ko-Autorenschaften in Peer-reviewed Journals (s. Anhang VII.4. Publikationsverzeichnis).

VI. Literaturverzeichnis:

1. Adam, R., P. McMaster, J.G. O'Grady, D. Castaing, J.L. Klempnauer, N. Jamieson, P. Neuhaus, J. Lerut, *Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry*. Liver Transpl, 2003. **9**(12): p. 1231-43.
2. Pratschke, J., J. Mittler and P. Neuhaus, [*Expanding the liver donor pool through extended-criteria donation*]. Chirurg, 2008. **79**(2): p. 130-4.
3. Cameron, A. and R.W. Busuttil, *AASLD/ILTS transplant course: is there an extended donor suitable for everyone?* Liver Transpl, 2005(11 Suppl 2): p. S2-5.
4. Gordon Burroughs, S. and R.W. Busuttil, *Optimal utilization of extended hepatic grafts*. Surg Today, 2009. **39**(9): p. 746-51.
5. Strasberg, S.M., T.K. Howard, E.P. Molmenti and M. Hertl, *Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation*. Hepatology, 1994. **20**(4 Pt 1): p. 829-38.
6. Bundesärztekammer, *Bundesärztekammer: Richtlinien zur Organtransplantation nach § 16 TPG, Änderung*. Deutsches Ärzteblatt, 2004. **101**(A): p. 246-247.
7. Gastaca, M., *Extended criteria donors in liver transplantation: adapting donor quality and recipient*. Transplant Proc, 2009. **41**(3): p. 975-9.
8. Tector, A.J., R.S. Mangus, P. Chestovich, R. Vianna, J.A. Fridell, M.L. Milgrom, C. Sanders, and P.Y. Kwo, *Use of extended criteria livers decreases wait time for liver transplantation without adversely impacting posttransplant survival*. Ann Surg, 2006. **244**(3): p. 439-50.
9. Barshes, N.R., I.B. Horwitz, L. Franzini, J.M. Vierling and J.A. Goss, *Waitlist mortality decreases with increased use of extended criteria donor liver grafts at adult liver transplant centers*. Am J Transplant, 2007. **7**(5): p. 1265-70.
10. Rauen, U., B. Polzar, H. Stephan, H.G. Mannherz and H. de Groot, *Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species*. FASEB J, 1999. **13**(1): p. 155-68.
11. Clavien, P.A., P.R. Harvey and S.M. Strasberg, *Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies*. Transplantation, 1992. **53**(5): p. 957-78.
12. Ellory, J.C. and J.S. Willis, *Temperature dependence of the cation affinities of the sodium pump in red cells from hibernators and non-hibernators [proceedings]*. J Physiol, 1978. **275**: p. 62P.

6 Literaturverzeichnis

13. Leaf, A., *On the mechanism of fluid exchange of tissues in vitro*. Biochem J, 1956. **62**(2): p. 241-8.
14. Raison, J.K., *The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems*. J Bioenerg, 1973. **4**(1): p. 285-309.
15. Feng, L., N. Zhao, X. Yao, X. Sun, L. Du, X. Diao, S. Li, and Y. Li, *Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review*. Liver Transpl, 2007. **13**(8): p. 1125-36.
16. Bretschneider, H.J., *Myocardial protection*. Thorac Cardiovasc Surg, 1980. **28**(5): p. 295-302.
17. Tojimbara, T., W.N. Wicomb, R. Garcia-Kennedy, W. Burns, M. Hayashi, G. Collins and C.O. Esquivel, *Liver transplantation from non-heart beating donors in rats: influence of viscosity and temperature of initial flushing solutions on graft function*. Liver Transpl Surg, 1997. **3**(1): p. 39-45.
18. Morariu, A.M., A. Vd Plaats, V.O. W, T.H. NA, H.G. Leuvenink, R. Graaff, R.J. Ploeg, and G. Rakhorst, *Hyperaggregating effect of hydroxyethyl starch components and University of Wisconsin solution on human red blood cells: a risk of impaired graft perfusion in organ procurement?* Transplantation, 2003. **76**(1): p. 37-43.
19. Aminalai, A., G. Kehrer, F. Grossmann, J. Richter and H.J. Bretschneider, *Morphological investigation of the porcine liver directly following preservation with Euro-Collins, University of Wisconsin and Bretschneider's HTK solution*. Langenbecks Arch Chir, 1992. **377**(2): p. 81-8.
20. McKeown, C.M., V. Edwards, M.J. Phillips, P.R. Harvey, C.N. Petrunka and S.M. Strasberg, *Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat*. Transplantation, 1988. **46**(2): p. 178-91.
21. Upadhyya, A.G., R.P. Harvey, T.K. Howard, J.A. Lowell, S. Shenoy and S.M. Strasberg, *Evidence of a role for matrix metalloproteinases in cold preservation injury of the liver in humans and in the rat*. Hepatology, 1997. **26**(4): p. 922-8.
22. Upadhyya, G.A. and S.M. Strasberg, *Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions*. Hepatology, 2000. **31**(5): p. 1115-22.
23. Muhlbacher, F., F. Langer and C. Mittermayer, *Preservation solutions for transplantation*. Transplant Proc, 1999. **31**(5): p. 2069-70.
24. Ringe, B., F. Braun, M. Moritz, G. Zeldin, H. Soriano and W. Meyers, *Safety and efficacy of living donor liver preservation with HTK solution*. Transplant Proc, 2005. **37**(1): p. 316-9.

