

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Hochdosierte Gabe von Vitamin C bei Lebertransplantationen:
Einfluss auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Susanne Gößling
aus Bielefeld

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Gerlach
2. Prof. Dr. med. J.-M. Langrehr
3. Prof. Dr. D.-H. von Kleist

Datum der Promotion: 10.08.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Einführung	5
1.2	Freie Radikale - Spezies und Wirkungen in biologischen Systemen	6
1.3	Bildung von freien Radikalen im Rahmen der Ischämie/Reperfusion bei Lebertransplantationen	9
1.4	Antioxidantien	12
1.5	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Patientenkollektiv	17
2.2	Einschlusskriterien	17
2.3	Ausschlusskriterien	18
2.4	Studienprotokoll	18
2.5	Bestimmung der thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen im Blutplasma	19
2.6	Bestimmung von Superoxiddismutase, Myeloperoxidase, Interleukin-6 im Blutplasma	21
2.6.1	Superoxiddismutase	22
2.6.2	Myeloperoxidase	25
2.6.3	Interleukin-6	26
2.7	Statistische Methoden	28
3	Ergebnisse	30
3.1	Epidemiologische Daten	30
3.2	Bestimmung der Transaminasen	31
3.3	Laborchemische Untersuchungen	33
3.3.1	Thiobarbituratsäurehaltige Substanzen	34
3.3.2	Superoxiddismutase	38
3.3.3	Myeloperoxidase	42
3.3.4	Interleukin-6	45
3.4	Lineare Regressionsanalyse	48
3.4.1	Transaminasen/ Thiobarbituratsäurehaltige Substanzen	49

3.4.2	Transaminasen/ Superoxiddismutase	50
3.4.3	Transaminasen/ Myeloperoxidase	51
3.4.4	Transaminasen/ Interleukin-6	52
4	Diskussion	53
4.1	Studiendesign	53
4.2	Probengewinnung	54
4.3	Nachweismethoden	54
4.3.1	Bestimmung der thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen	54
4.3.2	ELISA-Bestimmungen	55
4.4	Einfluss von Vitamin C auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden	55
4.4.1	Thiobarbituratsäurehaltige Substanzen	55
4.4.2	Superoxiddismutase	58
4.4.3	Myeloperoxidase	59
4.4.4	Interleukin-6	60
4.5	Klinische Relevanz und Ausblick	62
5	Zusammenfassung	65
6	Literatur	67
7	Abkürzungsverzeichnis	74
8	Anhang	76
8.1	Testkits, Ein- und Mehrwegartikel, Reagenzien	76
8.2	Geräte	76
9	Danksagung	78
10	Lebenslauf	79

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die erste orthotope Lebertransplantation (OLT) beim Menschen wurde 1963 von Starzl *et al.* in Denver durchgeführt (Starzl, 1963; Starzl, 1964). Zu Beginn der Lebertransplantation betrug die Ein-Jahres-Letalität 70 %. Eine Verbesserung der Operationstechnik, eine bessere intensivmedizinische Betreuung nach der Transplantation und eine deutliche Reduktion der Transplantatabstoßung durch den Einsatz von Immunsuppressiva wie Cyclosporin (1979), Tacrolimus (1994) oder T-Zell-Antikörpern führten zu einer Steigerung der Ein-Jahres-Überlebensrate auf 79,7 % (Abt, 2004). Auch eine verbesserte Organkonservierung durch die Einführung der University-of-Wisconsin-Lösung trug wesentlich zu besseren Überlebensraten bei (Wood, 1994).

Bereits seit 1983 stellt die OLT die Therapie der Wahl bei terminalen Lebererkrankungen wie Hepatitis, alkoholischen oder kryptogenen Zirrhosen, cholestatischen Lebererkrankungen wie primär biliären Zirrhosen, primär sklerosierender Cholangitis und auch bei primären und sekundären Stoffwechselerkrankungen dar (National Institutes of Health Development, 1993; Consensus Conference of indication of liver transplantation, 1994).

In der Charité, Campus Virchow - Klinikum, wurden in dem Zeitraum von September 1988 bis Dezember 2002 1376 Lebertransplantationen bei 1245 Patienten durchgeführt. Die Ein-Jahres-Überlebensrate betrug in diesem Zeitraum 92 %, nach 10 Jahren leben noch 74 % der transplantierten Patienten (Lohmann, 2000; Pfitzmann, 2004). Zum jetzigen Zeitpunkt haben noch immer 15-30 % der Transplantate initial eine schlechte Funktion (Müller, 1997), wodurch die Inzidenz von Abstoßungen und Transplantatversagen deutlich erhöht ist. In der Charité zeigten 34 (2,5 %) der im oben genannten Zeitraum transplantierten Patienten ein initiales Transplantatversagen, was eine Retransplantation unverzichtbar machte.

Eine wesentliche Ursache für die Dysfunktion des Transplantates stellt neben dem Konservierungsschaden die Unterbrechung des Blutflusses durch Abklemmen der Lebergefäße des Empfängers während der Transplantation und die damit verbundene Ischämie dar. Im Rahmen dessen werden freie Radikale und inflammatorische Zytokine gebildet, die während der anschließenden Reperfusion zu einer Schädigung des Leberparenchyms bis hin zum Zelltod des neuen Organs führen können (Carden, 2000; Annaya-Prado *et al.*, 2002 (1); Lentsch *et al.*, 2000; Serracina-Inglott *et al.*, 2001; Pirenne *et al.*, 1997).

1.2 Freie Radikale – Spezies und Wirkungen in biologischen Systemen

Unter freien Radikalen versteht man Atome oder Moleküle mit einem ungepaarten Elektron. Bestrebt ihre Elektronenhülle aufzufüllen, zeichnen sich diese durch eine besondere Reaktivität aus. Dadurch können im menschlichen Organismus Gewebeschädigungen hervorgerufen werden (Fry, 1995). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Produktion von freien Radikalen und antioxidativen Abwehrmechanismen. Gerät dieses Gleichgewicht außer Balance, so bezeichnet man dieses als oxidativen Stress (Siess, 1991; Betteridge, 2002).

Radikale, die sich von molekularem Sauerstoff (O_2) oder von Stickstoffmonoxid (NO) ableiten, sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bzw. reaktive Stickstoffverbindungen (RNS), sind von entscheidender Bedeutung für biologische Prozesse und auch für toxische Zellschädigungen. Zu den ROS zählen „echte“ Sauerstoffradikale wie das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$) oder das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}), aber auch reaktive Sauerstoffverbindungen wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die hypochlorige Säure (HOCl) und das Ozon (O_3). Von den RNS ist vor allen Dingen das Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) von Bedeutung (Sussmann, 1995).

Die überwiegende Anzahl der oxidativen Prozesse und Generierung der ROS findet in den Mitochondrien statt (Abb. 1.2.1).

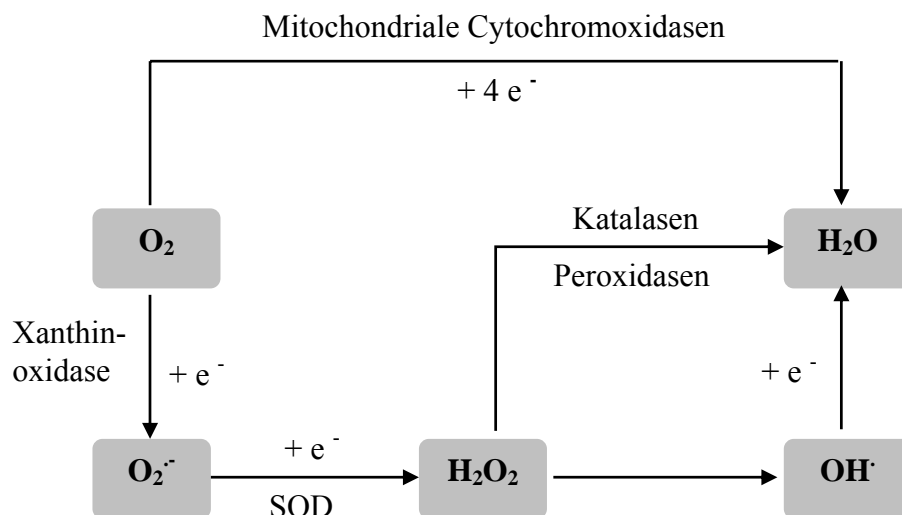
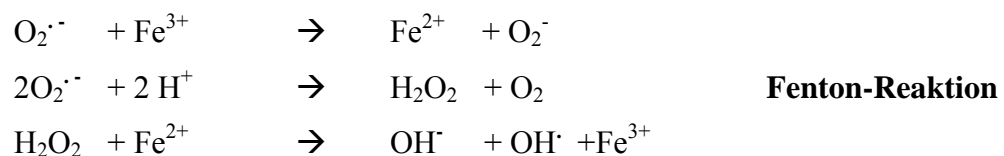


Abb. 1.2.1

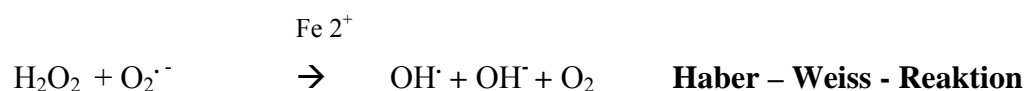
Reduktion von molekularem Sauerstoff (aus Donald Fry, Multiorgan System Failure)

Molekularer Sauerstoff wird unter physiologischen Bedingungen zu 98 % mit Hilfe der Cytochromoxidasen zu Wasser reduziert, 2 % werden durch Reduzierung von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) zu Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Dehydrogenase (NADH) und des Ubichinon-Cytochrom-B-Systems der Mitochondrienmembran zum Superoxidradikal umgewandelt (Biesalski, 1997). Das Superoxidradikal $O_2^{\cdot-}$ ist das Ausgangsprodukt für die Bildung vieler toxischer Sauerstoffmetaboliten. Es kann mit Hilfe des Enzyms Superoxiddismutase, erstmalig von McCord und Fridovich 1968 beschrieben, zum toxischen Metaboliten Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert werden. Mitochondriale Katalasen und Peroxidasen können Wasserstoffperoxid zu Wasser abbauen, es kann jedoch auch zum hochreaktiven Hydroxylradikal reduziert werden (Jassem, 2002).

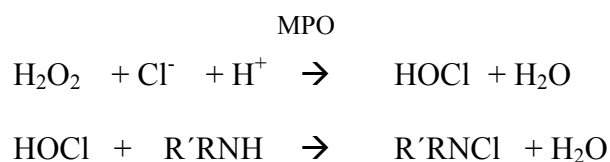
Metalloproteine wie Eisen können die Bildung von Hydroxylradikalen beschleunigen. Dieses bezeichnet man als Fenton-Reaktion:



Eisen kann auch direkt die Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid und dem Superoxidradikal beschleunigen und somit Hydroxylradikale bilden. Dieses geschieht mittels der durch Eisen katalysierten Haber-Weiss-Reaktion:



In den neutrophilen Granulozyten kann Wasserstoffperoxid durch das Enzym Myeloperoxidase (MPO) in hypochlorige Säure (HOCl) umgewandelt werden. Hypochlorige Säure kann mit Aminen ($R'RNH$) und Chloraminen ($R'RNCl$) zu weiteren stark oxidativen Verbindungen reagieren, die für durch Neutrophile verursachte Zellschädigungen verantwortlich gemacht werden.



Die einzelnen Radikale unterscheiden sich durch ihre Reaktivität und ihre Halbwertszeit. So besitzt zum Beispiel das hochreaktive Hydroxylradikal eine Halbwertszeit von 10^{-9} Sekunden, während das Peroxidradikal eine Halbwertszeit von mehreren Sekunden besitzt (Siess, 1991). Hochreaktive Radikale wie das Superoxidradikal oder das Hydroxylradikal können biologische Makromoleküle wie Lipide, Proteine oder Nukleinsäuren angreifen und Radikalkettenreaktionen auslösen. Als äußerster Bestandteil der Zellen ist die Lipidmembran besonders häufig vom Angriff freier Radikale betroffen. Durch Lipidperoxidation (Abb. 1.2.2) kommt es zur Zellschädigung, die im Rahmen der Ischämie/Reperfusion eine entscheidende Bedeutung hat (McCord, 2000; Fry, 1995).

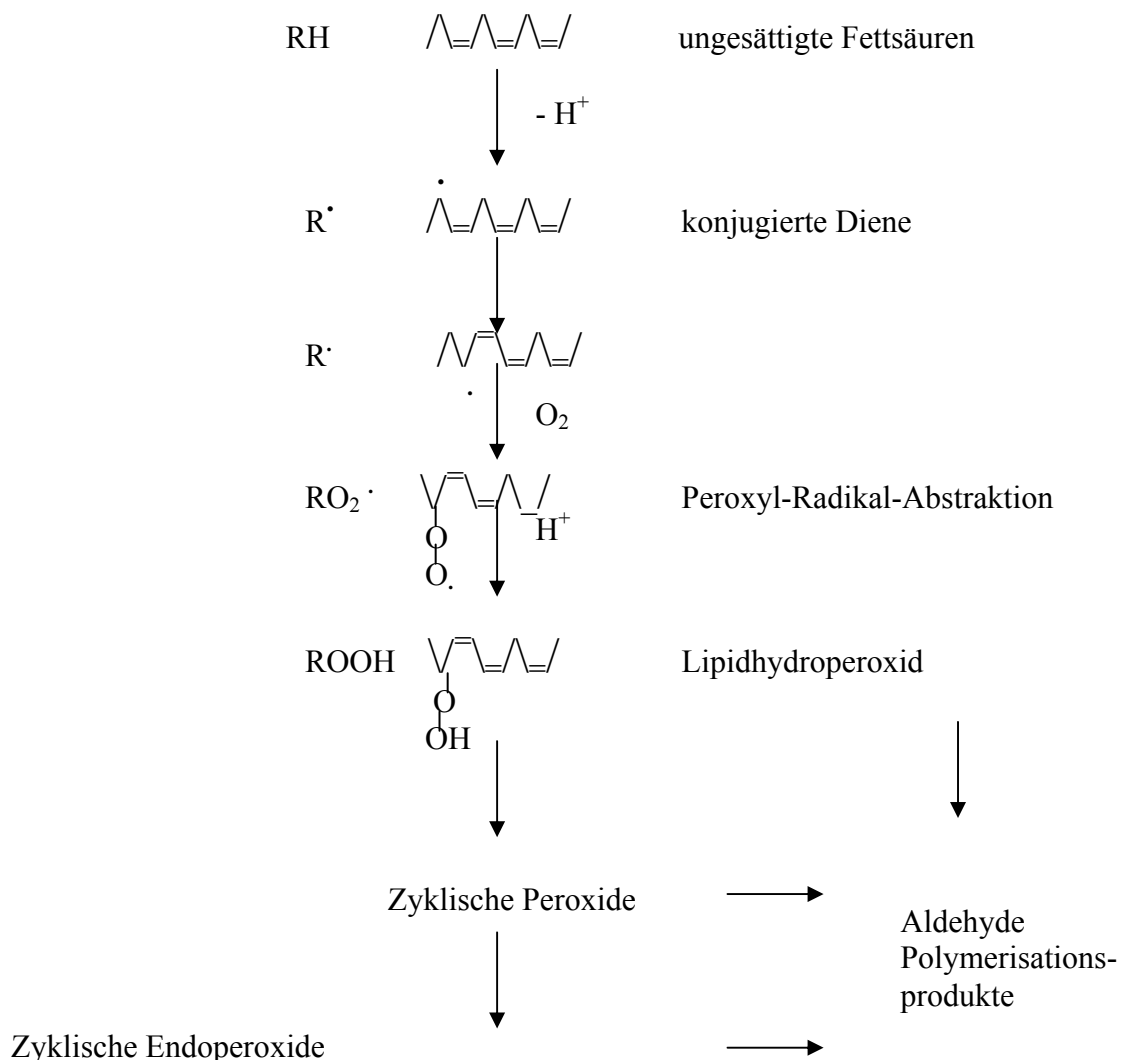


Abb. 1.2.2

Schematische Darstellung der Lipidperoxidation (Betteridge, 2000)

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Radikalen ist es schwierig, freie Radikale direkt nachzuweisen, so dass über Endprodukte von Radikalkettenreaktionen oder durch Nachweis von Enzymen, die Radikalbildungen katalysieren, ein indirekter Rückschluss auf das Ausmaß von gebildeten Radikalen gezogen werden kann.

1.3 Bildung von freien Radikalen im Rahmen der Ischämie/Reperfusion bei Lebertransplantationen

Im Rahmen der Lebertransplantation kommt es durch Abklemmen der Lebergefäße zu einer Unterbrechung des Blutflusses und damit zu einer Unterbrechung der Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr. Der Energiestoffwechsel der Zelle stellt sich durch die Ischämie von aerob auf anaerob um, so dass der intrazelluläre Gehalt an Laktat, Protonen, Natrium und anorganischem Phosphat ansteigt (Roth, 1998). Adenosintriphosphat (ATP) wird innerhalb weniger Minuten zu Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) dephosphoryliert und im weiteren Verlauf zu Inosin und Hypoxanthin deaminiert. Zudem kommt es durch eine Verringerung der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität zu einem erhöhten Ca^{2+} -Spiegel in der Zelle, wodurch kalziumabhängige Proteasen aktiviert werden. Eine dieser Proteasen begünstigt die irreversible Umwandlung von Xanthindehydrogenase zu Xanthinoxidase. Die Xanthindehydrogenase kann auch durch Oxidation der Sulfurylgruppen in Xanthinoxidase umgewandelt werden (Parks, 1986).

Die Geschwindigkeit der Umwandlung der Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase ist organspezifisch, in der Leber beträgt sie ca. 30 Minuten. Durch das Enzym Xanthinoxidase wird das gebildete Hypoxanthin zunächst in Xanthin und im Folgenden zu Harnsäure abgebaut. Mit Beginn der Reperfusion kommt es durch das Eindringen von molekularem Sauerstoff in die Leber zu multifaktoriellen pathophysiologischen Prozessen, die das neue Organ schädigen können. Wie Granger an intestinalen Zellen zeigte, ist nicht die Ischämiephase, sondern die Reperfusion hauptsächlich für den Mukosaschaden verantwortlich (Granger, 1988).

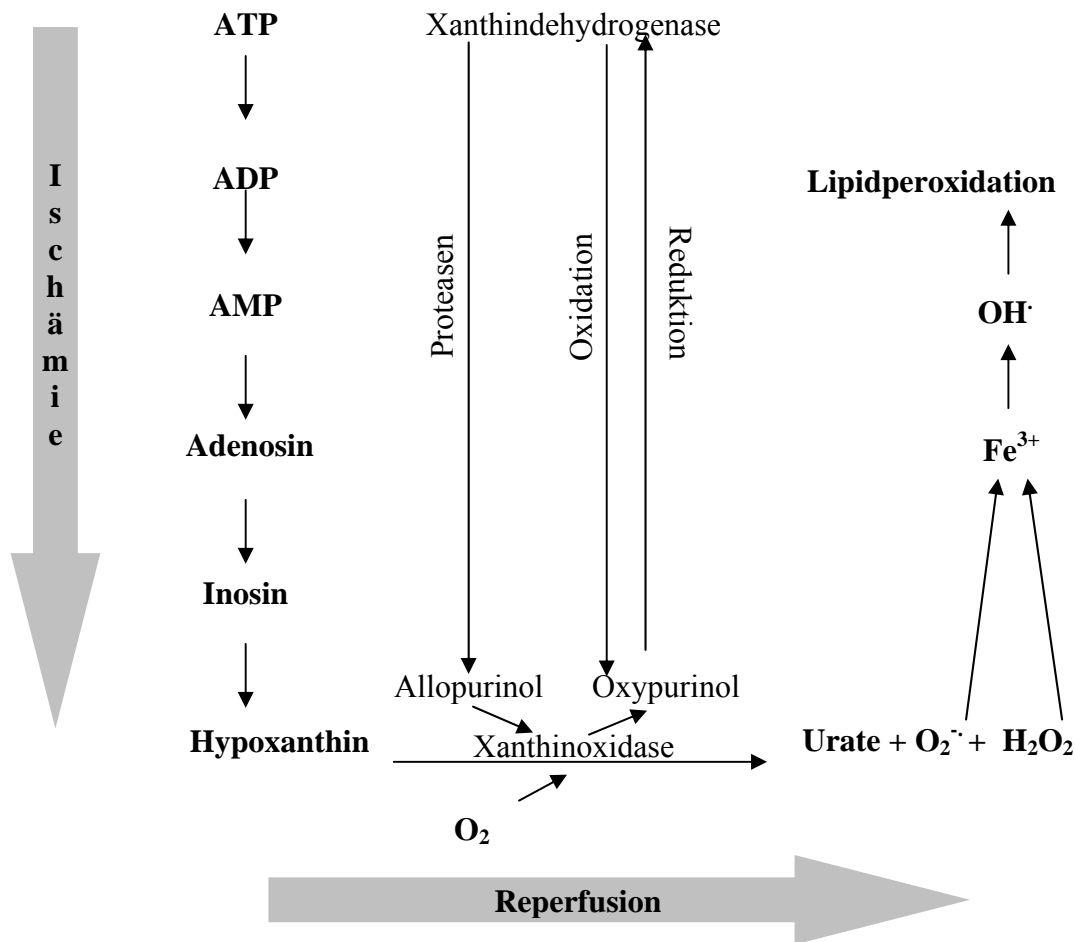


Abb. 1.3.1

Schematische Darstellung der Bildung der ROS während der Ischämie/Reperfusion (modifiziert aus Donald Armstrong, 1998)

In der frühen Phase der Reperfusion kommt es zu einem Anschwellen der Endothelzellen und der Makrophagen (Kupfferschen Sternzellen). Dieses ist bedingt durch den fehlenden aktiven transmembranösen Transport während der Ischämie sowie durch das bestehende Energiedefizit der Zelle. Es besteht eine Vasokonstriktion durch eine Imbalance zwischen Endothelin und Stickstoffmonoxid (NO), da Endothelin während der Ischämie kumuliert und Kofaktoren O_2 und NADPH, die zur NO-Synthese benötigt werden, nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. Es kommt zur Einschränkung der Leukozytenbeweglichkeit mit nachfolgender Mikrozirkulationsstörung, zum Eindringen der Leukozyten in die Hepatozyten und Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen sowie der Neutrophilen. Diese führt über die Interaktion mit Transkriptionsfaktor NF- κ B über eine Expression von TNF- α und - β zur Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel Interleukin-6 und zur Bildung von toxischen hochreaktiven Sauerstoffradikalen (Serracino, 2001; Serrano, 2000; Annaya-Prado, 2002 (2)).