6 Literaturverzeichnis

25. Vairetti, M., A. Ferrigno, F. Carlucci, A. Tabucchi, V. Rizzo, E. Boncompagni, D. Neri, E. Gringeri, *Subnormothermic machine perfusion protects steatotic livers against preservation injury: a potential for donor pool increase?* Liver Transpl, 2009. **15**(1): p. 20-9.
26. Saad, S. and T. Minor, *Short-term resuscitation of predamaged donor livers by brief machine perfusion: the influence of temperature.* Transplant Proc, 2008. **40**(10): p. 3321-6.
27. Olschewski, P., G. Hunold, C. Eipel, U. Neumann, W. Schoning, V. Schmitz, B. Vollmar, P. Neuhaus, *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.* Transpl Int, 2008. **21**(12): p. 1175-80.
28. Puhl, G., P. Olschewski, W. Schoning, G. Hunold, H.G. Liesaus, R. Winkler, U.P. Neumann, T.E. Schubert, *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.* Liver Transpl, 2006. **12**(12): p. 1841-9.
29. Schmitz, V., J. Klawitter, J. Bendrick-Peart, M. Haschke, V.E. Beckey, S. Laudi, U. Neumann, W. Schoening, *Impact of organ preservation using HTK for graft flush and subsequent storage in UW in rat kidney transplantation.* Eur Surg Res, 2006. **38**(4): p. 388-98.
30. Ariyakhagorn, V., V. Schmitz, P. Olschewski, D. Polenz, S. Boas-Knoop, U. Neumann and G. Puhl, *Improvement of microsurgical techniques in orthotopic rat liver transplantation.* J Surg Res, 2009. **153**(2): p. 332-9.
31. Currin, R.T., R.G. Thurman and J.J. Lemasters, *Carolina rinse solution protects adenosine triphosphate-depleted hepatocytes against lethal cell injury.* Transplant Proc, 1991. **23**(1 Pt 1): p. 645-7.
32. Lemasters, J.J., H. Bunzendahl and R.G. Thurman, *Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation.* Liver Transpl Surg, 1995. **1**(2): p. 124-38.
33. Lee, S., A.C. Charters, J.G. Chandler and M.J. Orloff, *A technique for orthotopic liver transplantation in the rat.* Transplantation, 1973. **16**(6): p. 664-9.
34. Troeberg, L. and H. Nagase, *Measurement of matrix metalloproteinase activities in the medium of cultured synoviocytes using zymography.* Methods Mol Biol, 2003. **225**: p. 77-87.
35. Troeberg, L. and H. Nagase, *Zymography of metalloproteinases.* Curr Protoc Protein Sci, 2004. **Chapter 21**: p. Unit 21 15.
36. Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, *Measurement of protein using bicinchoninic acid.* Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.