Der eindringende molekulare Sauerstoff wird mit Hilfe der Xanthinoxidase aus Hypoxanthin in das Superoxidradikal umgewandelt. Das hochreaktive und toxische Superoxidradikal kann direkt zu Parenchymschäden führen oder es wird, wie unter 1.2 beschrieben, mittels des Enzyms Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt.

Sowohl aus dem Superoxidradikal bzw. aus Wasserstoffperoxid kann über die Haber-Weiss-Reaktion oder die Fenton-Reaktion das hoch toxische und reaktive Hydroxylradikal gebildet werden, das ebenfalls direkte Parenchymschäden verursacht, aber auch weitere sekundäre Radikalkettenreaktion auslösen kann. Von großer Bedeutung für den Ischämie-/Reperfusionsschaden im Rahmen der Lebertransplantation ist die durch das Hydroxylradikal hervorgerufene Lipidperoxidation (Abb. 1.2.2). Es werden Lipid-peroxidradikale (LOO^\bullet), Alkoxyradikale (LO^\bullet) sowie Singulett-Sauerstoff gebildet, die wiederum die Radikalkettenreaktion unterhalten können.

Wasserstoffperoxid kann auch in Gegenwart von Halogenen, wie zum Beispiel dem Chloridanion (Cl^-), mit Hilfe des aus den neutrophilen Granulozyten freigesetzten Enzyms Myeloperoxidase zu hypochloriger Säure reagieren, die ihrerseits die Hepatozyten schädigen kann (Lentsch 2000). Zu einer Aktivierung der neutrophilen Granulozyten kommt es primär durch das während der Xanthinoxidasereaktion gebildete Superoxidanion, sekundär werden jedoch über eine Aktivierung der zytoplasmatischen und membranassoziierten NADPH-Oxidase ebenfalls Superoxidanionen generiert. Neben dem Enzym Myeloperoxidase werden durch aktivierte Neutrophile Proteasen wie Elastasen, Kathepsin G, Heparinase, Kollagenasen sowie hydrolytische Enzyme ausgeschüttet, die ihrerseits hepatozytenschädigend wirken können (Roth, 1998; Halliwell, 1999). Metalle, wie zum Beispiel Eisen, die durch die oben beschriebene Fenton-Reaktion den Angriff freier Radikale potenzieren können, liegen unter physiologischen Bedingungen gebunden an Trägerproteinen wie Transferrin vor. Durch Zelluntergang können jedoch große Menge an intrazellulären Metalloproteinen freigesetzt werden, die ihrerseits wiederum freie Radikale bilden können. Durch die Bildung der hohen Anzahl an freien Radikalen im Rahmen der Ischämie/Reperfusion kommt es zur Imbalance zwischen der Radikalbildung und den zellulären antioxidativen Abwehrmechanismen, die zu Gewebeschädigungen des neuen Organs und somit zu Transplantatdysfunktionen führen können.

1.4 Antioxidantien

Antioxidantien haben die Fähigkeit während der Reperfusion freigesetzte Radikale abzufangen und in nicht zelltoxische Substanzen umzuwandeln. Zu den wichtigsten endogenen zellulären antioxidativen Systemen gehören die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase sowie das Tripeptid Glutathion.

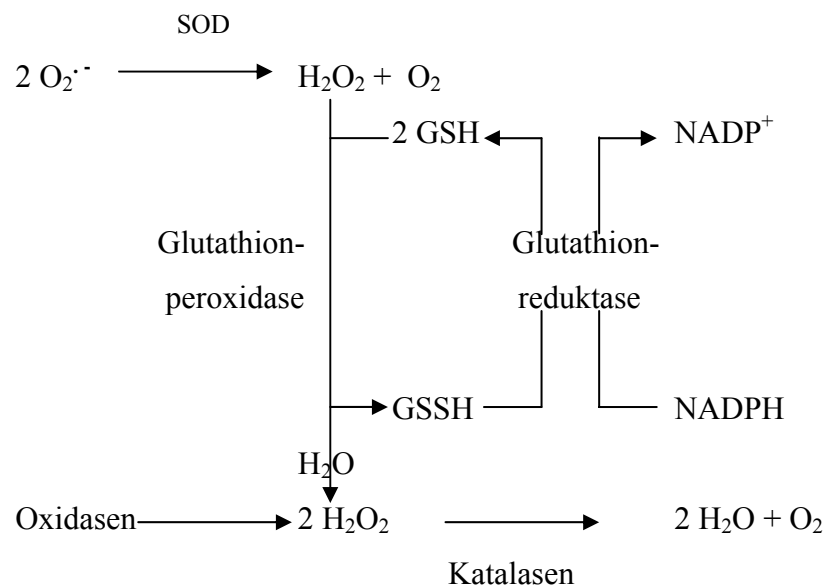


Abb. 1.4.1

Inaktivierung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies durch endogene antioxidative Systeme (Fry, 1995)

Wie bereits unter 1.2 erwähnt, kann die Superoxiddismutase (SOD) hochreaktive Superoxidradikale zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umwandeln. Orr *et al.* (1994) induzierten an transgenen Fliegen eine erhöhte zelluläre Expression von Superoxiddismutase und Katalasen. Sie konnten zeigen, dass in der Versuchsgruppe weniger Schäden durch Peroxidation auftraten und die mutagenen Fliegen eine um ein Drittel erhöhte Lebenserwartung aufwiesen (Biesalski, 1997).

Nach Gabe von modifizierten Superoxiddismutasederivaten im Rahmen einer hepatischen Ischämie/Reperfusion konnte eine Hemmung der Lipidperoxidation beobachtet werden (Nguyen WD *et al.*, 1999, Fujita T *et al.*, 1992). Glutathionperoxidase und Katalase können das gebildete Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abbauen. Glutathionperoxidase ist im Zytosol lokalisiert, während sich die Katalase in den Peroxisomen befindet. Glutathion (GSH) selbst

kann durch die Glutathionperoxidase katalysierte Reaktion Wasserstoffperoxid und andere organische Hydroperoxide reduzieren und wird dabei in das zelltoxische Glutathiondisulfid (GSSH) umgewandelt, welches durch die Glutathionreduktase wiederum in Glutathion überführt wird. Zudem kann Glutathion auch direkt Singulett-Sauerstoff und das reaktive Hydroxylradikal inaktivieren. Es spielt eine wesentliche Rolle in der Regeneration von Tocopherol und des Ascorbylradikals.

Im Rahmen der Ischämie und Reperfusion kommt es zu einer Imbalance zwischen dem Anfall von freien Radikalen und der Möglichkeit der zellulären antioxidativen Systeme diese Radikale abzufangen. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit überwiegend in tierexperimentellen Untersuchungen an Ratten, aber auch im Rahmen humaner Lebertransplantationen Antioxidantien wie Allopurinol (Hemmung der Xanthinoxidase, Karwinski *et al.* 1997), Deferroxamin (Inhibitor der Haber-Weiss-Reaktion, Annayado-Prado, 2002), 17 β -Estradiol (Suppression von TNF α , Eckhoff, 2002), Pentoxyphyllin (Suppression der Zytokinfreisetzung, Verbesserung der Mikrozirkulation, Astarcoğlu *et al.*, 2000), α -Tocopherol (Radikalfänger, Giakoustidis *et al.* 2002; Soltys *et al.* 2001) oder N-Acetylcystein (Sauerstoffradikalfänger, Inhibition der Aktivierung der Thrombozyten, Neutrophilen und Monozyten, Thies *et al.*, 1998) eingesetzt, die einen inhibitorischen Effekt auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden haben (Selzner, 2003).

Auch Vitamin C hat eine starke antioxidative Kapazität, wodurch die Lipidperoxidation durch wasserlösliche Peroxidradikale nahezu komplett verhindert werden kann (Frei *et al.*, 1991). In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass L-Ascorbinsäure die Oxidation isolierter humaner low-density-Lipoproteine (LDL) durch wasserlösliche Radikale verhindert (Bals *et al.*, 1991). Membranständige Radikale werden von der wasserlöslichen Ascorbinsäure nicht beeinflusst. Durch die synergistische Wirkung mit membrangebundenem Tocopherol (Vitamin E) trägt Vitamin C jedoch auch zur Inaktivierung von membranständigen Sauerstoffradikalen bei (Abb. 1.4.2) (Niki, 1991; Siess, 1991).

Vitamin E als lipidlösliches Vitamin ist Bestandteil aller biologischer Membranen. Seine wichtigste Funktion besteht darin, Membranlipide, Lipoproteine und Depotfette vor dem Abbau durch Lipidperoxidation zu schützen (Esterbauer *et al.*, 1992; Burton *et al.*, 1982; Burton *et al.*, 1983), indem durch Übertragung eines Wasserstoffatoms der phenolischen OH-Gruppe das reaktionsträge Tocopherolradikal gebildet wird (Siess, 1991; Biesalski, 1997).

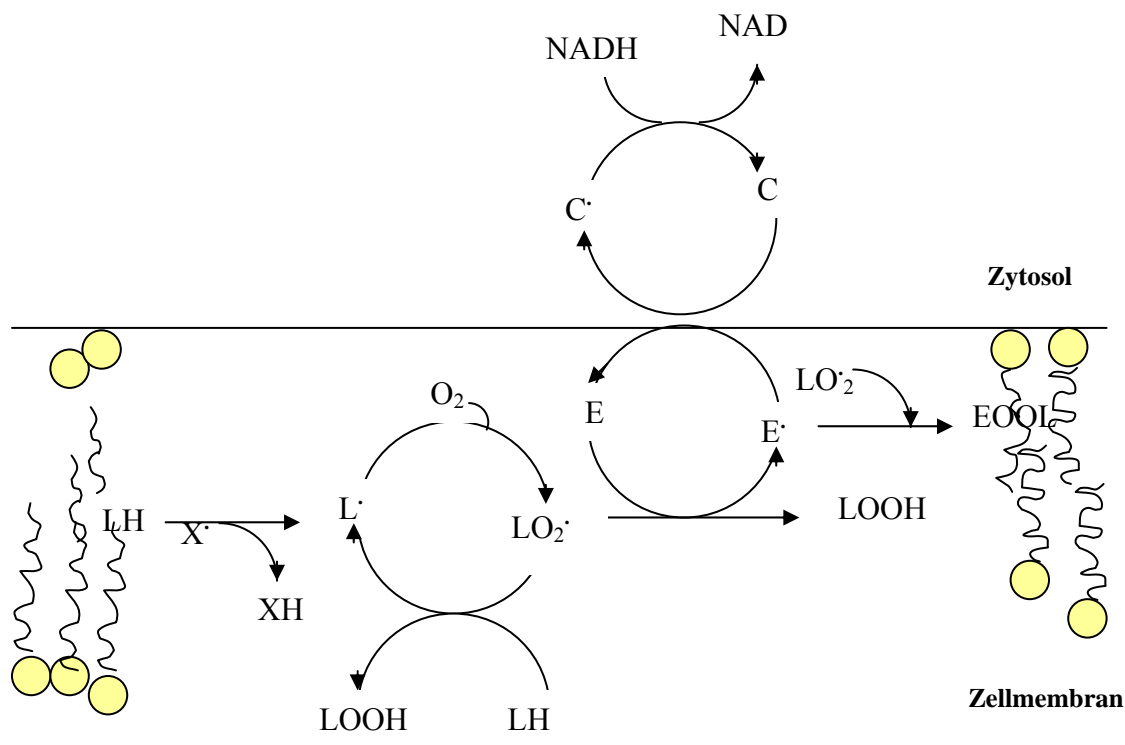


Abb. 1.4.2

Schematische Darstellung der synergistischen Effekte zwischen Ascorbinsäure und Tocopherol (Biesalski, 1997)

LH	Ungesättigte Fettsäure der Membranlipide	E	α -Tocopherol
X·	Radikal	E·	α -Tocopherolradikal
L·	Lipidradikal	C	Vitamin C
LO ₂ ·	Lipidperoxidradikal	C·	Ascorbylradikal
LOOH	Lipidhydroperoxid	EOOL	α -Tocopherolquinon

Die Reaktionsgeschwindigkeit von α -Tocopherol mit Lipidperoxidradikalen liegt ca. viermal höher als die Reaktion des Radikals mit ungesättigten Fettsäuren (Halliwell, 2000). Das gebildete Tocopherolradikal kann ebenfalls mit Lipidperoxidradikalen reagieren, so dass α -Tocopherolquinon entsteht oder es wird mit Hilfe von Vitamin C zu Tocopherol regeneriert.

Vitamin C (C₆H₈O₆) ist ein wasserlösliches Vitamin und unter physiologischen Bedingungen als Kofaktor an der Biosynthese von Kollagen, Carnithin, Katecholaminen und Peptidneurohormonen beteiligt (Wilson, 2002). Im Blutplasma ist Vitamin C in einer Konzentration von 30-60 μ mol nachweisbar. Die intrazelluläre Konzentration an Ascorbinsäure

liegt in der Regel um ein vielfaches höher als die Plasmakonzentration, so beträgt sie zum Beispiel in den Leukozyten 6-8 mmol. Der Transport der Ascorbinsäure aus der Zelle ist ein langsamer energieverbrauchender Prozess, während der Transport in Endothelzellen oder Muskelzellen via Na^+ -Ascorbat-Cotransporter mit hoher Affinität erfolgt. Der intra- und extrazelluläre Transport der Dehydroascorbinsäure erfolgt über einen erleichterten Transport mit Hilfe des Glucose-Transporter-Proteins (May 2000).

Die meisten Gewebe nehmen Vitamin C in Form der Ascorbinsäure aus dem Plasma oder aus dem Interstitium auf. Durch antioxidative Reaktionen oder innerhalb der Biosynthese kann Vitamin C zum Ascorbyl-Radikal oxidiert werden, welches dann weiter zur Dehydroascorbinsäure oxidiert und durch die Dehydroascorbatdehydrogenase in Ascorbinsäure umgewandelt wird (Abb. 1.4.3):

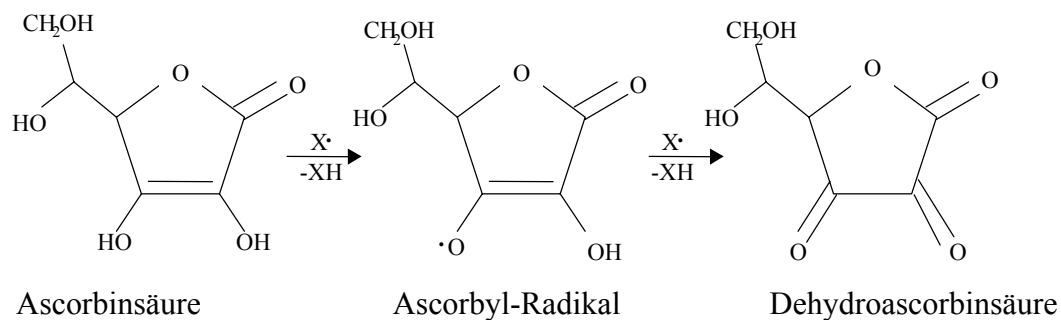


Abb. 1.4.3

Redoxsystem Vitamin C (Plecko, 1998)

Unter Bedingungen, die durch oxidativen Stress charakterisiert sind, können Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure folgende Funktionen einnehmen (Wilson, 2002):

Dehydroascorbinsäure:

- kompetitive Hemmung des erleichterten Glucosetransporters, der Hexokinase, der Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
- Oxidation von NADPH und Glutathion
- Stimulation der Synthese von NADPH und Glutathion

Ascorbinsäure:

- Synthese von Kollagen, Carnithin, Katecholaminen und Peptidhormonen wird gesteigert
- beendet Radikalkettenreaktionen durch Abfangen von ROS und RNS

- verhindert die Oxidation von Glutathion und α -Tocopherol
- verhindert den Abbau von NO in den Endothelzellen (Heller *et al.*,1999)
- erhöht Überlebensrate der Zellen

Halliwell *et al.* (1992) konnten zeigen, dass im Rahmen von oxidativem Stress Vitamin C das erste Antioxidans ist, welches verbraucht wird. Somit liegt die Vermutung nahe, dass durch hochdosierte Vitamin-C-Substitution medikamentös der Ischämie-/Reperfusionsschaden reduziert werden könnte. Hinweise darauf geben Untersuchungen an Rattenherzen (Molyneux *et al.*, 2002), an denen die Untersucher eine Ischämie von 45 Minuten induzierten und anschließend Vitamin C oder Trolox infundierten. Der Perfusionsfluss in den Koronarien war deutlich besser und die Konzentration an Malondialdehyd im Plasma geringer. Untersuchungen im Rahmen von Leberteilresektionen, in denen Multivitamininfusion verabreicht wurden, zeigten einen positiven Effekt auf die Leberfunktionsparameter im postoperativen Verlauf (Cerwenka, 1998).

1.5 Fragestellung

Bisher wurde nicht geklärt, ob eine hochdosierte intravenöse Gabe von Vitamin C bei orthotopen Lebertransplantationen einen positiven Effekt auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden hat und somit die Transplantatfunktion verbessert werden kann. In der vorliegenden Arbeit sollen vor allen Dingen folgende Fragen geklärt werden:

1. Hat eine intraoperative, hochdosierte intravenöse Vitamin-C-Gabe einen positiven Einfluss auf die Transaminasen als Marker der postoperativen Leberfunktion?
2. Wird durch intraoperative Vitamin-C-Gabe die Anzahl freier Radikale im Serum/Plasma verringert?
3. Welchen Einfluss hat die hochdosierte Vitamin-C-Gabe auf die systemische Inflammation?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

In der vorliegenden Untersuchung erfassten wir 30 Patienten, die im Zeitraum zwischen 1999 und 2000 in der Charité, Campus Virchow-Klinikum lebertransplantiert wurden. Alle 30 Patienten waren bei Eurotransplant gemeldet und erhielten das Organ eines hirntoten Spenders.

2.2 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden alle Patienten mit einem Mindestalter von 18 Jahren, die aufgrund der bestehenden Leberzirrhose lebertransplantiert wurden. Das Ausmaß der Leberzirrhose bestimmten wir anhand der Child-Pugh-Kriterien (Tab. 2.2).

Tab. 2.2

Child – Pugh – Kriterien zur Einteilung des Schweregrades der Zirrhose (Herold, 1993)

	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte
Albumin im Serum (g/dl)	> 3,5	2,8 - 3,5	< 2,8
Bilirubin im Serum (mg/dl)	< 2,0	2,0 - 3,0	> 3,0
Quick %	> 70	40 - 70	< 40
Aszites	0	+ - ++	+++
Enzephalopathie	0	I -II	III - IV

Child A: 5 – 7 Punkte

Child B: 7 – 9 Punkte

Child C: 9 – 15 Punkte

2.3 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Patienten, die zum Transplantationszeitpunkt jünger als 18 Jahre waren, die retransplantiert wurden, die eine Splitleber oder eine Leberlebendspende erhielten sowie Patienten, bei denen Kontraindikationen für eine Vitamin-C-Infusionstherapie bestanden. Kontraindikationen gegen eine intravenöse Vitamin-C-Substitution sind Oxalatsteine, Eisenspeicherkrankheiten wie Thalassämie und Hämochromatose, Schwangerschaft und ein Glucose-6-phosphat-dehydrogenasemangel/-defekt.

2.4 Studienprotokoll

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um eine Anwendungsbeobachtung, in der der oxidative Stress bei Lebertransplantationen durch Bestimmung der thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen, der Superoxiddismutase, der Myeloperoxidase und des Interleukin-6 verifiziert wurde. Ein Votum der Ethikkommission lag vor. Alle Patienten erhielten nach Narkoseeinleitung durch den zuständigen Anästhesisten zur intraoperativen Überwachung einen 3 bzw. 4-lumigen zentralvenösen Katheter, wenn möglich in die Vena jugularis dextra und zur kontinuierlichen Blutdruckmessung eine arterielle Kanüle (Vygon 20 G) in die Arteria radialis dextra. Die Narkose wurde nach den in der Charité, Campus Virchow-Klinikum geltenden Standards in Kombinationsanästhesie mit Fentanyl und Desfluran durchgeführt.

Eine Randomisierung im klassischen Sinn fand nicht statt. Alle Patienten ab einem Alter von 18 Jahren wurden in zeitlicher Reihenfolge in die Untersuchung eingeschlossen, unabhängig von Geschlecht, Alter und Ursache der Leberzirrhose. 10 Patienten erhielten im Rahmen der Anwendungsbeobachtung zu Beginn der anhepatischen Phase 7,5 g Vitamin C (Vitamin C Injektapas® Pascoe) in 50 ml per infusionem über einen Zeitraum von 30 Minuten. Die Kontrollgruppe, bestehend aus 20 Patienten, erhielt keine Substitution mit Vitamin C.

Insgesamt wurde den Patienten zu sieben Zeitpunkten 10 ml EDTA-Blut, 10 ml Heparin-Blut und 10 ml Serum entnommen.

- Entnahmezeitpunkte :
1. vor Operationsbeginn
 2. 15 Min. nach Explantation der Leber
 3. 5 Min. vor der Reperfusion
 4. 5 Min. nach der Reperfusion
 5. 15 Min. nach der Reperfusion
 6. 60 Min. nach der Reperfusion
 7. 240 Min. nach der Reperfusion

Die Blutproben wurden nach jeder Abnahme sofort in Eis gekühlt und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4° C und 3000 Umdrehungen 10 Minuten zentrifugiert danach der Überstand abpipettiert, in Eppendorfhütchen aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C tiefgefroren.

2.5 Bestimmung von thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen im Blutplasma

Die, wie unter 2.4 beschrieben, gewonnenen und tiefgefrorenen Proben tauten wir vor der Verarbeitung langsam. Die Messungen erfolgten mit Unterstützung der Firma Pascoe und des Zentrums für Ernährungswissenschaft der Universität Stuttgart-Hohenheim. Für den Nachweis wurde EDTA-Plasma verwendet.

Testprinzip:

Für den Nachweis der Lipidperoxidation wurde die Konzentration von Malondialdehyd mit Hilfe der Thiobarbituratreaktion bestimmt (Yagi,1984). Wie in Abb. 2.5.1 dargestellt, verbinden sich bei niedrigem pH-Wert Malondialdehyd (MDA) als Abbauprodukt der Lipidperoxidation mit 2 Molekülen Thiobarbituratsäure (TBA) zu einem roten fluoreszierenden Farbstoff, der mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen werden kann.

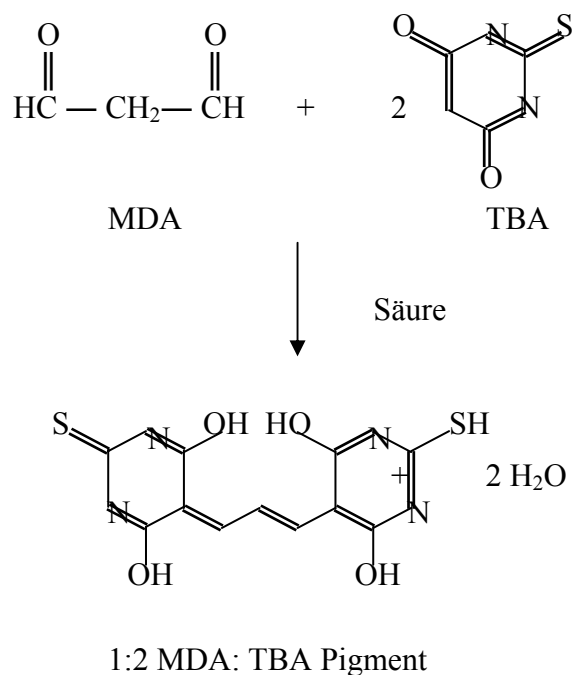


Abb. 2.5.1

Thiobarbituratsäurereaktion (Janero, 1990)

Durchführung:

Für die Bestimmung der thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen (TBARS) verwendeten wir EDTA-Plasma zu je 250 µl aliquotiert

Als Kalibrierlösung stellten wir eine 50 µmolare Stammlösung von Malondialdehyd durch Hydrolyse von Tetramethoxypropan her. Zu 10 ml H₂O bidest gaben wir 50 µl Tetramethoxypropan und 100 µl 1 N Salzsäure. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur hydrolysiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die Konzentrationen der daraus hergestellten Kalibrierlösungen lagen zwischen 0,05 und 2,0 µmol/ TBARS.

Die Proben bereiteten wir wie folgt auf:

1. Zu 250 µl aufgetautem EDTA-Plasma 10 µl ButylatedHydroxyToluen (BHT)-Lösung (227 mol/l) geben und schütteln,
2. anschließend 200 µl 0,2 molare Phosphorsäurelösung zugeben und schütteln,
3. 25 µl Thiobarbituratsäure (16 mg/l) hinzufügen und wiederum schütteln,
4. das Gemisch 45 Minuten bei 95 Grad kochen und anschließend auf Eis abkühlen,
5. 50 µl gesättigte NaCl-Lösung zur besseren Erkennung der Phasengrenze hinzufügen und das Gemisch anschließend mit 500 µl Butanol extrahieren,

6. die Butanolphase durch Zentrifugieren (1 Min. bei 12000 rounds per minute (rpm)) abtrennen,
7. 200 µl der oberen Butanolphase abziehen und in eine 96-well-Platte überführen,
8. die Fluoreszenzmessung erfolgt bei einer Anregung von 530 (+/- 25) nm und einer Emission von 590 (+/- 35) nm.

Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.6 Bestimmung von Superoxiddismutase, Myeloperoxidase und Interleukin-6 im Blutplasma

Die quantitative Bestimmung der Superoxiddismutase, der Myeloperoxidase und des Interleukin-6 erfolgte mittels Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) vom Sandwich-Typ. Die Proben wurden wie unter 2.4 beschrieben aufgearbeitet und vor der Verarbeitung langsam aufgetaut. Für die folgenden Bestimmungen verwendeten wir Heparin-Plasma oder Serum entsprechend den Empfehlungen des Herstellers des jeweiligen Test-Kits.

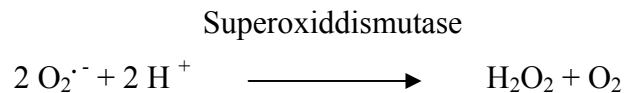
Funktionsprinzip des ELISA:

Bei einem ELISA vom Sandwich-Typ werden jeweils monoklonale bzw. polyklonale Antikörper gegen zwei verschiedene Epitope des Zytokins bzw. des Enzyms verwendet. In einem ersten Schritt bindet das Zytokin bzw. das Enzym an eine mit einem spezifischen Antikörper beschichtete Festplatte (Mikrotiterplatte). Nach einem Reinigungsvorgang wird ein zweiter Antikörper auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Der zweite Antikörper bindet spezifisch an ein anderes Zielepitop des zu messenden und bereits durch den ersten Antikörper an die Festplatte gebundenen Zytokins bzw. Enzyms. Der zweite Antikörper ist mit einem Enzym markiert. So kommt es nach Zugabe eines Farbstoffes, welcher als Substrat fungiert, zu einer enzymatischen Farbreaktion. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe einer Säure (Schwefelsäure bzw. Phosphorsäure) gestoppt. Durch photometrische Bestimmung der Extinktion kann die relative Konzentration des gebundenen Antigens gemessen werden. Die Konzentration des Zytokins/Enzyms im Plasma/Serum lässt sich durch Messung gegen eine bekannte Standardreihe und Zuhilfenahme entsprechender Eichkurven errechnen.

Die photometrischen Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen einen Referenzfilter von 630 nm. Bei über der Nachweisgrenze liegenden Werten wurden die Proben entsprechend verdünnt. Alle Messungen führten wir als Doppelbestimmungen durch.

2.6.1 Superoxiddismutase

Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen mit Hilfe von Wasserstoffprotonen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. McCord und Fridovich entdeckten es erstmalig 1968 als ein Enzym, welches ein Radikal als Substrat verwendet.



Zur Bestimmung der Superoxiddismutase verwendeten wir den kommerziellen ELISA-Kit der Firma Seramun Diagnostica GmbH (Katalog-Nr.: E-002).

Testprinzip:

Das Heparin-Plasma wurde mit Peroxidase markierten monoklonalen Cu/Zn-SOD-Antikörpern markiert, in die mit polyklonalen anti-human Cu/Zn-SOD-Antikörpern beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Komponenten saugten wir aus den Vertiefungen ab, spülten die Vertiefungen mit Waschpuffer und füllten sie mit Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid (Substrat) für die enzymatische Reaktion. Nach 10 Minuten stoppten wir die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure. Es erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Anhand der mitgeführten Cu/Zn-Standardkonzentrationen errechneten wir eine Bezugskurve, aus der die Cu/Zn-SOD-Konzentration der untersuchten Proben bestimmt werden konnte.

Durchführung:

Für die Bestimmung verwendeten wir Heparin-Plasma, das zuvor zu je 500 µl aliquotiert wurde. Die Proben wurden direkt vor der Verarbeitung langsam aufgetaut.

1. Der Testkit enthielt insgesamt 8 Lösungen, die zum Teil vor der Verwendung verdünnt werden mussten.

Gebrauchsfertige Lösungen:

- a. Verdünnungsmedium (50 ml):
 - Trispuffer 0,01 mol/l

- NaCl 0,25 mol/l
 - Haemaccel[®]35 5 %
 - Tween 20 0,1 %
 - Phenolrot 0,001 %
- b. Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung (15 ml):
- Citratpuffer 25 mmol/l
 - 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin 1,0 mmol/l
 - Wasserstoffperoxid 2,4 mmol/l
 - Kathon 0,008 %
- c. Stopplösung (15 ml):
- Schwefelsäure 0,25 mol/l

Konzentrate:

- a. Waschpuffer (50 ml) pH 7,4 +/- 0,1
- Trispuffer 0,1 mol/l
 - NaCl 2,5 mol/l
 - Tween 20 1,0 %
 - Thiomersal 0,01 %
- b. Cu/Zn-SOD-Standard (0,5 ml)
- Trispuffer 0,01 mol/l
 - NaCl 0,25 mol/l
 - Cu/Zn SOD 0,55 µg/ml
 - Rinderserum-Albumin 5 %
 - Saccharose 4 %
 - Kathon 1,0 %
- c. Cu/Zn-SOD-Kontrolle 1 (0,5 ml) und -Kontrolle 2 (0,5 ml):
- Trispuffer 0,01 mol/l
 - NaCl 0,25 mol/l
 - Cu/Zn-SOD 0,22 µg/ml (Kontrolle1)
 - Cu/Zn-SOD 0,11 µg/ml (Kontrolle 2)
 - Saccharose 4 %
 - Kathon 1,0 %
- d. Anti-human Cu/Zn-SOD-POD-Konjugat (0,3 ml):
- Trispuffer 0,01 mol/l

- NaCl 0,25 mol/l
- Rinderserum-Albumin 5 %
- Kathon 4 %
- anti-human Cu/Zn-SOD-POD

Die Konzentrate wurden vor der Messung wie folgt verdünnt:

Waschpuffer:

- Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnen, zum Beispiel 10 ml Waschpuffer + 90 ml Aqua dest.

Cu/Zn-SOD-Standard:

- Cu/Zn-SOD-Standard 11fach mit im Testkit enthaltenen Verdünnungsmedium verdünnen, so dass man eine Konzentration von 50 ng/ml SOD enthält
- In Folge eine Verdünnungsreihe bis zu einer Konzentration von 6,25 ng/ml herstellen

Wir mischten 50 µl Cu/Zn-SOD-Standard mit 500 µl Verdünnungsmedium, um eine Konzentration von 50 ng/ml SOD (Standard 1) zu erhalten. 200 µl der Standard-1-Lösung wurden mit 200 µl Verdünnungsmedium gemischt, das einer Konzentration von 25 ng/ml SOD entspricht (Standard 2). Die Standard-2-Lösung wurde wiederum im Verhältnis 1:1 mit Verdünnungsmedium vermischt, um Standard 3 mit einer Konzentration von 12,5 ng/ml SOD zu erhalten, durch nochmalige 1:1 Verdünnung von Standard 3 erhielten wir die Standard-4-SOD-Lösung mit einer Konzentration von 6,25 ng/ml.

Cu/Zn-Kontrolle 1 und Kontrolle 2:

- Cu/Zn-Kontrolllösungen im Verhältnis 1:11 mit im Testkit enthaltenen Verdünnungsmedium mischen, zum Beispiel 50 µl Kontrolllösung + 500 µl Verdünnungsmedium.

Anti-human Cu/Zn-SOD-POD Konjugat:

- Anti-human Cu/Zn-SOD-POD-Konjugat 101fach mit Verdünnungsmedium verdünnen, zum Beispiel 15 µl Konjugat + 1,5 ml Verdünnungsmedium

2. 50 µl der Konjugatlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren,

3. 50 µl der aufgetauten Proben, 50 µl der Verdünnungslösung, 50 µl der Standards in Konzentrationen 50 ng/ml bis 6,25 ng/ml sowie 50 µl der Kontrollen 1 und 2 in die Mikrotiterplatten pipettieren,
4. die Mikrotiterplatte mit einer selbstklebenden Folie abdecken und 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren,
5. die überschüssige Lösung aus den Vertiefungen absaugen und 4-mal mit Waschlösung waschen,
6. 100 µl gebrauchsfertige Tetramethylbenzidin-Substratlösung in alle Vertiefungen pipettieren und 10 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln unter Schütteln inkubieren,
7. 100 µl Stopplösung (Schwefelsäure 0,25 mol/l) in alle Vertiefungen pipettieren.

Die Extinktion bestimmten wir innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und bei einer erneuten Bestimmung die Proben mit hoher SOD-Konzentration vor der Bestimmung verdünnt.

2.6.2 Myeloperoxidase

Die Proben wurden wie unter 2.4 beschrieben gewonnen und aufbereitet.

Zur Messung der Myeloperoxidase (MPO) - Konzentration verwendeten wir den Testkit der Firma Immundiagnostik K6630.

Testprinzip:

Die quantitative Myeloperoxidasebestimmung wurde mittels ELISA nach dem unter 2.4 beschriebenen Funktionsprinzip durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte bei diesem Testkit durch ein Antikörper-Peroxidase/Tetramethylbenzidin-System, das nach Zugabe der Stopplösung die Farbe von gelb nach blau wechselte. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) proportional. Wir erstellten eine Standardkurve, aus der die Konzentrationen ermittelt wurden.

Durchführung:

Zur Bestimmung der Myeloperoxidase verwendeten wir Heparin-Plasma. Die Proben bereiteten wir wie folgt auf:

1. Die lyophilisierten Standards und Kontrollen mit jeweils 500 µl Aqua dest. rekonstituieren und zum Lösen 10 Minuten stehen lassen,
2. die Plasmaproben vor dem Einsatz im Test 1:40 verdünnen (25 µl Plasmaprobe + 975 µl Pufferlösung) (K 6630PV),
3. die vorbeschichtete Mikrotiterplatte (K6630MTP) 5-mal mit je 250 µl Waschpuffer (K 6630WP) waschen und anschließend mit Saugpapier ausschlagen,
4. 100 µl Standards, Kontrollen und Patientenproben in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren,
5. eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren,
6. den Inhalt der Platte verwerfen und die Vertiefungen 5-mal mit je 250 µl Waschpuffer waschen,
7. in die Vertiefungen 100 µl Peroxidase-markierten-Antikörper (Kaninchen-anti-MPO, K 6630K) pipettieren,
8. eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren,
9. Inhalt der Platte verwerfen und die Vertiefungen 5-mal mit je 250 µl Waschpuffer waschen,
10. 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat in die Vertiefungen geben,
11. 5 – 15 Min. bei Raumtemperatur inkubieren, bis eine ausreichend große Farbdifferenz auftritt,
12. 50 µl Stopplösung (H₂SO₄) (K6630AC) zusetzen und kurz mischen.

Aus Extinktionsmessungen bei 450 nm gegen eine Referenz von 630 nm konnte die MPO Konzentration im Plasma ermittelt werden. Proben, die über der Nachweisgrenze lagen verdünnten wir bei einer erneuten Messung 1:10 bzw. 1:100. Alle Bestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.6.3 Interleukin-6

Interleukin-6 ist ein Zytokin mit pro- und antiinflammatorischen Effekten. Als potenter Lymphoid-Zell-Wachstumsfaktor nimmt Interleukin-6 Einfluss auf die Funktion der B- und T-Lymphozyten und die Funktion der Hybridzellen. In Zusammenhang mit Interleukin-2 und Interferon- γ kann Interleukin-6 die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen beeinflussen.

Zur Messung der IL-6 Konzentration verwendeten wir den Testkit der Firma BD Bioscience Human IL-6 ELISA Kit II (Katalog – Nr. 550799).

Testprinzip:

Die Bestimmung des Zytokins Interleukin-6 erfolgte mit einem ELISA vom Sandwich-Typ.

Ein monoklonaler Antikörper gegen IL-6 wurde an die Mikrotiterplatte gebunden und die Proben sowie die Standards hinzugefügt. Nach einem Waschvorgang mit Peroxidase-Lösung gaben wir einen Anti-human IL-6-Antikörper dazu. Es erfolgte ein erneuter Waschvorgang mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin(TMB)-Lösung, wodurch eine blaue Farbe entstand. Nach Zugabe der Stopplösung sahen wir einen Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion wurde bei 450 nm gemessen und dadurch die relative IL-6-Konzentration bestimmt.

Durchführung:

Als Proben verwendeten wir Heparin-Plasma zu je 500 µl aliquotiert. Sie wurden wie folgt aufbereitet:

1. Zunächst die entsprechenden lyophilisierten Standardlösungen durch Verdünnung mit Verdünnungspuffer herstellen. Die Verdünnungsreihe enthält 6 Konzentrationen Standardlösung mit 300; 150; 75; 37,5; 18,8; 9,4 bis 4,7 pg/ml,
2. 50 µl der ELISA-Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren,
3. 100 µl der Standardlösungen bzw. 100 µl der Heparin-Plasmaproben hinzufügen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren,
4. den biotinylierten, monoklonalen IL-6 Antikörper in 12 ml Verdünnungspuffer rekonstituieren und gut mischen,
5. die überschüssige Flüssigkeit aus den Vertiefungen pipettieren und 5-mal mit der Waschlösung waschen, die Waschlösung zuvor 1:20 verdünnen,
6. 100 µl des biotinylierten anti-human IL-6 monoklonalen Antikörpers in jede Kavität der Mikrotiterplatte geben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren,
7. die überschüssige Flüssigkeit aus den Vertiefungen pipettieren und 7-mal mit der Waschlösung waschen,
8. die Substratlösung aus 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid frisch ansetzen und 30 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubieren,
9. die Enzymreaktion mit 50 µl Stopplösung (1M Phosphorsäure) beenden.

Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen einen Referenzfilter von 630 nm. Die IL-6-Konzentrationen wurden anhand der erstellten Eichkurve ermittelt. Alle Bestimmungen führten wir als Doppelbestimmungen durch.

2.7 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Daten wurde wie folgt durchgeführt:

Im ersten Schritt wurden die Homogenität der beiden zu vergleichenden Gruppen, d. h. Patienten, die während der Transplantation Vitamin C erhielten und Patienten, denen kein Vitamin C substituiert wurde, gegeneinander getestet. Für den Vergleich des Alters, der kalten Ischämiezeit sowie der Klemmzeit verwendeten wir den Mann-Whitney-U-Test als Rangsummentest. Das Geschlecht der Patienten und die qualitativen Merkmale wie die Klassifikation der Schweregrade der Grundkrankheit sowie die Genese der Erkrankung wurde mittels Chi²-Test auf signifikante Unterschiede getestet.

Im zweiten Schritt verglichen wir als Verlaufsparemeter die Transaminasen der beiden Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten. Da hier nicht von einer Normalverteilung der jeweiligen Messwerte (z. B. der GOT-Werte) ausgegangen werden kann, ein t-Test sich also verbietet, wurde auch hier der Rangsummentest (Mann-Whitney-U-Test) verwendet.

Im dritten Schritt der Analyse erfolgte die Auswertung der Ergebnisse der laborchemischen Untersuchungen. Um den Einfluss eines nominalen Merkmals auf eine metrische Zielgröße zu untersuchen, wurde für jeden untersuchten Parameter (TBARS, SOD, MPO, IL-6) sowohl in der Vitamin-C- als auch in der Kontrollgruppe eine Friedman-Analyse durchgeführt.

Nach Betrachtung der Verläufe innerhalb einer Gruppe wurden die Ausgangswerte mit den Werten des größten Anstiegs auf signifikante Unterschiede mittels des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben getestet. Wird die Nullhypothese verworfen, so kann von einem signifikanten Unterschied ausgegangen werden.

Um die Ergebnisse zwischen der Kontrollgruppe und der mit Vitamin-C-substituierten Gruppe festzustellen, wurden die maximalen Anstiege der einzelnen Parameter miteinander verglichen. Zur besseren Übersichtlichkeit verwendeten wir die relativen Werte. Mittels des Mann-Whitney-U-Testes testeten wir die beiden Gruppen auf signifikante Unterschiede. Alle p-Werte, die über dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ lagen, betrachteten wir als nicht signifikant.

Um zu überprüfen, ob die Transaminasen, die üblicherweise als Marker der Leberfunktion verwendet werden, auch ein sinnvoller Marker für den Ischämie-/Reperfusionsschaden darstellen, führten wir eine lineare Regressionsanalyse durch. Für die lineare Regression wurden jeweils die maximalen Anstiege der Marker des oxidativen Stresses beider Gruppen und die postoperativen GOT- und GPT-Werte herangezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Epidemiologische Daten

Tabelle 3.1 Stammdaten der Kontroll- und der Vitamin-C-Gruppe

	Kontrollgruppe N = 17¹	Vitamin-C-Gruppe N = 10	Test	p-Wert
Alter (Jahre)	48 (28 - 63)	46 (22 - 57)	Mann-Whitney-U	0,725
Geschlecht (m/w)	(8/9)	(6/4)	Chi ²	0,524
Child -Pugh-Klassifikation			Chi ²	0,354
A	3	0		
B	9	7		
C	5	3		
Erkrankung:			Chi ²	0,356
- Virushepatitis	8	2		
- Äthyltoxische Leberzirrhose	5	5		
- Sonstige²	4	3		
Kalte Ischämiezeit (min)	503 (69 - 739)	455 (214 - 661)	Mann-Whitney-U	0,340
Klemmzeit (min)	75 (37 - 145)	80 (62 - 117)	Mann-Whitney-U	0,669

1 3 Patienten nicht berücksichtigt, da Abweichungen vom standardmäßigen Operationsverlauf (Ausklemmen der infrarenalen Aorta) bzw. Fehler bei den Blutabnahmen (Blut geronnen, Abnahmezeitpunkte fehlten)

2 Budd-Chiari-Syndrom, Autoimmunhepatitis, Hepatozelluläres Karzinom, Primär sklerosierende Cholangitis

Die beiden Gruppen zeigen hinsichtlich des Alters, der Geschlechtsverteilung, dem Schweregrad der Erkrankung (klassifiziert anhand der Child-Pugh-Kriterien) sowie der zugrunde liegenden Grunderkrankung keine signifikanten Unterschiede. Die kalte Ischämiezeit, d. h. der Zeitpunkt der Explantation des Organs bis zur Reperfusion sowie die intraoperative Klemmzeit (Abklemmen der großen Gefäße intraoperativ bis zum Öffnen der Gefäße) zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, Chi²-Test, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$).