6 Literaturverzeichnis

37. Morodomi, T., Y. Ogata, Y. Sasaguri, M. Morimatsu and H. Nagase, *Purification and characterization of matrix metalloproteinase 9 from U937 monocytic leukaemia and HT1080 fibrosarcoma cells*. Biochem J, 1992. **285 (Pt 2)**: p. 603-11.
38. von Bredow, D.C., A.E. Cress, E.W. Howard, G.T. Bowden and R.B. Nagle, *Activation of gelatinase-tissue-inhibitors-of-metalloproteinase complexes by matrilysin*. Biochem J, 1998. **331 (Pt 3)**: p. 965-72.
39. Lee, S., A.C. Charters, 3rd and M.J. Orloff, *Simplified technic for orthotopic liver transplantation in the rat*. Am J Surg, 1975. **130(1)**: p. 38-40.
40. Tan, F., Z. Chen, Y. Zhao, T. Liang, J. Li and J. Wei, *Novel technique for suprahepatic vena cava reconstruction in rat orthotopic liver transplantation*. Microsurgery, 2005. **25(7)**: p. 556-60.
41. Zhang, X.Y. and A.M. Wheatley, *Application of a new sleeve anastomosis technique to graft rearterialization in rat liver transplantation*. Microsurgery, 1996. **17(8)**: p. 472-6.
42. Vogel, T., J.G. Brockmann and P.J. Friend, *Ex-vivo normothermic liver perfusion: an update*. Curr Opin Organ Transplant, 2010 Epub. **15(2)**: p. 167-72.
43. Belzer, F.O. and J.H. Southard, *Principles of solid-organ preservation by cold storage*. Transplantation, 1988. **45(4)**: p. 673-6.
44. Gallandat Huet, R.C., G.F. Karliczek, J.N. van der Heide, U. Brenken, B. Mooi, J.J. van der Broeke, I. Jenkins, and A.F. de Geus, *Clinical effect of Bretschneider-HTK and St. Thomas cardioplegia on hemodynamic performance after bypass measured using an automatic datalogging database system*. Thorac Cardiovasc Surg, 1988. **36(3)**: p. 151-6.
45. Gebhard, M.M., H.J. Bretschneider, E. Gersing, C.J. Preusse, P.A. Schnabel and L.J. Ulbricht, *Calcium-free cardioplegia--pro*. Eur Heart J, 1983. **4 Suppl H**: p. 151-60.
46. Gebhard, M.M., C.J. Preusse, P.A. Schnabel and H.J. Bretschneider, *Different effects of cardioplegic solution HTK during single or intermittent administration*. Thorac Cardiovasc Surg, 1984. **32(5)**: p. 271-6.
47. Preusse, C.J., M.M. Gebhard and H.J. Bretschneider, *Myocardial "equilibration processes" and myocardial energy turnover during initiation of artificial cardiac arrest with cardioplegic solution - reasons for a sufficiently long cardioplegic perfusion*. Thorac Cardiovasc Surg, 1981. **29(2)**: p. 71-6.
48. Bessems, M., B.M. Doorschodt, J.L. Kolkert, R.L. Vetelainen, A.K. van Vliet, H. Vreeling, J. van Marle, and T.M. van Gulik, *Preservation of steatotic livers: a comparison between cold storage and machine perfusion preservation*. Liver Transpl, 2007. **13(4)**: p. 497-504.

6 Literaturverzeichnis

49. Olschewski, P., P. Gass, V. Ariyakhagorn, K. Jasse, G. Hunold, M. Menzel, W. Schoning, V. Schmitz, *The influence of storage temperature during machine perfusion on preservation quality of marginal donor livers*. Cryobiology, 2010 Epub.
50. Brew, K., D. Dinakarpanthian and H. Nagase, *Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 267-83.
51. Galis, Z.S. and J.J. Khatri, *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly*. Circ Res, 2002. **90**(3): p. 251-62.
52. Lombard, C., J. Saulnier and J. Wallach, *Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review*. Biochimie, 2005. **87**(3-4): p. 265-72.
53. Fondevila, C., X.D. Shen, S. Duarte, R.W. Busuttil and A.J. Coito, *Cytoprotective effects of a cyclic RGD peptide in steatotic liver cold ischemia and reperfusion injury*. Am J Transplant, 2009. **9**(10): p. 2240-50.
54. Soccia, P.M., Y. Gasche, D.N. Miniati, G. Hoyt, G.J. Berry, R.L. Doyle, J. Theodore, and R.C. Robbins, *Matrix metalloproteinase inhibition decreases ischemia-reperfusion injury after lung transplantation*. Am J Transplant, 2004. **4**(1): p. 41-50.
55. Ilmakunnas, M., K. Hockerstedt, H. Makisalo, S. Siitonen, H. Repo and E.J. Pesonen, *Endogenous protease inhibitor uptake within the graft during reperfusion in human liver transplantation*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2009.
56. Cursio, R., B. Mari, K. Louis, P. Rostagno, M.C. Saint-Paul, J. Giudicelli, V. Bottero, P. Anglard, *Rat liver injury after normothermic ischemia is prevented by a phosphinic matrix metalloproteinase inhibitor*. FASEB J, 2002. **16**(1): p. 93-5.

VII. Anhang

VII.1. Abkürzungsverzeichnis

LTx	Lebertransplantation
ATP	Adenosintriphosphat
I/R	Ischämie/Reperfusion
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
UW	University-of-Wisconsin-Lösung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
ECM	extrazelluläre Matrix
SEZ	Sinusendothelzelle
AST	Aspartataminotransferase
ALT	Alaninaminotransferase
LDH	Laktatdehydrogenase
KG	Körpergewicht
G	Gauge
G1, G2 etc.	Versuchsgruppe 1, 2 etc.
BCA	Bicinchoninsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
kDa	kilo Dalton
OD	optische Dichte
AU	arbitrary unit
HE	Hämatoxylin Eosin
SD	Standardabweichung
h	Stunde
d	Tag

VII.2. Erklärung

„Ich, Wenzel Schöning, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Spendervorbehandlung mit warmer HTK-Lösung im Lebertransplantationsmodell der Ratte reduziert den Ischämie/Reperfusionsschaden*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Wenzel Schöning