3.2 Bestimmung der Transaminasen

Zwischen der Kontroll- und Vitamin-C-Gruppe wurden die Transaminasenverläufe präoperativ, postoperativ und 24 Stunden postoperativ verglichen.

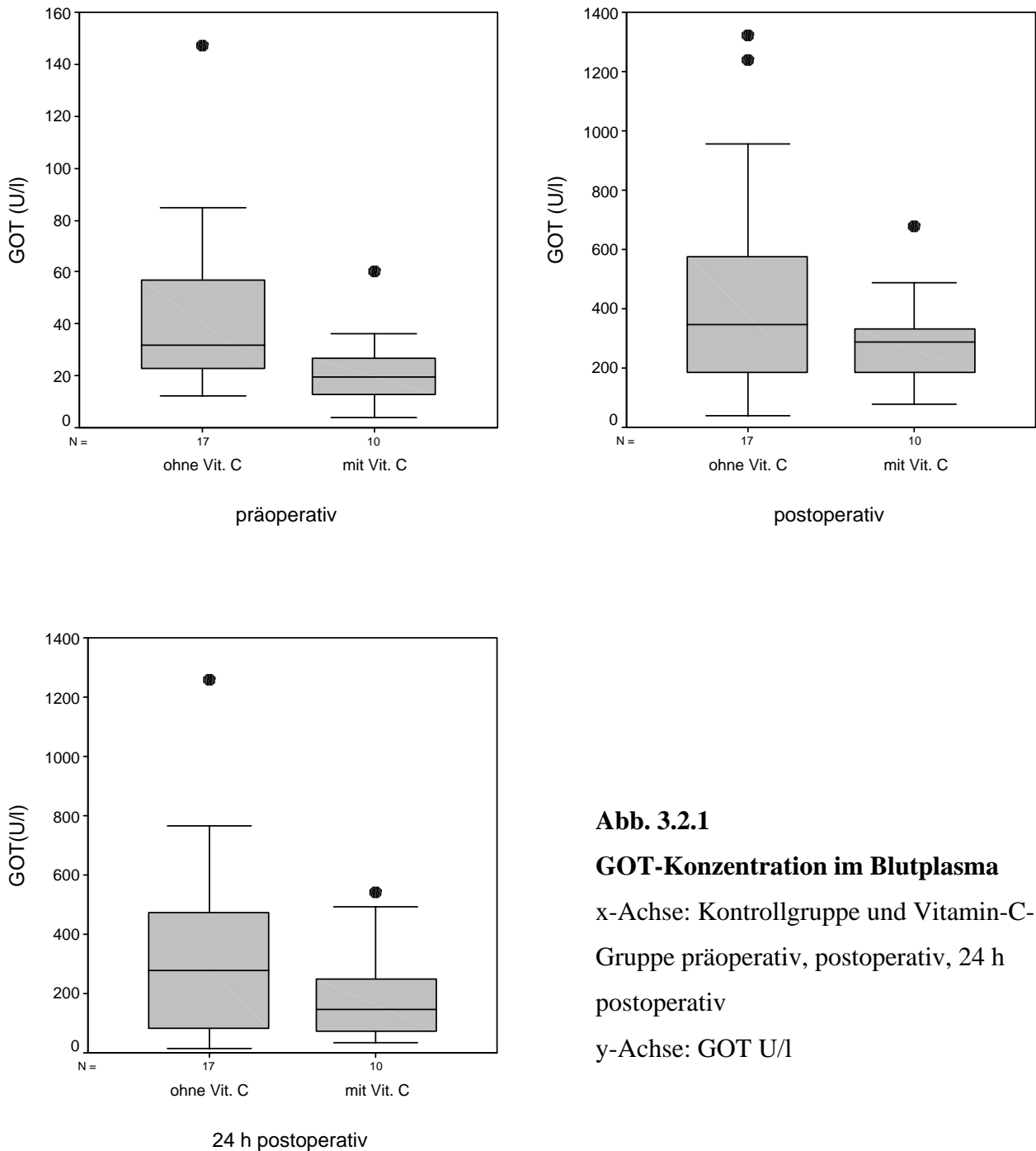


Abb. 3.2.1
GOT-Konzentration im Blutplasma
x-Achse: Kontrollgruppe und Vitamin-C-Gruppe präoperativ, postoperativ, 24 h postoperativ
y-Achse: GOT U/l

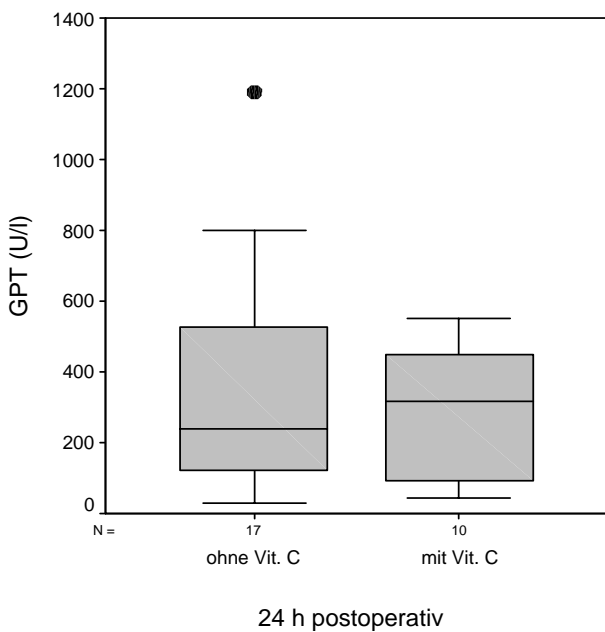
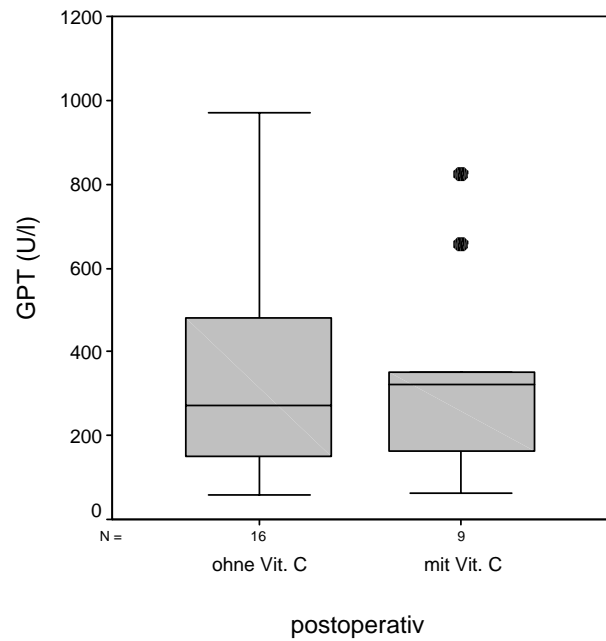
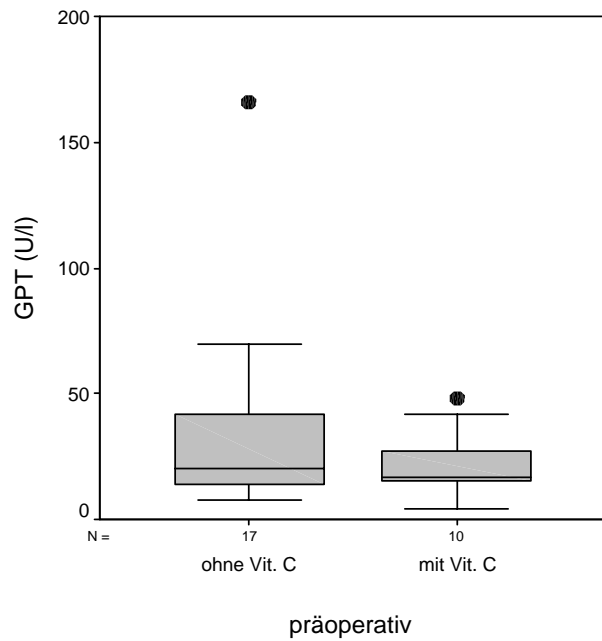


Abb. 3.2.2

GPT-Konzentration im Blutplasma

x-Achse: Kontrollgruppe und Vitamin-C-Gruppe präoperativ, postoperativ, 24 h postoperativ

y-Achse: GPT U/l

Zwischen beiden Gruppen bestehen im GOT- und im GPT-Verlauf keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test, Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$; $p_{\text{GOT}(\text{postop.})} = 0,292$; $p_{\text{GOT}(24 \text{ h postop.})} = 0,366$; $p_{\text{GPT}(\text{postop.})} = 0,821$; $p_{\text{GPT}(24 \text{ h postop.})} = 0,725$).

Bei der Auswertung der GPT-Bestimmung postoperativ ohne Vitamin-C-Gabe konnte eine Patientin nicht berücksichtigt werden, da der GPT-Wert versehentlich nicht bestimmt wurde.

Eine Patientin wies präoperativ im Vergleich extrem hohe Transaminasen auf, was ursächlich durch die Grunderkrankung bedingt sein könnte. Diese Patientin war an einem Budd-Chiari-Syndrom erkrankt. Als Ursache für die außerhalb der Maximalwerte liegenden Transaminasen postoperativ bzw. 24 Stunden postoperativ zweier Patienten ist am ehesten die lange kalte Ischämiezeit des Organs, 10 bzw. 13 Stunden, verantwortlich (Adams, 1992).

3.3 Laborchemische Untersuchungen

Die Ergebnisse der Messwerte der thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen, der Superoxiddismutase, der Myeloperoxidase und des Interleukin-6 werden im Folgenden als Absolutwerte gegenübergestellt. Im Verlauf werden die Abnahmezeitpunkte mit den maximalen Anstiegen der einzelnen Parameter der Vitamin-C-Gruppe und der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Da trotz nicht signifikanter Unterschiede der Vitamin-C-Gruppe und der Kontrollgruppe hinsichtlich der Stammdaten signifikante Unterschiede zwischen den Ausgangswerten bestanden, schien in diesem Fall eine Normierung der Werte sinnvoll.

3.3.1 Thiobarbituratsäurehaltige Substanzen

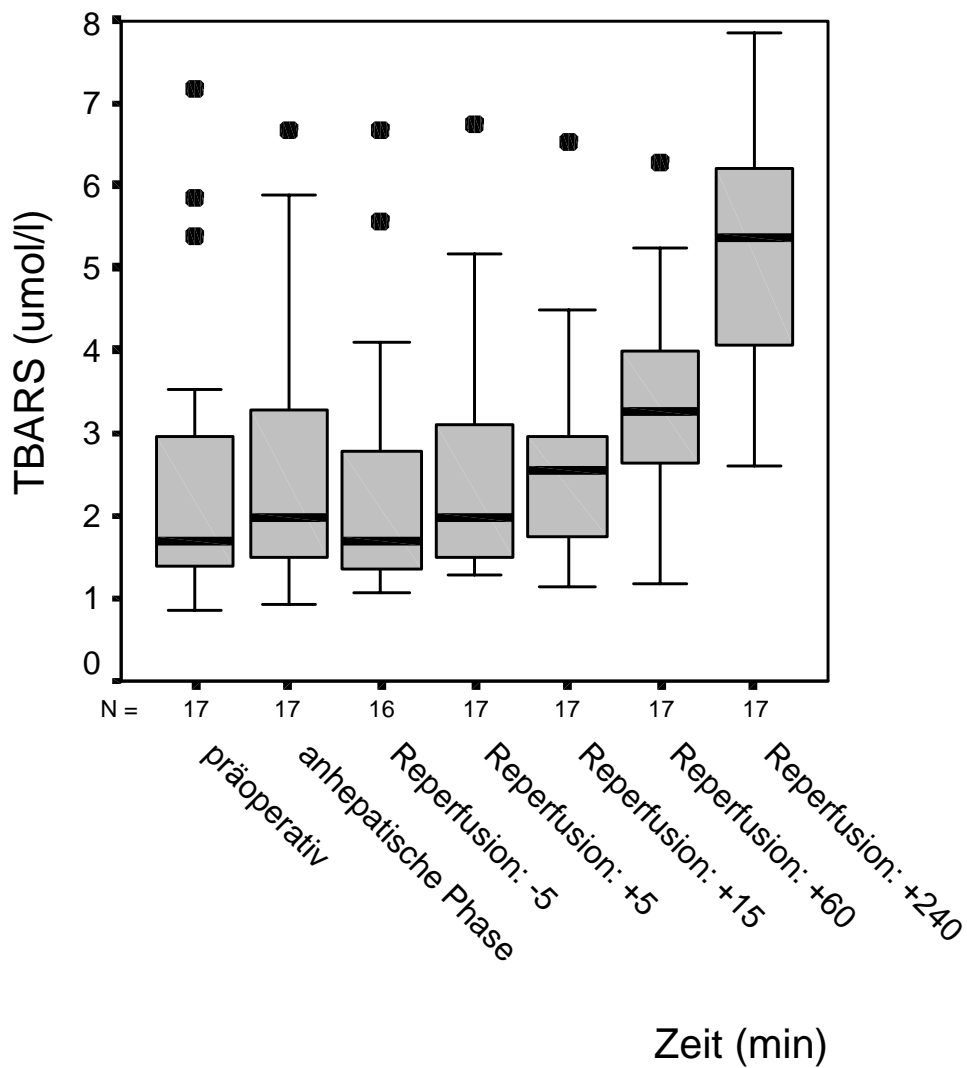


Abb. 3.3.1.1

TBARS im Blutplasma ohne Vitamin C

x-Achse: Abnahmezeitpunkte (min), y-Achse: TBARS ($\mu\text{mol/l}$)

5 Minuten nach Reperfusion konnten nur die Werte von 16 Patienten berücksichtigt werden, da eine Blutabnahme fehlte.

Abweichend von den übrigen Verläufen zeigt in Abb. 3.3.1.1 eine Patientin schon vor Operationsbeginn sehr hohe TBARS-Werte von 7,1 $\mu\text{mol/l}$, die auch im Verlauf nicht weiter anstiegen wie die TBARS-Werte der übrigen Patienten. Diese Patientin wies als Grundkrankheit eine Autoimmunhepatitis auf. Zudem hatte sie ein Sjögren-Syndrom, das vielleicht für die TBARS-Erhöhung verantwortlich sein könnte.

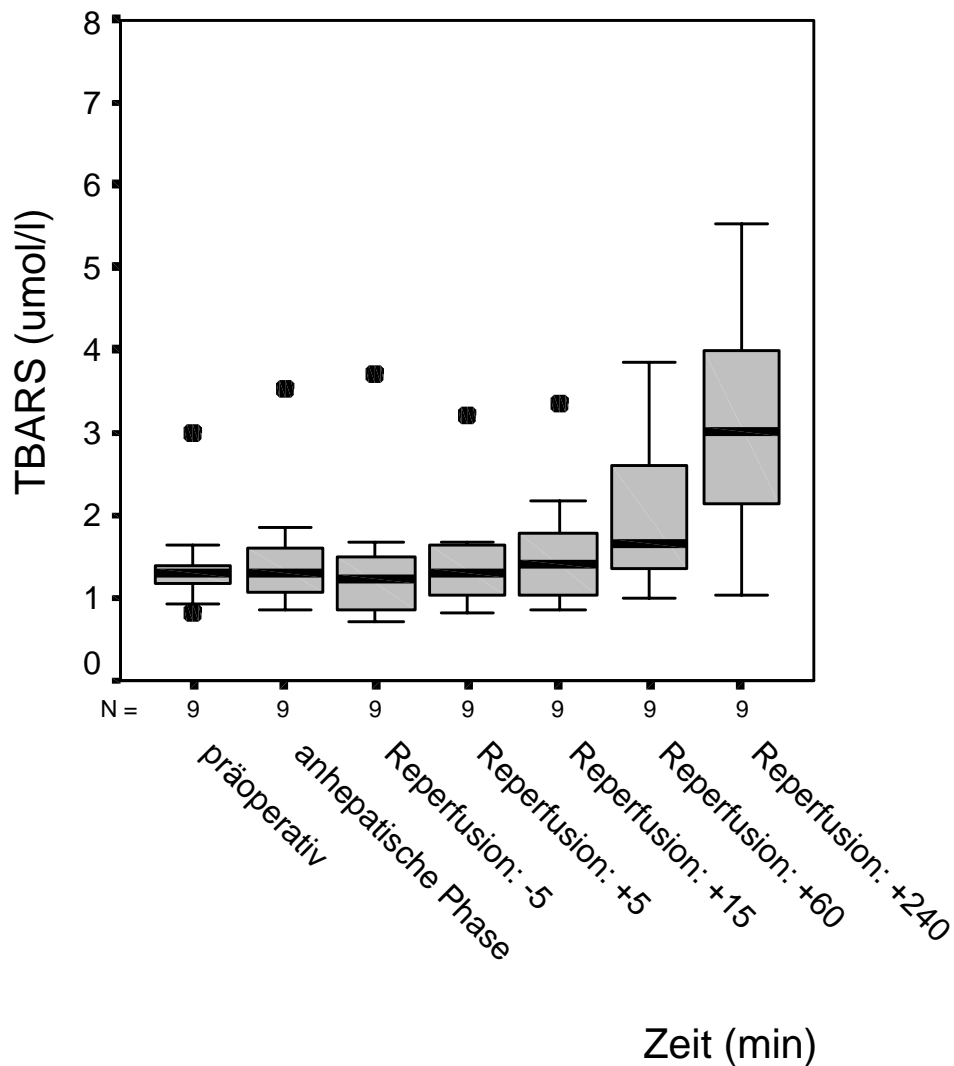


Abb. 3.3.1.2

TBARS im Blutplasma mit Vitamin C

x-Achse: Abnahmezeitpunkte (min), y-Achse: TBARS ($\mu\text{mol/l}$)

Es konnten nur 9 der 10 eingeschlossenen Patienten berücksichtigt werden, da das Plasma eines Patienten versehentlich aufgetaut war.

In Abb. 3.3.1.2 zeigt ein Patient präoperativ im Vergleich zu den übrigen hohe TBARS-Werte. Als Grundkrankheit hatte dieser Patient neben einer bestehenden HCV-Zirrhose noch einen Diabetes mellitus, wodurch die TBARS-Erhöhung erklärt werden könnte (Halliwell, 2000).

In den Verläufen wird sichtbar, dass sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Patientengruppe, die Vitamin C erhielt, die thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen im Vergleich zum Ausgangswert anstiegen. Die maximalen Werte werden in beiden Gruppen 4 Stunden nach Reperfusion erreicht. Präoperativ und 4 Stunden postoperativ sind die Mediane innerhalb der Kontroll- und der Vitamin-C-Gruppe signifikant unterschiedlich.

(Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, $\alpha = 0,05$, asymptotische Signifikanz $p=0$ (ohne Vitamin C), bzw. $p=0,008$ (mit Vitamin C)).

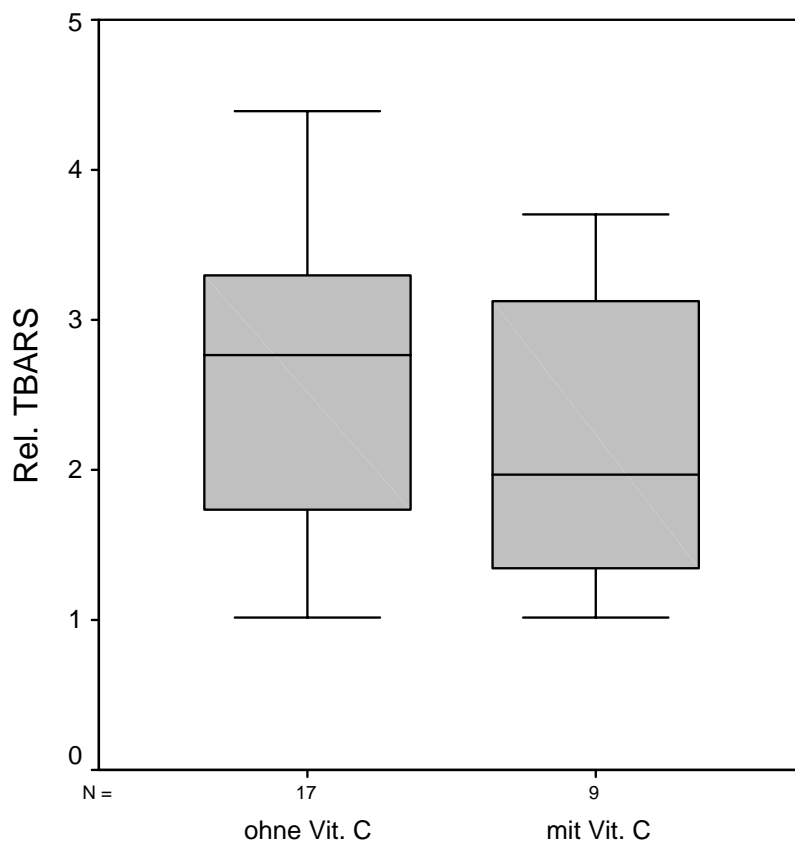


Abb. 3.3.1.3

Vergleich der relativen TBARS - Konzentration im Blutplasma 4 Stunden nach Reperfusion

4 Stunden nach Reperfusion kann kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.
(Mann-Whitney-U-Test; $\alpha = 0,05$; asymptotische Signifikanz $p = 0,500$).

Da die Absolutwerte der beiden Gruppen präoperativ signifikant unterschiedlich sind ($p = 0,033$, Mann-Whitney-U-Test), obwohl eine Gleichheit eigentlich erwünscht wäre, betrachteten wir die Steigerung der TBARS - Werte vom Ausgangswert bis 4 Stunden nach Reperfusion.

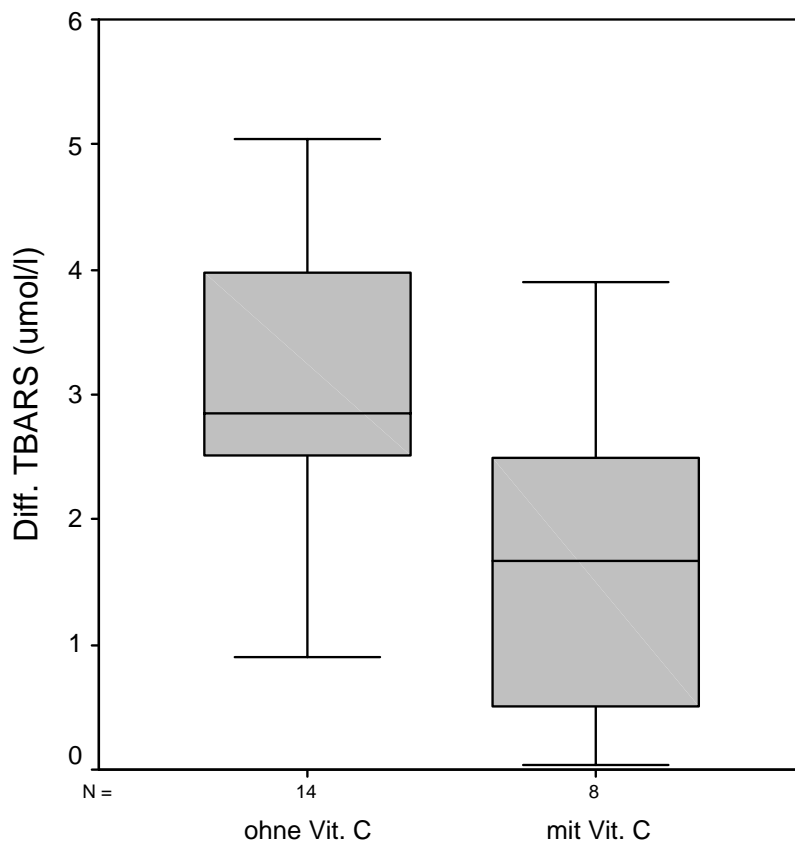


Abb. 3.3.1.4

Anstieg der TBARS ($\mu\text{mol/l}$) im Blutplasma präoperativ und 4 Stunden nach Reperfusion mit und ohne Vitamin-C-Supplementierung

Drei Patienten der Kontrollgruppe und ein Patient der Vitamin-C-Gruppe wurden aufgrund zu großer Abweichungen vom Median für die statistische Auswertung verworfen. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen.

(Mann-Whitney-U-Test; $\alpha = 0,05$; asymptotische Signifikanz $p = 0,020$)

3.3.2 Superoxiddismutase

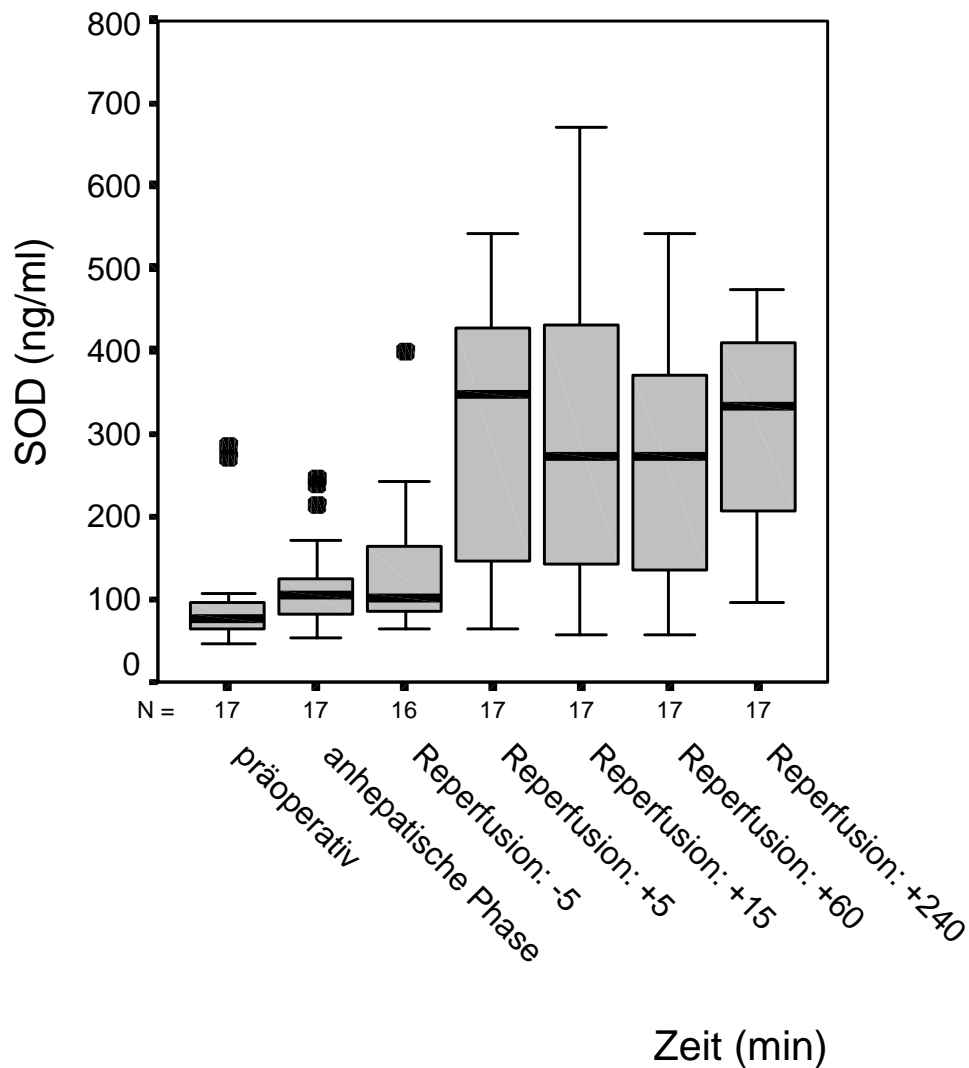


Abb. 3.3.2.1

SOD im Blutplasma ohne Vitamin C

x-Achse: Abnahmezeitpunkte (min), y-Achse: SOD (ng/ml)

In Abb. 3.3.2.1 zeigen zwei Patienten präoperativ und während der anhepatischen Phase außerordentlich hohe SOD-Werte. Ein Patient hatte als Grundkrankheit eine Child-A-Zirrhose bei Hepatitis B und C, hinzu kam als Begleiterkrankung eine terminale Niereninsuffizienz mit Anurie nach Glomerulonephritis, wodurch die Erhöhung der Werte zu erklären wäre (Locatelli, 2003). Der zweite Patient wies keine nennenswerten Begleiterkrankungen auf und hatte eine Child-C-Zirrhose alimentär toxischer Genese, das primär nicht eine präoperative SOD-Erhö-

erklärt. Auffällig bei beiden Patienten ist eine extreme Erhöhung der Interleukin-6-Werte (3.3.4), so dass diese Patienten wegen zu großer Abweichung vom Median bei der Auswertung der Interleukin-6 Konzentration im Plasma nicht berücksichtigt wurden (Abb. 3.3.4.1).

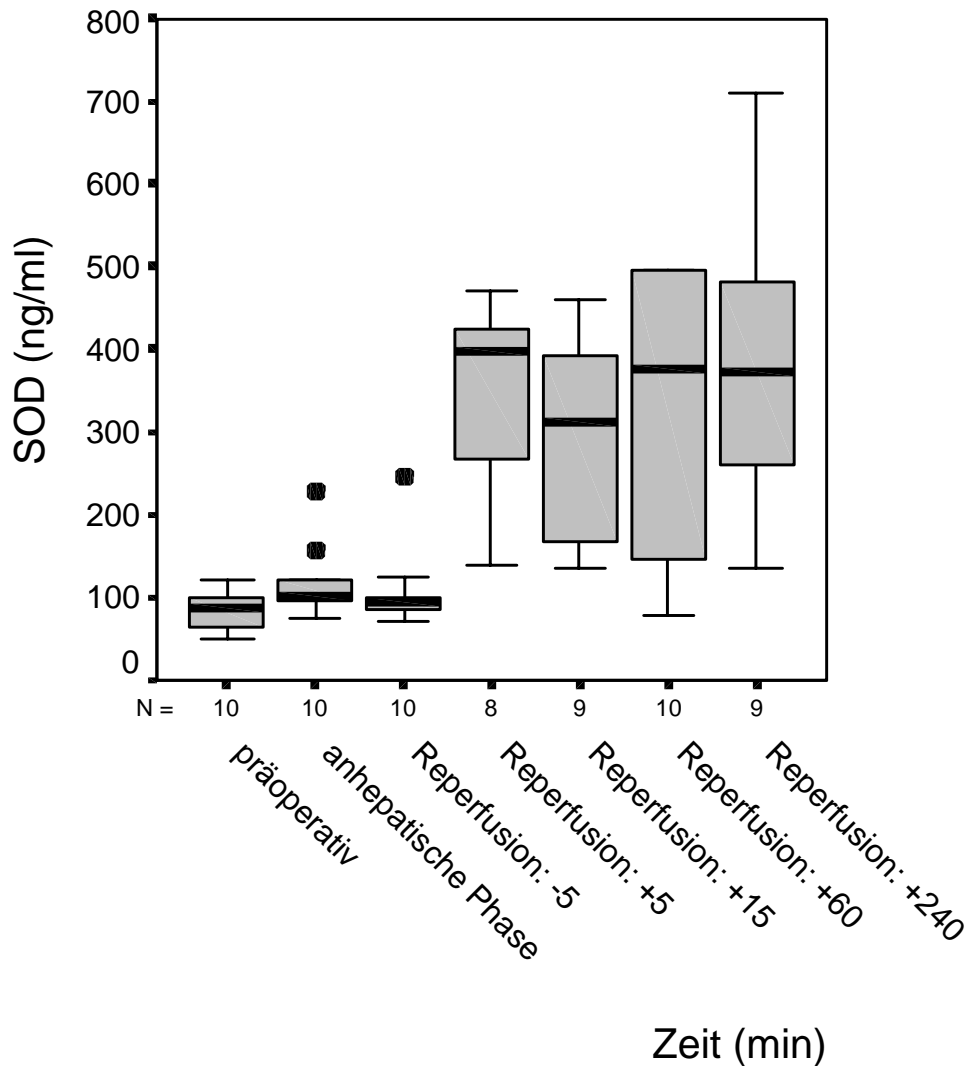


Abb. 3.3.2.2

SOD im Blutplasma mit Vitamin C

x-Achse: Abnahmezeitpunkte (min), y-Achse: SOD (ng/ml)

4 SOD-Werte bei Patienten ohne Vitamin C konnten wegen eines Messfehlers nicht berücksichtigt werden.

In Abb. 3.3.2.2 liegen bei einem Patienten mit Child-B-Zirrhose bei Autoimmunhepatitis und einer Autoimmunhämolyse die SOD-Werte in der anhepatischen Phase sowie 5 Minuten vor Reperfusion außerhalb der maximalen Werte. Erklärend für die SOD-Erhöhung könnte vielleicht die Hämolyse herangezogen werden, da sich in humanen Erythrozyten 0,52 $\mu\text{g}/\text{mg}_{\text{Hämoglobin}}$ Cu/Zn-SOD befindet (Halliwell, 2000). Weitere Laborparameter, die auf eine Hämolyse hindeuten, wie z. B. das freie Hämoglobin, wurden präoperativ nicht bestimmt.

Während der anhepatischen Phase zeigt ein weiterer Patient hohe SOD-Werte. Dieser Patient hatte neben seiner Child-B-Zirrhose bei hepatozellulärem Karzinom ebenfalls einen Diabetes mellitus, wodurch die SOD erhöht sein könnte. Dieser Patient wies jedoch keine erhöhten TBARS-Werte außerhalb der Standardabweichungen auf.

Bei der Betrachtung der einzelnen Verläufe der beiden Gruppen fällt 5 Minuten nach Reperfusion ein sprunghafter Anstieg der SOD-Konzentration auf. Die Mediane der SOD-Konzentration in beiden Gruppen sind präoperativ und 5 Minuten postoperativ signifikant unterschiedlich.

(Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, asymptotische Signifikanz $p = 0,002$ (ohne Vitamin C), $p = 0,012$ (mit Vitamin C); $\alpha = 0,05$).

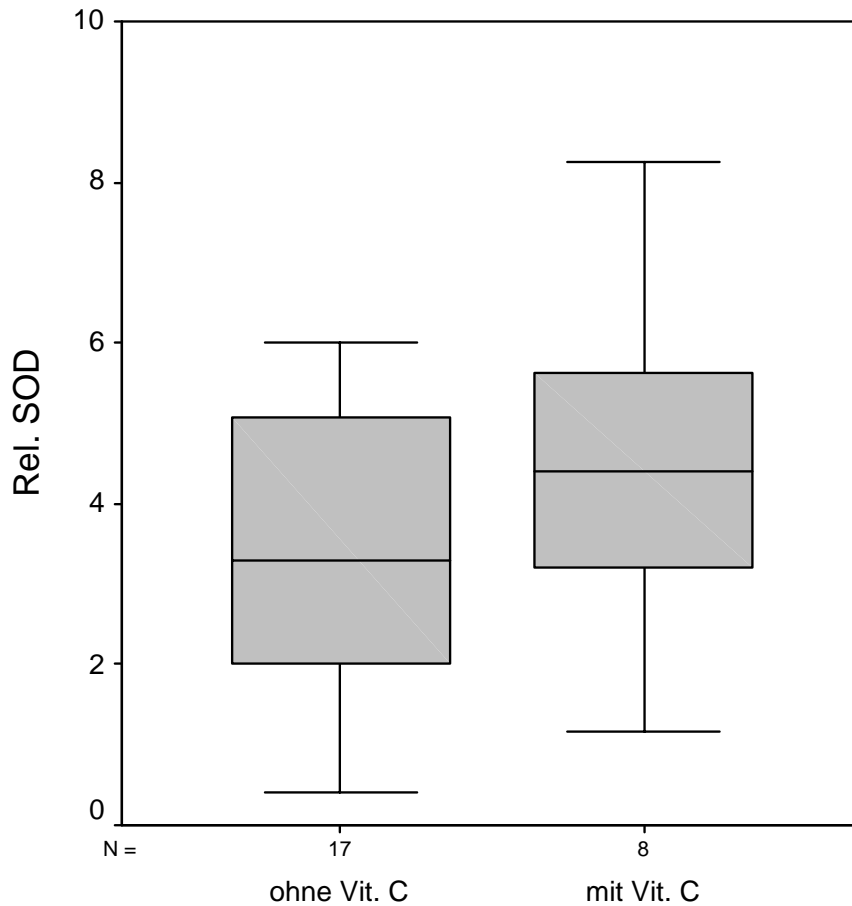


Abb. 3.3.2.3

Vergleich der relativen SOD - Konzentration im Blutplasma 5 Minuten nach Reperfusion

Bei der vergleichenden Darstellung der SOD Konzentration im Blutplasma 5 Minuten nach Reperfusion mit und ohne Vitamin-C-Supplementierung zwischen beiden Gruppen besteht statistisch kein signifikanter Unterschied.

(Mann-Whitney-U-Test, asymptotische Signifikanz $p = 0,268$; $\alpha = 0,05$).

Der p-Wert liegt jedoch sehr niedrig, so dass auch nicht von einer Gleichheit der Werte ausgegangen werden kann. Eine klare Aussage lässt sich anhand der Werte nicht machen.

3.3.3 Myeloperoxidase

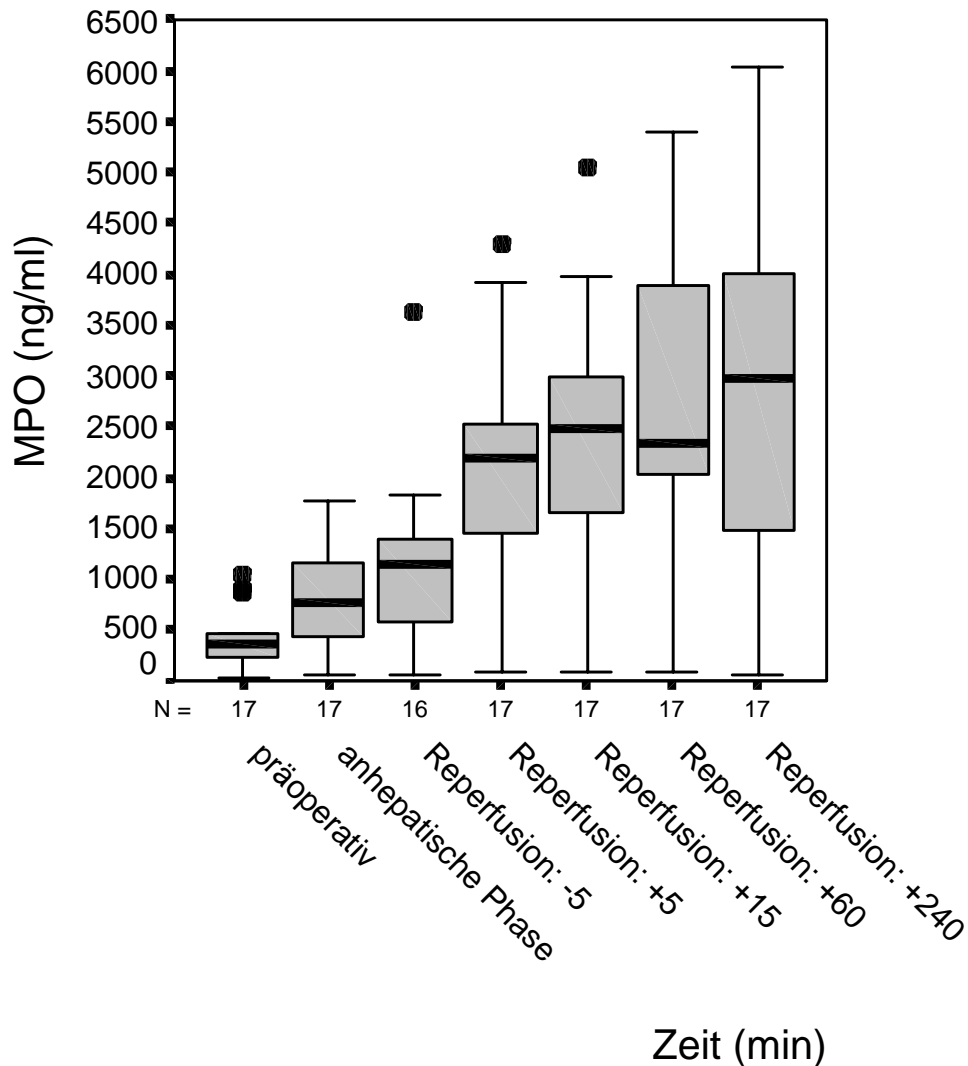


Abb. 3.3.1.1

MPO im Blutplasma ohne Vitamin C

x-Achse: Abnahmezeitpunkte (min), y-Achse: MPO (ng/ml)

5 Minuten nach Reperfusion fehlte wie auch schon bei den übrigen Parametern eine Blutabnahme; somit konnten nur 16 Patienten berücksichtigt werden.

Bei den Patienten mit besonders hohen Ausgangswerten handelte es sich um Patienten mit einer Child-B bzw. Child-C-Zirrhose bei Hepatitis B bzw. C. Diese Patienten wiesen keine besonderen Begleiterkrankungen auf, wodurch ursächlich die hohen präoperativen MPO-Werte zu erklären wären. Bei Patienten mit steilen MPO Anstiegen außerhalb der Maximalwerte gab es intraoperativ keine hinweisenden Erklärungen für die Abweichung.

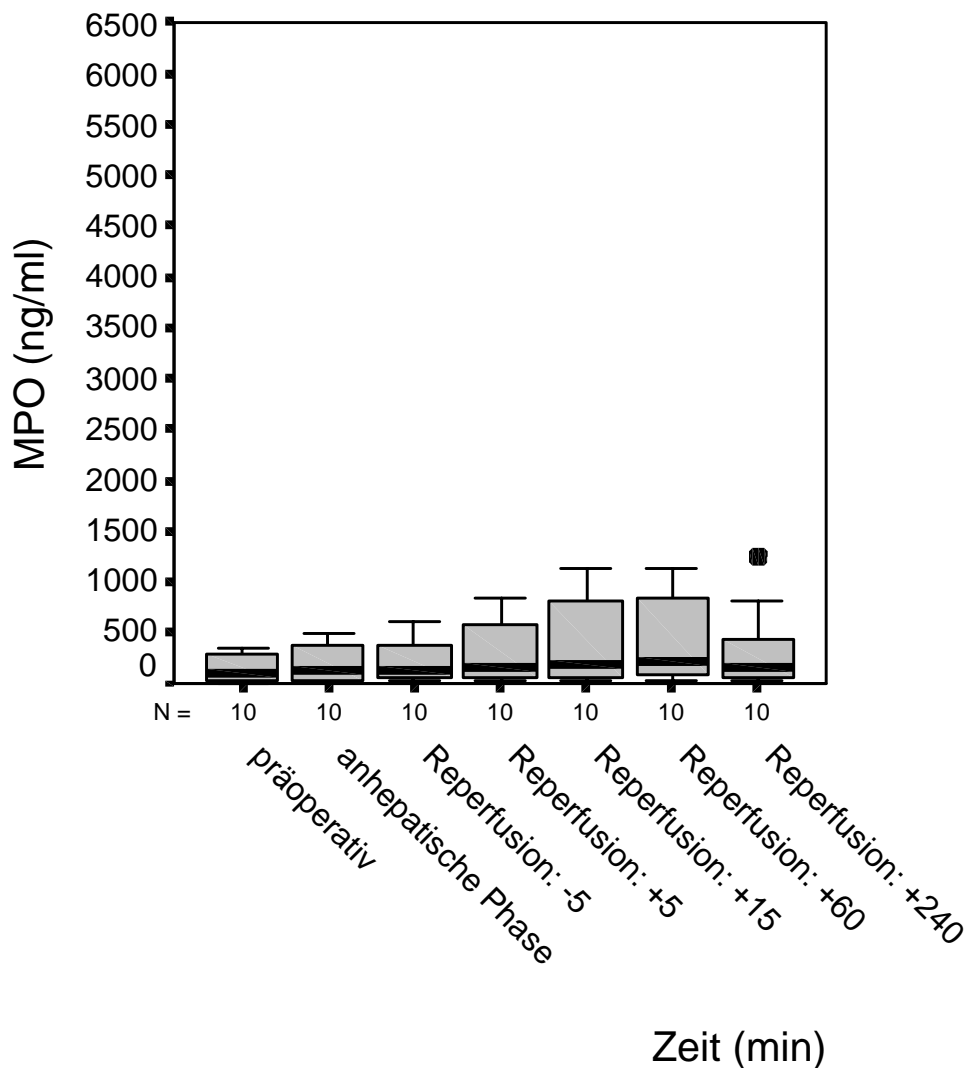


Abb. 3.3.3.2

MPO im Blutplasma mit Vitamin C

x-Achse: Abnahmezeitpunkte (min), y-Achse: MPO (ng/ml)

Ein Patient zeigte im Vergleich zu den übrigen Patienten einen Anstieg der MPO auch 240 Minuten nach Reperfusion. Der Patient erhielt ein Organ mit einer Ischämiezeit von 10,5 Stunden, eine erhöhte Aktivierung der Neutrophilen auch 4 Stunden nach Reperfusion könnte dafür verantwortlich sein.

Betrachtet man die MPO Verläufe beider Gruppen, so sind sie hinsichtlich der Ausgangswerte vergleichbar. Auffällig ist ein deutlich geringerer Anstieg der Werte in der Vitamin-C-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Im Vergleich zu den vorausgehenden Parametern besteht innerhalb einer Gruppe nach Reperfusion ein kontinuierlicher Anstieg. 15 Minuten nach Reperfusion ist jedoch ein ausgeprägter Anstieg der Werte zu beobachten, der als signifikant zu betrachten ist, so dass diese Werte für den relativen Vergleich herangezogen werden. (Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, asymptotische Signifikanz $p = 0,000$ (ohne Vitamin C), $p = 0,007$ (mit Vitamin C), $\alpha = 0,05$).

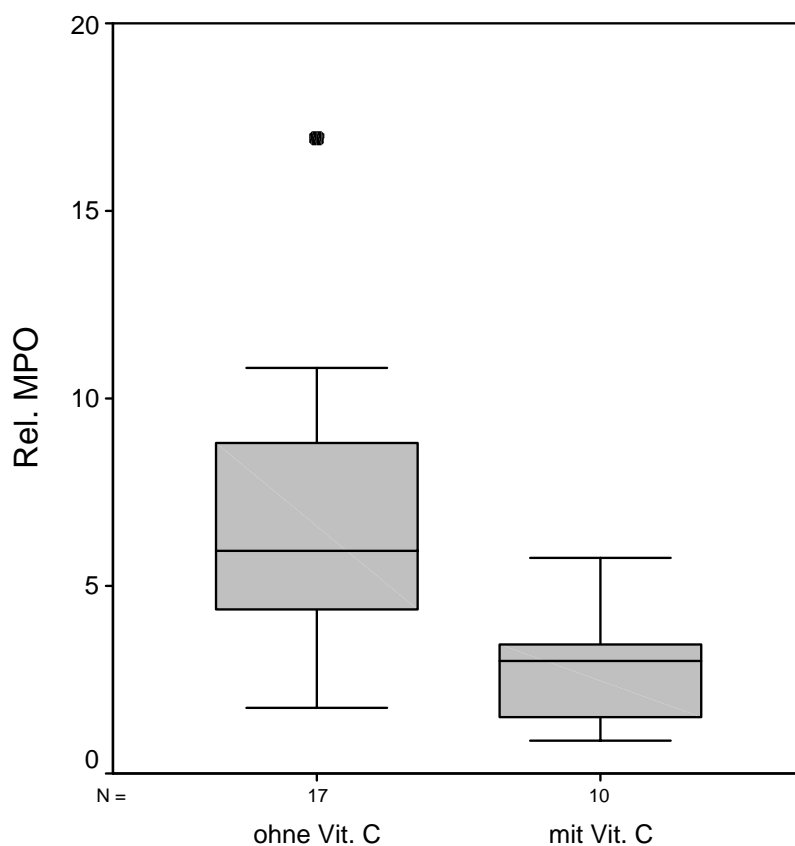


Abb. 3.3.3.3

Vergleich der relativen MPO - Konzentration im Blutplasma 15 Minuten nach Reperfusion

Der Unterschied ist signifikant.

(Mann-Whitney-U-Test, asymptotische Signifikanz $p = 0,003$; $\alpha = 0,05$)

3.3.4 Interleukin-6

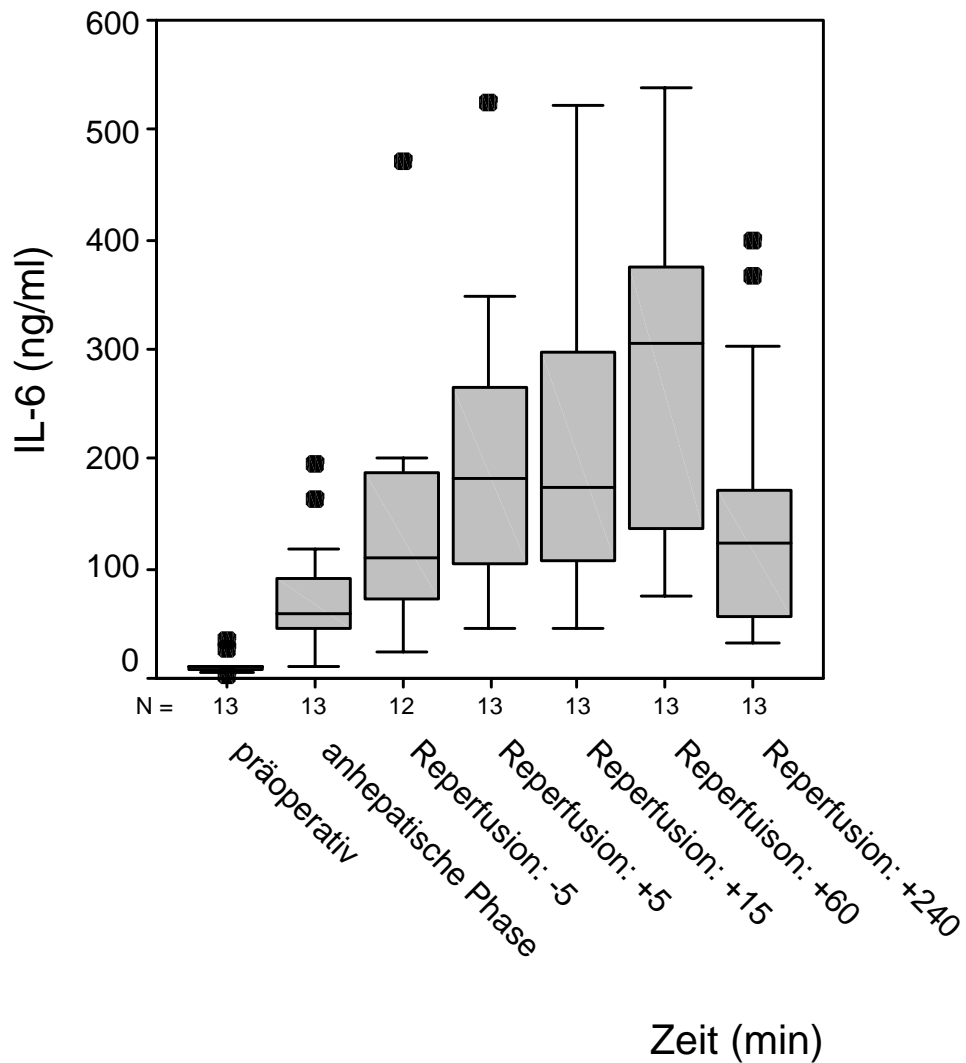


Abb. 3.3.4.1

IL-6 im Blutplasma ohne Vitamin C

x-Achse: Abnahmezeitpunkte (min), y-Achse: IL-6 (ng/ml)

4 Patienten wurden nicht berücksichtigt, da die Werte extreme Abweichungen von den übrigen Messwerten zeigten. 5 Minuten vor Reperfusion fehlte bei einem Patienten ein Messwert, wie auch schon bei den übrigen Parametern.

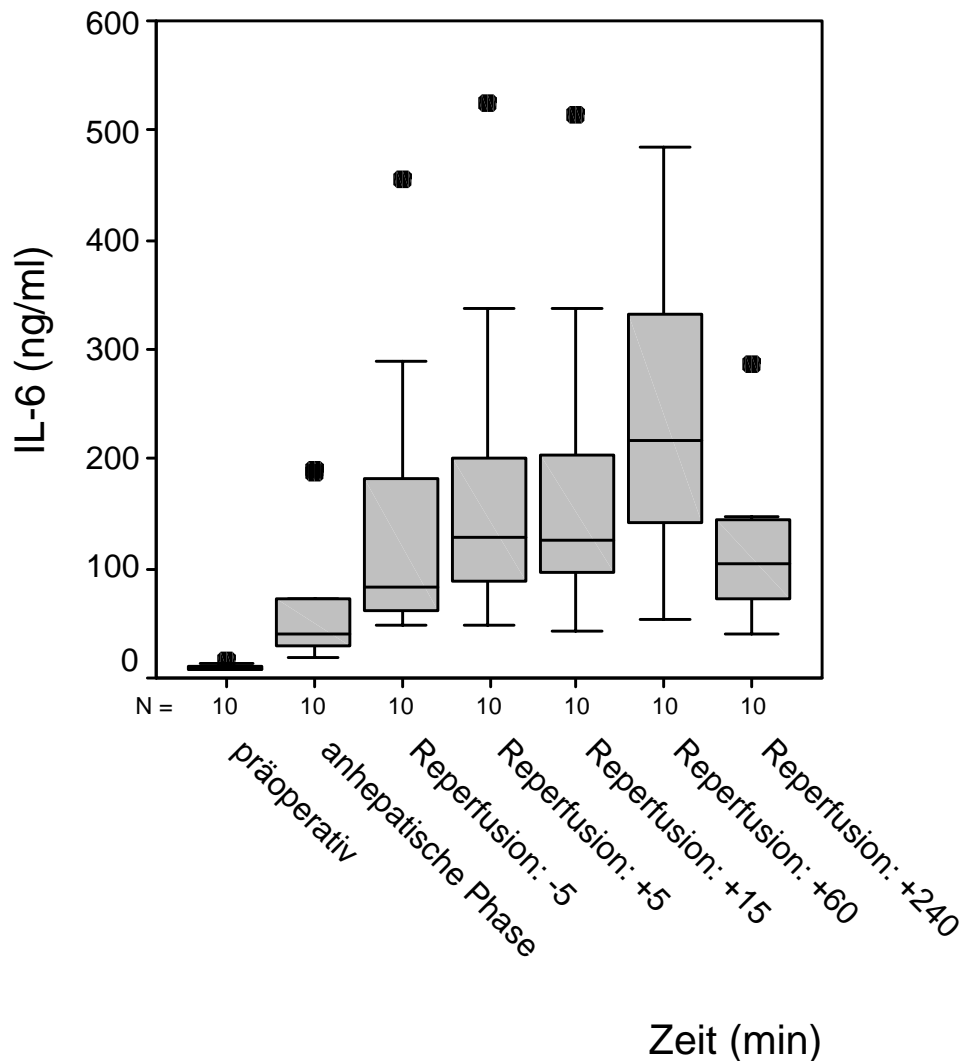


Abb. 3.3.4.2

IL-6 im Blutplasma mit Vitamin C

x-Achse: Abnahmezeitpunkte (min), y-Achse: IL-6 (ng/ml)

Insgesamt weisen die Interleukin-6-Werte in beiden Gruppen eine breite Streuung auf. Der maximale Anstieg der Interleukin-6-Werte wird in beiden Gruppen 1 Stunde nach Reperfusion erreicht. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Medianen der Ausgangswerte und den Medianen 1 Stunde postoperativ in beiden Gruppen.

(Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, asymptotische Signifikanz, $p = 0,001$ (ohne Vitamin C), $p = 0,005$ (mit Vitamin C), $\alpha = 0,05$).

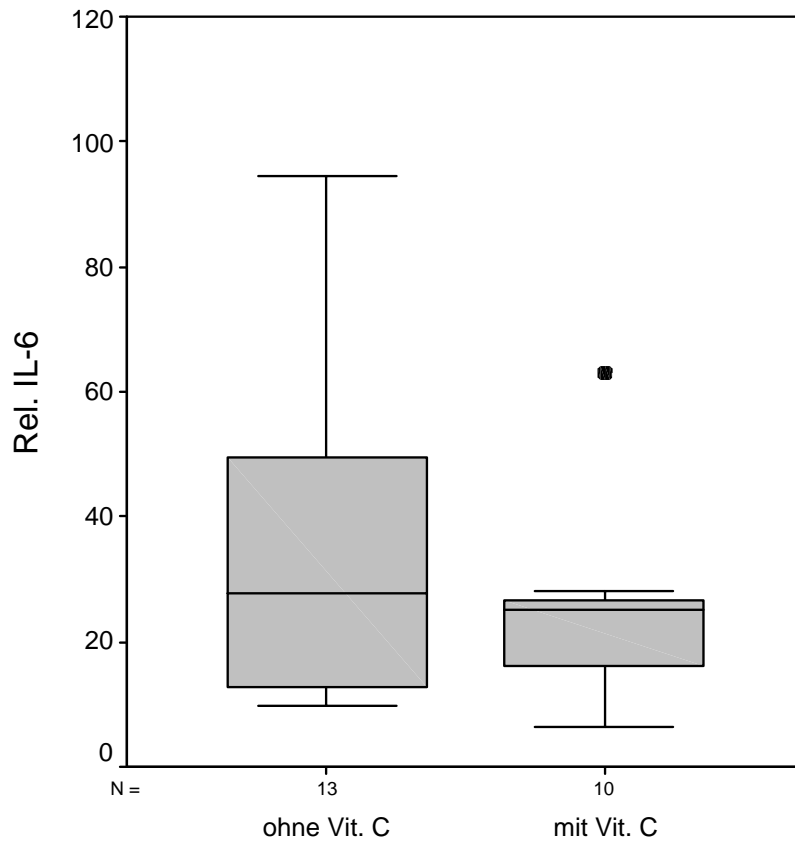


Abb. 3.3.4.3

Vergleich der relativen IL-6 Konzentration im Blutplasma 1 Stunde nach Reperfusion

Beim Vergleich der Mediane der IL-6 Konzentration beider Gruppen präoperativ und 1 Stunde postoperativ zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

(Mann-Whitney-U-Test, asymptotische Signifikanz $p = 0,292$; $\alpha = 0,05$)

Jedoch liegt auch hier wie schon bei dem Vergleich der SOD-Werte im Blutplasma der p-Wert sehr niedrig, so dass auch nicht von einer Gleichheit der Werte ausgegangen werden kann.

3.4 Lineare Regressionsanalyse

Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen den Transaminasen und den Markern des oxidativen Stresses besteht, führten wir eine lineare Regressionsanalyse durch. Für die Berechnung der Korrelation wurden jeweils die Maximalwerte, d. h. die postoperativen Werte der Transaminasen sowie die TBARS-Werte 4 Stunden nach Reperfusion, SOD-Werte 5 Minuten nach Reperfusion, MPO-Werte 15 Minuten nach Reperfusion und IL-6-Werte 1 Stunde nach Reperfusion verwendet. Die Korrelation wird durch den Korrelationskoeffizienten R angegeben, der sowohl positive als auch negative Werte einnehmen kann und dessen Werte folgende Bedeutung haben.

Korrelationskoeffizient	Korrelation
0,0 – 0,2	keine bzw. gering
0,2 – 0,5	schwach bis mäßig
0,5 – 0,8	Korrelation
0,8 – 1,0	hohe bis perfekte

3.4.1 Transaminasen/ Thiobarbituratsäurehaltige Substanzen

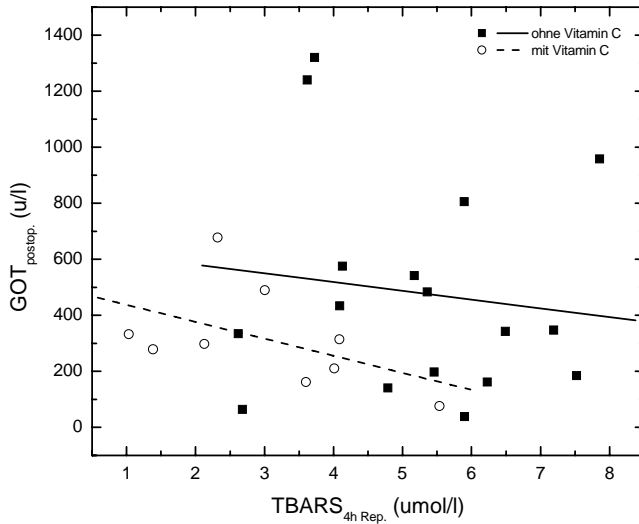


Abb. 3.4.1.1

Lineare Regression GOT/ TBARS

R ohne Vitamin C = -0,1275

R mit Vitamin C = -0,4900

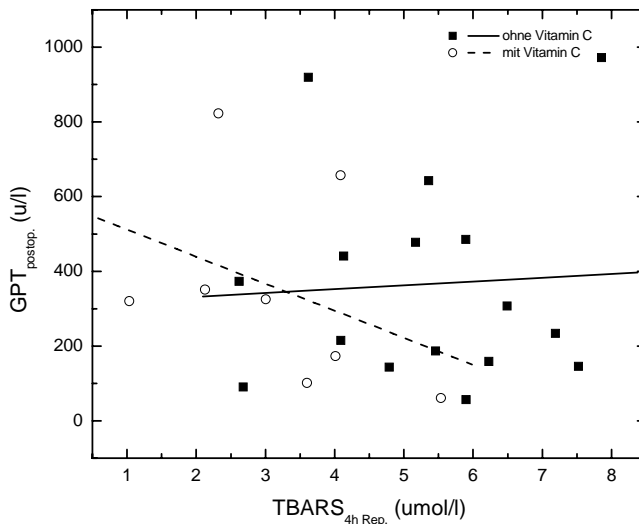


Abb. 3.4.1.2

Lineare Regression GPT/ TBARS

R ohne Vitamin C = 0,0585

R mit Vitamin C = -0,3806

GOT- und GPT-Werte ohne Vitamin-C-Gabe zeigen keine bis geringe Korrelation mit den TBARS, während Werte mit Vitamin C schwach bis mäßig korreliert sind.

3.4.2 Transaminasen/ Superoxiddismutase

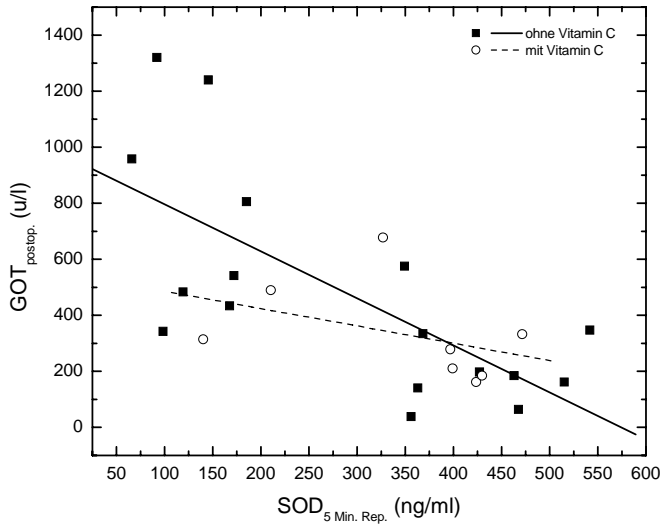


Abb. 3.4.2.1

Lineare Regression GOT/ SOD

$$R \text{ ohne Vitamin C} = -0,7048$$

$$R \text{ mit Vitamin C} = -0,4137$$

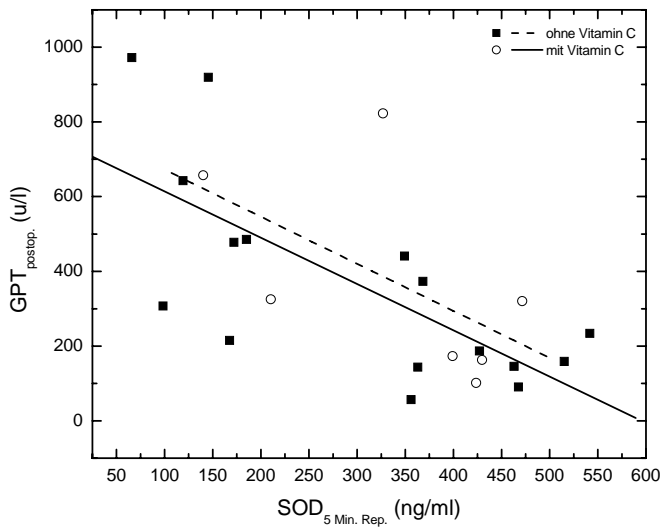


Abb. 3.4.2.2

Lineare Regression GPT/ SOD

$$R \text{ ohne Vitamin C} = -0,7146$$

$$R \text{ mit Vitamin C} = -0,5742$$

SOD-Werte ohne Vitamin C sind mit den Transaminasen korreliert, ebenfalls korreliert sind SOD-Werte mit Vitamin C und GPT-Werte. SOD-Werte mit Vitamin C und GOT-Werte zeigen eine mäßige Korrelation.

3.4.3 Transaminasen/ Myeloperoxidase

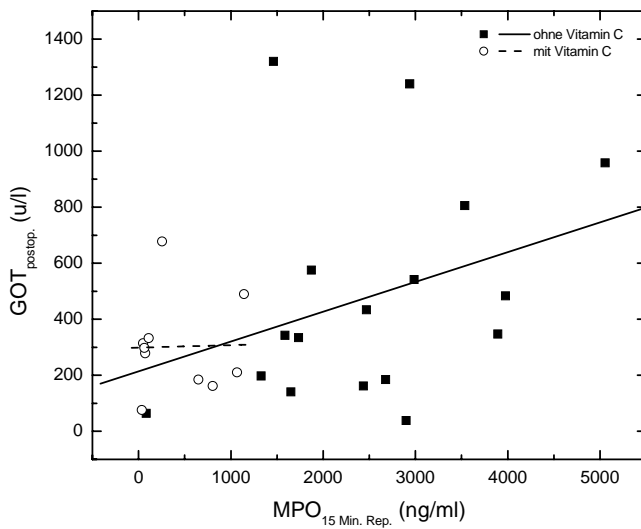


Abb. 3.4.3.1

Lineare Regression GOT/ MPO

R ohne Vitamin C = 0,3274

R mit Vitamin C = 0,0223

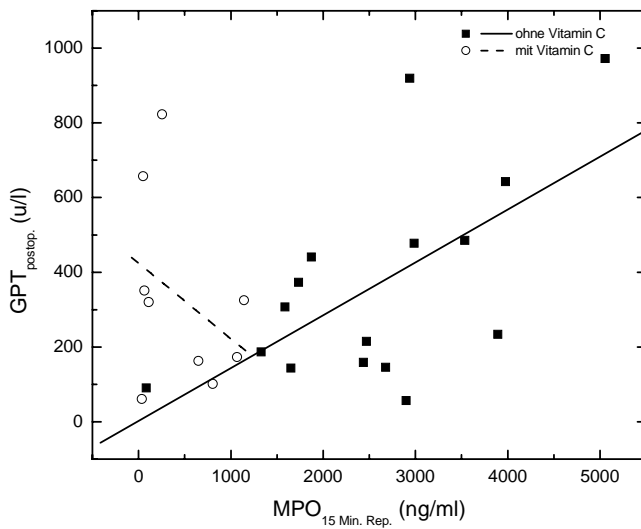


Abb. 3.4.3.2

Lineare Regression GPT/ MPO

R ohne Vitamin C = 0,6137

R mit Vitamin C = -0,3587

Keine Korrelation zeigen MPO-Werte mit Vitamin C und GOT-Werte, während MPO-Werte ohne Vitamin C und GOT-Werte und MPO-Werte mit Vitamin C und GPT-Werte mäßig korreliert sind, eine Korrelation ergibt sich für MPO-Werte ohne Vitamin C und den GPT-Werten.

3.4.4 Transaminasen/ Interleukin-6

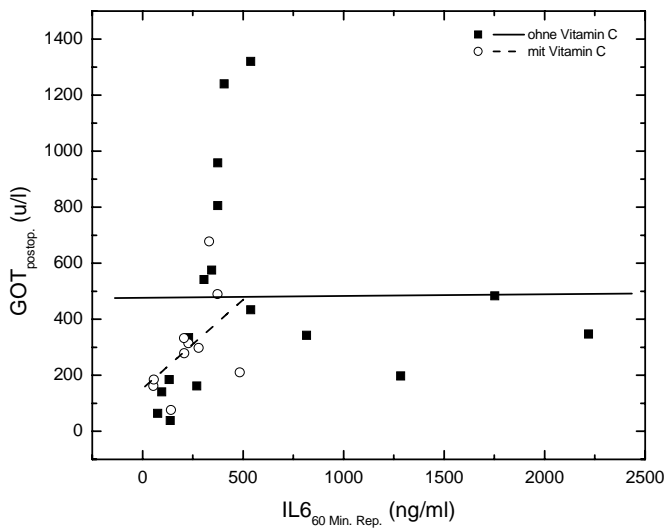


Abb. 3.4.4.1

Lineare Regression GOT/ IL-6

R ohne Vitamin C = 0,0093

R mit Vitamin C = 0,4984

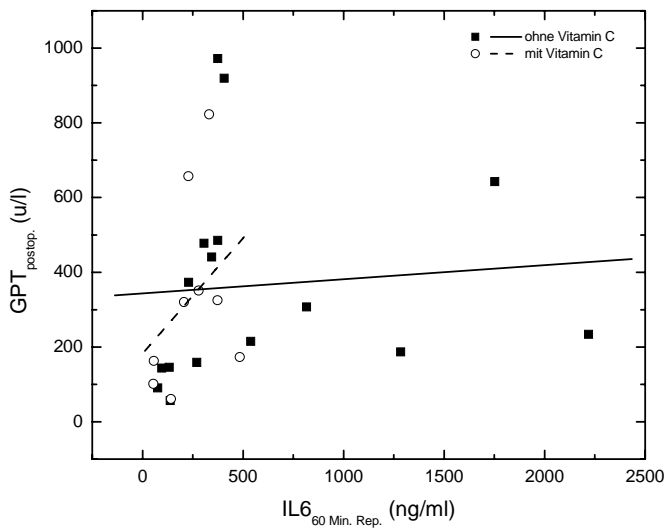


Abb. 3.4.4.2

Lineare Regression GPT/ IL-6

R ohne Vitamin C = 0,0850

R mit Vitamin C = 0,3475

Interleukin-6-Werte ohne Vitamin C sind mit den GOT- und GPT-Werten gar nicht bis gering korreliert, Werte mit Vitamin C zeigen eine schwache bis mäßige Korrelation.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer hochdosierten Vitamin-C-Gabe bei Lebertransplantationen auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden untersucht. Zunächst sollen die methodischen Aspekte der Untersuchung betrachtet und anschließend die Ergebnisse der Untersuchung kritisch diskutiert werden. Abschließend erfolgt ein Ausblick auf die klinische Relevanz.

4.1 Studiendesign

Bei unserer Untersuchung handelt es sich um eine Anwendungsbeobachtung mit historischem Vergleich. Wie bereits unter 2.4 erwähnt, wurden die Patienten, die in der Charité im Zeitraum zwischen 1999 und 2000 lebertransplantiert wurden und die die Einschlusskriterien erfüllten, in zeitlicher Reihenfolge in die Untersuchung eingeschlossen. Eine Randomisierung der Patienten fand also nicht statt, da dieses bei einer kleinen Stichprobengruppe von 30 Patienten nicht zwingend erforderlich ist und bei unserer Untersuchung hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Gruppen keinen Vorteil gebracht hätte.

Bei einer kleinen Stichprobenmenge von insgesamt 30 Patienten ist jedoch das Risiko von nicht vergleichbaren Untersuchungsgruppen gegenüber Untersuchungen größeren Umfanges erhöht. Hinsichtlich der Stammdaten (Alter, Geschlecht, Grundkrankheit, kalte Ischämiezeit, Klemmzeit) unserer Vergleichsgruppen bestehen keine signifikanten Unterschiede, deshalb ist eine Vergleichbarkeit der Messwerte gegeben. Dieses Ergebnis ist jedoch als zufällig zu betrachten. Schon allein die Heterogenität der Grunderkrankungen lässt eine große Streuung der Messwerte erwarten. Diese Streuung lässt sich nur durch eine weitere Differenzierung der Patienten, zum Beispiel nach Krankheitsbildern, ausschalten, welches eine wesentlich größere Stichprobenzahl erfordert hätte.

Um zum Zeitpunkt der Reperfusion hohe Plasmakonzentrationen von Vitamin C zu gewährleisten, wählten wir als Infusionsbeginn unserer Vitamin-C-Infusionslösung den Beginn der anhepatischen Phase. Wir infundierten 7,5 g Vitamin C über einen Zeitraum von 0,5 Stunden. In einer Pilotstudie an gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass nach 0,5 Stunden die maximale Vitamin-C-Konzentration im Plasma von 42 mg/dl erreicht wurde (Normalwert 0,8 – 1,2 mg/dl). Die Plasmahalbwertszeit beträgt bei Infusion von 7,5 g 3,2 Stunden, so dass, eine normale renale Elimination vorausgesetzt, für die Dauer von 6 Stunden mehr als physiologische Vitamin-C-Werte im Plasma nachweisbar sind (Vollbracht, 2001).

4.2 Probengewinnung

Um valide Ergebnisse zu erzielen, müssen methodische Fehler bei der Abnahme und Aufbereitung der Proben vermieden werden. Hierzu gehört die genaue Einhaltung der Abnahmezeitpunkte und eine schnelle Aufbereitung der Proben. Kritisch zu betrachten sind in unserer Untersuchung die Blutabnahmen 5 Minuten vor und nach Reperfusion. Um die genaue Zeit bis zur Reperfusion einschätzen zu können, waren wir auf die Ansage des Operateurs angewiesen. Da die Reperfusion besonders hohe Anforderungen an den Anästhesisten und den Chirurgen stellt, konnte die Ansage nicht immer genau 5 Minuten vor Reperfusion erfolgen. Durch Öffnen der Gefäßklemmen kommt es zu einem plötzlichen Absinken des peripheren Widerstands (Acosta, 1999). Dieses kann eine hämodynamische Instabilität des Patienten zur Folge haben, die durch Katecholamin- und Volumengabe therapiert werden muss. Der Operateur beurteilt die Dichtigkeit der Anastomosen und die Perfusion des neuen Organs. In dieser für den Patienten kritischen Phase war es nicht immer möglich, genau 5 Minuten nach Reperfusion die Blutabnahme durchzuführen und dadurch für einen kurzen Zeitraum die kontinuierliche Blutdruckmessung zu unterbrechen. Für die Interpretation der erhobenen Daten haben diese geringfügigen Abnahmeschwankungen von ± 1 Minute keine Bedeutung, da es sich bei den Ergebnissen um eindeutige Änderungen hinsichtlich der Messparameter handelt. Abgesehen von der Superoxiddismutase, die ihren maximalen Anstieg direkt 5 Minuten nach Reperfusion erreicht, beginnen die übrigen maximalen Anstiege der Messparameter erst 15 Minuten nach Reperfusion.

Die Blutmonovetten wurden sofort nach Abnahme in Eis gekühlt, zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und anschließend bei -80 Grad tiefgefroren.

4.3 Nachweismethoden

4.3.1 Bestimmung der TBARS

Zum Nachweis der thiobarbiturathaltigen Substanzen verwendeten wir den klassischen Nachweis mittels TBA-Test und Fluoreszenzspektroskopie. Erstmals wurde die Farbreaktion von Bernheim (1948) beobachtet, der die Entwicklung eines roten Farbstoffes nach Reaktion von Thiobarbituratsäure und Homogenisaten von Eilecithin auf die Reaktion eines Oxidationsproduktes der ungesättigten Fettsäuren zurückführte.

TBA ist ein Reagenz mit einer hohen Sensitivität zum Nachweis von Lipidperoxiden, die Spezifität ist jedoch gering. Aus diesem Grund müssen störende Substanzen wie Glucose und wasserlösliche Aldehyde durch Zugabe von ortho-Phosphorsäure zunächst entfernt werden. Durch Messung des Endproduktes mittels Fluoreszenzspektroskopie wird die Spezifität gegenüber der Messung mittels UV-Spektroskopie erhöht (Armstrong, 1998).

Der Nachweis von Malondialdehyd wird heute in vielen Fällen mit Hilfe der High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) durchgeführt, da dieses Verfahren eine höhere Sensitivität bzw. Spezifität für Malondialdehyd haben soll. Für eine HPLC-Diagnostik wird jedoch eine spezielle Apparatur und ein spezieller Detektor benötigt, zudem ist es zeitaufwendig, MDA und nicht MDA-Bestandteile herauszuwaschen (Janero, 1990). Bei dem Nachweis von TBARS mittels HPLC handelt es sich also um ein kostspieliges und aufwendig zu etablierendes Verfahren.

Aus diesen Gründen ist der klassische indirekte Nachweis von Malondialdehyd mittels TBA und Fluoreszenzspektroskopie noch immer weit verbreitet und wurde auch von uns angewandt.

4.3.2 ELISA-Bestimmungen

Wir verwendeten für die Bestimmung der Superoxiddismutase, der Myeloperoxidase und des Interleukin-6 ELISA-Kits, da diese eine hohe Spezifität gegenüber den zu bestimmenden Parametern aufweisen. Nicht beurteilbar mittels ELISA ist die biologische Aktivität des Enzyms bzw. des Zytokins, die nur durch den Gebrauch von Funktionsassays geklärt werden kann. Nachteile des Gebrauchs von Funktionsassays sind erstens der wesentlich höhere Aufwand in der Durchführung und zweitens eine geringere Spezifität gegenüber den zu bestimmenden Parametern.

4.4 Einfluss von Vitamin C auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden

4.4.1 Thiobarbituratsäurehaltige Substanzen

Die thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen, insbesondere das Malondialdehyd als Abbauprodukt der Lipidperoxidation, werden in vielen tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen am Menschen als Marker des oxidativen Stresses im Rahmen der Ischämie-/Reperfusionreaktion verwendet. Je nach Nachweismethode haben die ermittelten Werte für Malondialdehyd im

Plasma eine sehr große Streubreite. Pilz *et al.* (2000) ermittelten in einer Zusammenstellung verschiedener Nachweismethoden von MDA im Blutplasma gesunder Probanden eine Streuung der Werte von 0,03-3,42 nmol/ml MDA. Eine Vergleichbarkeit der gemessenen Werte mit Literaturwerten ist somit nur nach genauer Prüfung des gewählten Verfahrens zulässig. Wir verwendeten in unserer Untersuchung den Nachweis mittels Fluoreszenzspektroskopie nach Yagi. Die Mediane der Ausgangswerte der TBARS betragen in der Kontrollgruppe $1,69 \pm 1,86$ $\mu\text{mol/l}$, in der Gruppe mit Vitamin C - Substitution $1,30 \pm 0,64$ $\mu\text{mol/l}$, 4 Stunden postoperativ erreichte die TBARS- Konzentration im Blutplasma ihr Maximum von $5,36 \pm 1,58$ $\mu\text{mol/l}$ in der Kontrollgruppe bzw. $3,0 \pm 1,44$ $\mu\text{mol/l}$ in der Vitamin-C-Gruppe. Unsere ermittelten Ausgangswerte in der Kontroll- und der Vitamin-C-Gruppe liegen insgesamt niedriger als die in der Literatur für dieses Verfahren angegebenen Werte von 3,42 nmol/ml (Yagi,1998), das vielleicht auf eine unterschiedlich lange Lagerung der Proben zurückzuführen ist. Durch die im Rahmen der Reperfusion freigesetzten ROS (Reactive Oxygen Species) kommt es zu einer Zerstörung der Zellmembran durch Initiierung der Lipidperoxidation und somit zu einem Anstieg der TBARS als Endprodukte der Lipidperoxidation. In unserer Untersuchung zeigte sich bei beiden Untersuchungsgruppen ein maximaler Anstieg der TBARS 4 Stunden nach Reperfusion. Ein Anstieg der TBARS konnte in tierexperimentellen Untersuchungen an Ratten (Iwamoto *et al.*, 2002) und auch im Rahmen von humanen Lebertransplantationen (Biasi *et al.*, 1995) beobachtet werden, jedoch wurde der maximale Anstieg erst 24 Stunden (Biasi) bzw. in tierexperimentellen Untersuchungen 10 –14 Stunden nach Reperfusion erreicht. In unserer Untersuchung wurde die letzte TBARS-Bestimmung 4 Stunden nach Reperfusion durchgeführt, so dass nicht auszuschließen ist, dass der maximale Anstieg nicht gemessen wurde.

Gegenteilige Beobachtungen machten Plöchl *et al.* (1999), die den Einfluss des 21-Aminogluocorticoids Tirilizad auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden bei orthotopen Lebertransplantationen untersuchten. Sie konnten auch in der Kontrollgruppe keinen Anstieg der TBARS feststellen. Dafür machten sie bereits extrem hohe TBARS-Ausgangswerte von $6,4 \pm 4,2$ $\mu\text{mol/l}$ in der Behandlungsgruppe mit Tirilazad bzw. $8,7 \pm 6,1$ $\mu\text{mol/l}$ in der Kontrollgruppe verantwortlich. Allerdings wurden diese Werte mittels HPLC bestimmt und sind somit mit unseren Messwerten nur eingeschränkt vergleichbar.

Auch in unserer Untersuchung wies eine Patientin in der Kontrollgruppe bereits präoperativ einen TBARS-Wert von $7,1$ $\mu\text{mol/l}$ (Median $1,69$ $\mu\text{mol/l}$) auf und zeigte im Operationsverlauf im Gegensatz zu den übrigen Patienten keinen weiteren Anstieg der TBARS. Diese Patientin wies eine Child-B-Zirrhose bei einer Autoimmunhepatitis mit cholestatischer Verlaufsform sowie ein Sjögren-Syndrom auf. Neben einer Keratokonjunktivitis sicca ist für das Sjögren-

Syndrom auch eine Polyarthritits charakteristisch, wodurch die TBARS-Erhöpfung präoperativ erklärt werden könnte (Halliwell, 2000, Öztürk, 1999). Im Vergleich zu gesunden Patienten haben diese Patienten niedrige Serumspiegel von Ascorbinsäure, die im Gegensatz zu gesunden Patienten nicht zu 15%, sondern zu 80% als Dehydroascorbinsäure vorliegt und somit keine antioxidative Kapazität besitzt (Lunec, 1985). Auch dieses könnte für die präoperativ erhöhten Marker der Lipidperoxidation verantwortlich sein.

Auffällig an unseren Untersuchungsergebnissen ist ein signifikanter Unterschied der Mediane der Ausgangswerte, obwohl die beiden Gruppen sich nicht signifikant unterschieden. Zu erklären ist dieses einmal durch die große Streuung der Messwerte in der Kontrollgruppe, zum anderen kann der Unterschied auch durch die unterschiedliche Genese der Grundkrankheit erklärt werden. Im Gegensatz zu Patienten mit einer akuten Hepatitis weisen Patienten mit einer fulminanten Hepatitis doppelt so hohe Lipidperoxidspiegel auf (Yagi, 1987). Aber auch Begleiterkrankungen wie ein Diabetes mellitus, ein Asthma, ein vorbestehender Nikotinabusus sowie große körperliche Anstrengung vor der Transplantation können ursächlich für eine präoperative Erhöhung der TBARS sein (De Zwart *et al.*, 1998).

Nach intravenöser Gabe von 7,5 g Vitamin C ergab sich 4 Stunden postoperativ kein signifikanter Unterschied zwischen den TBARS-Konzentrationen im Blutplasma beider Gruppen. Durch die im Rahmen der Ischämie/Reperfusion gebildeten freien Radikale kommt es zu einem Angriff auf die Lipidmembranen, der sich in unserer Messung in beiden Gruppen in einem Anstieg der TBARS zeigte. Vitamin C als starkes Antioxidans (Zeng *et al.*, 1991) besitzt die Fähigkeit, Superoxidradikale, Hydroxylradikale (Padh, 1990) und Singulett-Sauerstoff (Ozaki *et al.*, 1995) abzufangen, indem es in Dehydroascorbinsäure umgewandelt wird, so dass eigentlich ein niedriger Gehalt an TBARS in der Vitamin-C-Gruppe zu erwarten wäre. Bei signifikanten Unterschieden in den Absolutwerten der Ausgangswerte der beiden Gruppen betrachteten wir in diesem Fall die Steigerung der TBARS präoperativ und 4 Stunden postoperativ, die in der mit Vitamin C supplementierten Gruppe signifikant geringer ist ($p=0,020$). Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass durch Vitamin C die Lipidperoxidation vermindert wird, eine eindeutige und klärende Aussage kann jedoch anhand der kleinen Stichprobenmenge nicht gemacht werden.

4.4.2 Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase ist ein Enzym, welches spezifisch die Umwandlung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid katalysiert und somit als direkter Parameter für die Bildung von Superoxidanionen im Rahmen der Ischämie/Reperfusion angesehen werden kann. Man unterscheidet eine Kupfer/Zink-abhängige-SOD (Cu/Zn-SOD), welche als Dimer im Zytoplasma lokalisiert ist, ein Isomer der Cu/Zn-SOD, die extrazelluläre-SOD (EC-SOD) sowie eine Mangan-abhängige-SOD (Mn-SOD), die sich als Tetramer überwiegend in der Mitochondrienmatrix befindet. Wir bestimmten im Rahmen unserer Untersuchung die Cu/Zn-SOD, da sie erstens zytoplasmatisch lokalisiert ist und zweitens die Aktivität der Cu/Zn-SOD im Vergleich zur Mn-SOD in der Leber 90 Prozent beträgt, was durch Untersuchungen an Rattenlebern nachgewiesen wurde. Neben dem Gehirn und den Testes ist beim Menschen die Leber der Ort mit der höchsten Konzentration an Cu/Zn-SOD (Heffner *et al.*, 1989). Bei bestehendem Kupfermangel verschiebt sich die Aktivität zugunsten der Mn-SOD, im Rahmen einer Leberzirrhose ist jedoch nicht von einem Kupfermangel auszugehen.

Cu^{2+} wird im Rahmen der katalytischen Funktion der Cu/Zn-SOD durch das Superoxidanion O_2^- zu Cu^{1+} reduziert und daraufhin durch ein weiteres Superoxidanion wiederum zu Cu^{2+} oxidiert, während Zink die Proteinstruktur stabilisiert (Halliwell, 1999).

In unserer Untersuchung zeigte sich sowohl mit als auch ohne Vitamin-C-Supplementierung ein signifikanter Anstieg der SOD-Konzentration im Blutplasma beider Gruppen 5 Minuten nach Reperfusion. In der Kontrollgruppe lag der Median der Ausgangswerte bei $69,62 \text{ ng/ml} \pm 77,93$ in der Vitamin-C-Gruppe bei $86,92 \text{ ng/ml} \pm 23,25$, 5 Minuten nach Reperfusion lag der Median der Kontrollgruppe bei $349,16 \text{ ng/ml} \pm 163,88$ und in der Vitamin-C-Gruppe bei $398,02 \text{ ng/ml} \pm 116,63$.

Im relativen Vergleich der Superoxiddismutase im Blutplasma 5 Minuten nach Reperfusion konnten wir jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen nachweisen.

Falls Vitamin C Superoxidradikale direkt abfängt, wäre in der substituierten Gruppe eine geringere SOD-Konzentration zu erwarten. Der Median der substituierten Gruppe liegt jedoch höher als der Median der Kontrollgruppe. Fraglich ist, ob dieses ein Hinweis auf den prooxidativen Effekt von Vitamin C durch Induktion der Haber-Weiss-Reaktion sein könnte.

Hinweise auf einen prooxidativen Effekt von Vitamin C mit nachteiliger Auswirkung auf die Leberfunktion konnten Seo *et al.* (2002) und Paolini *et al.* (1999) in ihren Untersuchungen an Ratten zeigen.

Seo *et al.* (2002) verabreichten Ratten vor Klemmen der V. portae und der A. hepatica Dosen zwischen 30 und 1000 mg/kg/KG Ascorbinsäure intravenös. Sie stellten fest, dass nach hochdosierter Gabe von 1000 mg/kg/KG Ascorbinsäure im Vergleich zur Gabe von 30 – 300 mg/kg/KG Ascorbinsäure die Transaminasen 1 Stunde bzw. 5 Stunden nach Reperfusion bzw. oxidative Stressmarker wie MDA deutlich höher lagen. Die hepatobiliäre Funktion der Rattenlebern nach hochdosierter Vitamin C Gabe war deutlich schlechter als in der Kontrollgruppe, was einen prooxidativen Effekt von Vitamin C vermuten läßt.

Bei einer diätätischen Substitution von 500 mg/kg /KG p.o. konnten Paolini *et al.*(1999) mittels EPR (Electron-Paramagnetic-Resonance)-Spektroskopie eine erhöhte Superoxidionenproduktion nachweisen,dies deutet ebenfalls auf einen prooxidativen Effekt hin.

In unserer Untersuchung erhielt jeder Patient 7,5g Vitamin C per infusionem unabhängig vom Körpergewicht, so dass die applizierten Dosen zwischen 83-150 mg/kg/KG lagen, also weit unterhalb der von Seo *et al.* verabreichten Höchstdosen. In Anbetracht der Tatsache, dass die von uns bestimmten anderen oxidativen Stressmarker wie Malondialdehyd und Myeloperoxidase nach Gabe von 83-150 mg/kg/KG Ascorbinsäure eher auf einen positiven Effekt von Vitamin C auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden hindeuten, wäre es sinnvoll, die Untersuchung nochmals mit definierten körperrgewichtadaptierten Konzentrationen an Vitamin C zu wiederholen, um gegebenenfalls einen dosisabhängigen prooxidativen Effekt beim Menschen beurteilen zu können.

4.4.3 Myeloperoxidase

Das Enzym Myeloperoxidase findet man vor allem in den Monozyten und in den Neutrophilen. Es wird in den azurophilen Granula der polymorphkernigen Zellen (polymorphonuclear cells = PMNs) gespeichert und während der Phagozytose freigesetzt. Die Bestimmung der Plasmamyeloperoxidase ist also als ein Maß für die Aktivierung der Neutrophilen im Verlauf der Lebertransplantation anzusehen. Die besondere Bedeutung der Myeloperoxidase als Haem-Enzym für die Ischämie/Reperfusion liegt darin, die durch den „oxidativen burst“ freigesetzten Superoxide und Hydrogenperoxide in hypochlorige Säure oder andere reaktive Oxidantien umzuwandeln (Winterbourn *et al.*, 2000).

Untersuchungen an Rattenlebern zeigten, dass es im Verlauf der Lebertransplantation sowie infolge der Transplantation zu einer Akkumulation von Neutrophilen im hepatischen Gefäßsystem kommt (Teramoto *et al.*, 1993). Im Rahmen der Ischämie werden besonders die

Endothelzellen, während der Reperfusionphase besonders die Kupfferzellen geschädigt. Dieses führt zu einer kontinuierlichen Aktivierung von Neutrophilen (Bulkley, 1994; Jaeschke *et al.*, 1991).

Unsere Untersuchungsergebnisse zeigten 15 Minuten nach Reperfusion einen Anstieg der Myeloperoxidase im Plasma. Dieser Anstieg korreliert mit der Freisetzung von ROS im Rahmen der Reperfusion.

Die intraoperative Gabe von Vitamin C scheint die Aktivierung der PMNs während der Reperfusion vollständig zu verhindern oder zu verzögern, da die Plasmamyeloperoxidasekonzentration in der Vitamin-C-Gruppe signifikant geringer ist als in der Kontrollgruppe.

Biasi *et al.* (2002) konnten ähnliche Beobachtungen in einer Pilotstudie nach Gabe einer Antioxidantienlösung (Omnibionta) machen, die jedoch nur 500 mg Vitamin C erhielt. Auch in dieser Untersuchung zeigten sich niedrigere Myeloperoxidasespiegel im Plasma nach Antioxidantiengabe. Die Unterschiede waren jedoch nicht so ausgeprägt wie in unserer Untersuchung.

Um den Einfluss von Vitamin C im Rahmen der Ischämie/Reperfusion auf die Neutrophilen noch zu erhärten, wäre es sinnvoll, in weiteren Untersuchungen das ebenfalls von aktivierten Neutrophilen ausgeschüttete proteolytische Enzym Elastase zu bestimmen (Bzeizi, K. *et al.*, 1996). Die durch Myeloperoxidase gebildete hypochlorige Säure (HOCl) führt zu einer Inaktivierung von α_1 -Antiproteinase, so dass proteolytische Enzyme wie die Elastase vermehrt ausgeschüttet werden (Halliwell 2000).

4.4.4 Interleukin-6

Durch die im Rahmen der Ischämie/Reperfusion freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies kommt es durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors „Nuclear Factor κ B“ (NF- κ B) in den Makrophagen zu der Produktion multipler Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 und Interleukin-6 (Bauer *et al.*, 1998).

Interleukin-6 hat sowohl proinflammatorische wie auch antiinflammatorische Eigenschaften. Es wirkt einerseits synergistisch mit dem TNF- α und induziert die Akutphasereaktion, andererseits kann es während der Reperfusionphase die mRNA des TNF- α herunterregulieren und somit antiinflammatorisch wirken (Jaeschke *et al.*, 2002).

Wir konnten in unserer Untersuchung einen kontinuierlichen Anstieg des Interleukin-6-Spiegels im Blutplasma bis 1 Stunde nach Reperfusion in beiden Untersuchungsgruppen feststellen, 4 Stunden nach Reperfusion waren die Werte rückläufig.

Der Anstieg von Interleukin-6 nach Operationsbeginn ist am ehesten auf das Operationstrauma selbst zurückzuführen, wodurch die zelluläre und die unspezifische Immunantwort stimuliert wird (Shenkin *et al.*, 1989). Kleinschmidt *et al.* (1998) hemmten im Rahmen von koronarchirurgischen Bypassoperationen mit extrakorpulärer Zirkulation die TNF- α -, die Interleukin-6-mRNA- und die Proteinbildung am Ende der extrakorporalen Zirkulation und konnten ebenfalls geringe Mengen an Interleukin-6 im Plasma nachweisen.

Der maximale Anstieg zeigte sich in beiden Gruppen 1 Stunde nach Reperfusion. In der Kontrollgruppe ohne Vitamin C stiegen die Medianwerte von $10,1 \pm 9,20$ ng/ml auf einen Maximalwert von $305,55 \pm 155,23$ ng/ml an, in der Gruppe mit Vitamin-C-Supplementierung stiegen die Medianwerte von $8,75 \pm 2,64$ ng/ml präoperativ auf $217,75 \pm 136,39$ ng/ml 1 Stunde postoperativ an. 4 Stunden nach Reperfusion sind die Interleukin-6-Spiegel im Plasma rückläufig auf Medianwerte von $123,98$ ng/ml in der Kontrollgruppe ohne Vitamin C bzw. $101,73$ ng/ml in der Gruppe mit Vitamin-C-Substitution.

Ein Anstieg des Interleukin-6-Spiegels im Plasma nach Reperfusion konnte bereits in anderen Arbeiten bei orthotopen Lebertransplantationen gezeigt werden (Tange *et al.*, 2001; Kubala *et al.*, 2001). In der Arbeit von Kubala *et al.* wurde der maximale Anstieg des Interleukin-6-Spiegels im Blutplasma bereits 30 Minuten nach Reperfusion erreicht, Tange *et al.* beobachteten maximale Interleukin-6-Werte im Plasma 90 Minuten nach Reperfusion, die jedoch im Gegensatz zu unseren Werten nicht im Nanogramm-, sondern im Picogrammbereich/ml lagen.

Durch die Gabe von Vitamin C scheinen die Interleukin-6-Werte nicht beeinflusst zu werden, es bestehen kein signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Zum jetzigen Zeitpunkt besteht Unklarheit darüber, ob hohe Konzentrationen von Zytokinen im Plasma einen negativen Einfluss auf die Transplantatfunktion haben. In diversen Untersuchungen wurde diese These gestützt (Steininger *et al.*, 1994; Boros *et al.*, 1997, Warle *et al.*, 2003). Erhöhte Plasmaspiegel inflammatorischer Zytokine können zudem zur systemischen Aktivierung des Monozyten/Makrophagensystems führen und somit zu einer Verstärkung der systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) beitragen (Bauer *et al.*, 1998). Tange *et al.* beobachteten eine erhöhte Zahl respiratorischer Infektionen bei Patienten, die nach Reperfusion eine sehr stark erhöhte Plasmakonzentration von Interleukin-6 aufwiesen. Keine Korrelation konnte in der Untersuchung von Tange *et al.* zwischen der Höhe der Interleukin-6-Werte und den Transaminasen als Marker für die Leberfunktion festgestellt werden.

Dieses Ergebnis entspricht unseren Beobachtungen. Wie in Abbildung 3.4.3.1 und 3.4.3.2 gezeigt wird, besteht auch in unserer Untersuchung bei Patienten, die kein Vitamin C erhielten, keine Korrelation zwischen Interleukin-6-Werten und den Transaminasen, bei Patienten mit Vitamin C-Substitution besteht eine schwache bis mäßige Korrelation.

Patienten mit weit vom Median abweichenden Interleukin-6-Werten im Plasma 1 Stunde nach Reperfusion wiesen bereits vor Operationsbeginn hohe Interleukin-6-Konzentrationen im Plasma auf. Ursächlich hierfür sind am ehesten die bestehenden Grund-/bzw. Begleiterkrankungen zu sehen. Ein Patient wies neben der bestehenden Leberzirrhose auch eine Niereninsuffizienz mit Anurie auf. Ein zweiter Patient hatte als Grundkrankheit eine Autoimmunhepatitis, wodurch vielleicht schon der vorbestehende erhöhte Interleukin-6-Spiegel erklärt werden könnte.

4.5 Klinische Relevanz und Ausblick

Noch immer treten nach orthotopen Lebertransplantationen 10-30 % Transplantatdysfunktionen, bei bis zu 5 % der Fälle sogar ein initiales Transplantatversagen auf (Glantzounis G *et al.* 2005). Für die Schädigung des neuen Organs sind vor allen Dingen die während der Ischämie/Reperfusion gebildeten freien Radikale verantwortlich. (Biasi *et al.*, 1995, Armstrong, 1998).

Wie invitro-Untersuchungen zeigten, hat das wasserlösliche Vitamin C die Fähigkeit reaktive Sauerstoffspezies wie zum Beispiel Hydroxylradikale, Superoxidanionen oder hypochlorige Säure durch Bildung des reaktionsträgen Ascorbylradikals bzw. der Dehydroascorbinsäure zu reduzieren und somit zu inaktivieren (Bendich *et al.*, 1986).

Zur Inaktivierung membranständiger Lipidperoxidradikale trägt Vitamin C durch seine synergistische Wirkung mit Vitamin E bei, indem es das Tocopherolradikal wiederum in Vitamin E umwandelt.

Unsere Untersuchungsergebnisse geben Hinweise darauf, dass die Gabe von Vitamin C bei orthotopen Lebertransplantationen die Anzahl von freien Radikalen im Rahmen der Ischämie/Reperfusion verringern kann. Eindrückliche Unterschiede zeigten sich in der Myeloperoxidasekonzentration im Plasma nach Vitamin-C-Gabe, das auf eine geringere Aktivierung der Neutrophilen schließen lässt. Betrachtet man den Anstieg der TBARS, so kann

man einen signifikant geringeren Anstieg nach Vitamin-C-Gabe feststellen, so dass sich ein positiver Einfluss von Vitamin C auf die Lipidperoxidation vermuten lässt.

Durch die Fähigkeit, Metallionen zu reduzieren, werden Vitamin C jedoch auch prooxidative Effekte zugeschrieben (Halliwell, 1999). Dieser prooxidative Effekt von Vitamin C konnte durch unsere Untersuchungsergebnisse nicht sicher ausgeschlossen werden, da sich beide Untersuchungsgruppen in der SOD-Konzentration im Plasma zwar nicht signifikant unterschieden, der Median der substituierten Gruppe jedoch nicht wie erwartet erniedrigt, sondern leicht erhöht war.

Bisher ist die Frage der prooxidativen Wirkung von hochdosierter Vitamin-C-Gabe nicht eindeutig geklärt. An gesunden Probanden konnten Mühlhofer *et al.* (2001) in einem Crossover-Design zeigen, dass auch eine hochdosierte Vitamin-C-Gabe nicht zu einem erhöhten prooxidativen Effekt führte. Die Marker der Lipidperoxidation und die Ascorbylradikalwerte wurden gemäß der Halbwertszeit abgebaut und erreichten nach 3 Tagen einen gemeinsamen Level in der Belastungs- und der Kontrollgruppe.

Obwohl die MPO und die TBARS als indirekte Marker freier Radikale auf eine antioxidative und protektive Wirkung von Vitamin C hindeuten, stellten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen den Transaminasenverläufen als Leberfunktionsparameter in beiden Gruppen fest. In der durchgeführten linearen Regressionsanalyse zwischen den biochemischen Markern und den Transaminasen konnten wir nur zwischen SOD-Werten und den Transaminasen und den GPT-Werten ohne Vitamin C und MPO eine Korrelation nachweisen. Alle übrigen Parameter sind mit den Transaminasen nur schwach bis mäßig oder auch gar nicht korreliert, so dass fraglich ist, ob der Ischämie-/Reperfusionsschaden durch Transaminasen als Leberfunktionsparameter widerspiegelt wird. Vielleicht wäre es sinnvoller anstatt von hepatozellulären Enzymen, wie den Transaminasen, ein lysosomales Enzym, welches bei Kupferzellaktivierung oder Zelltod ausgeschüttet wird, wie zum Beispiel β -Galaktosidase als Leberfunktionsparameter zu verwenden. St. Peter *et al.* (2002) konnten nach Induktion einer kalten Ischämie an Schweinelebern einen deutlich rascheren Anstieg der β -Galaktosidase und eine gute Korrelation mit der Leberfunktion feststellen. Ashamiss *et al.* (2004) bestimmten nach Lebertransplantationen die Arginase als extrahepatisches Enzym und konnten eine gute Korrelation mit den übrigen Leberfunktionsparametern feststellen. Auch sollten die postoperative Galleproduktion und die Gerinnungsparameter als Maß für die Leberfunktion berücksichtigt werden.

Die Untersuchung sollte nochmals an einem größeren Patientenkollektiv und mit unterschiedlich hohen Dosen an Vitamin C durchgeführt werden, um die Ergebnisse zu verifizieren. Falls sich ein positiver Effekt auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden bei orthotopen Lebertransplantationen bestätigen lässt, wäre der routinemässige Einsatz von hochdosiertem intravenösen Vitamin C bei Lebertransplantationen als kostengünstige und nebenwirkungsarme Substanz zu diskutieren.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Untersuchung sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob eine hochdosierte intravenöse Gabe von Vitamin C als Antioxidans einen positiven Effekt auf den Ischämie-/Reperfusionsschaden bei orthotopen Lebertransplantationen hat.

Hierzu wurden 10 Patienten während der anhepatischen Phase der Lebertransplantation 7,5 g Vitamin C über einen Zeitraum von einer halben Stunde infundiert. Die Kontrollgruppe von 20 Patienten erhielt kein Vitamin C. Die Transaminasenverläufe präoperativ, postoperativ und 24 Stunden postoperativ stellen wir gegenüber. Im Verlauf der Transplantation führten wir zu 7 Abnahmezeitpunkten (präoperativ, 15 Minuten nach Explantation der Leber, 5 Minuten vor Reperfusion, 5 Minuten nach Reperfusion, 15 Minuten nach Reperfusion, 60 Minuten nach Reperfusion, 240 Minuten nach Reperfusion) Blutabnahmen durch und bestimmten zu diesen Zeitpunkten die thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen, die Superoxiddismutase und die Myeloperoxidase im Blutplasma als Marker des oxidativen Stresses. Als unspezifischer Parameter für die systemische Inflammation wurde die Interleukin-6-Konzentration im Plasma gemessen und ein Vergleich beider Gruppen durchgeführt.

Von Interesse waren folgende Fragestellungen:

1. Hat die intraoperative Vitamin-C-Gabe einen positiven Einfluss auf die Höhe der Transaminasen als Marker der postoperativen Leberfunktion?
2. Wird durch die intraoperative Vitamin-C-Gabe die Anzahl freier Radikale im Serum/Plasma verringert?
3. Welchen Einfluss hat die hochdosierte Vitamin-C-Gabe auf die systemische Inflammation?

Als Marker für die postoperative Leberfunktion wurden die GOT- und GPT-Werte verwendet. Über einen Zeitraum von 24 Stunden konnten wir zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede nachweisen, so dass wir einen positiven Einfluss von hochdosiertem Vitamin C auf den Anstieg der Transaminasen als Leberfunktionsparameter verneinen müssen. Zu diskutieren ist jedoch, ob der Ischämie-/Reperfusionsschaden durch die Transaminasen widerspiegelt wird, da von den gemessenen Parametern des oxidativen Stresses nur die Superoxiddismutase mit den Transaminasen mäßig korreliert bzw. korreliert ist, die thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen und die Myeloperoxidase überwiegend eine schwache bis gar keine Korrelation zeigten.

Ob Vitamin C die Anzahl freier Radikale im Blutplasma verringert, kann durch unsere Untersuchung nicht abschließend geklärt werden. Die Untersuchung müsste an einem größeren Patientenkollektiv wiederholt werden. Zum Vergleich beider Gruppen wurden jeweils die maximalen Anstiege in den zeitlichen Verläufen der einzelnen Parametern herangezogen.

Wir beobachteten einen signifikant geringeren Anstieg der thiobarbituratsäurehaltigen Substanzen im Blutplasma 4 Stunden nach Reperfusion in der Vitamin-C-Gruppe, das auf eine verminderte Lipidperoxidation hindeutet. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich in der Myeloperoxidasekonzentration im Plasma, die nach Vitamin-C-Gabe signifikant geringer ist. Vitamin C scheint die Aktivierung der Neutrophilen nahezu vollständig zu hemmen. Keinen signifikanten Unterschied sahen wir in der Superoxiddismutasekonzentration im Blutplasma beider Gruppen.

Die Interleukin-6-Werte beider Gruppen unterschieden sich nicht signifikant. Anhand unserer Daten scheint Vitamin C die systemische Inflammation nicht positiv zu beeinflussen, jedoch sollten die Ergebnisse in Zukunft durch Bestimmung weiterer Entzündungsparameter verifiziert werden.

6 Literatur

1. **Abt PL**, Desai NM, Crawford MD, Forman LM, Markmann JW *et al.*. Survival following liver transplantation from non-heart-beating donors. *Annals of Surgery* 2004;239:87-92
2. **Acosta F**, Serrano E, Diaz J, Carbonell L, Sanano T, Betran R, Roques V, Contreras RF, Robles R, Bueno FS, Ramirez P, Parilla P. Hemodynamic consequences of oxidative stress following reperfusion during liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 1999;31:2375-2376
3. **Adam R**, Bismuth H, Diamond T *et al.*. Effect of extended cold ischaemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet* 1992;340:1373-1376
4. **Ashamiss F**, Wierzbicki Z, Chrzanowska A *et al.*. Clinical significance of arginase after liver transplantation. *Ann. Transplant.* 2004;9(3):58-60
5. **Annaya-Prado R**, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/Reperfusion injury. *Journal of Surgical Research* 2002;105:248-258
6. **Annaya-Prado R**, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury. *Transplantation Proceedings* 2002;34:2518-2519
7. **Ardite E**, Ramos C, Rimola A, Grande L, Fernandez-Checa JC. Hepatocellular oxidative stress and initial graft injury in human liver transplantation. *Journal of Hepatology* 1999;31:921-927
8. **Armstrong D**, *Free Radical and Antioxidant Protocols*. Humana Press 1998, Totowa, New Jersey;101-106
9. **Astarcoglu H**, Karademir S, Ünek T, Özer E, Menekay S, Coker A, Astarcoglu I. Beneficial effects of pentoxifylline pretreatment in non-heart beating donors in rats; *Transplantation* 2000;69(1):93
10. **Bauer M**, Rensing H, Ziegenfuß T. Anästhesie und perioperative Immundefunktion. *Der Anästhesist* 1998;47:538-556
11. **Bernheim F**, Bernheim M, Wilbur KM. The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids. *Journal of Biol. Chemistry* 1948;174:257-264
12. **Biasi F**, Bosco M, Chiappino I, Chiarpotto E *et al.*. Oxidative damage in human liver transplantation. *Free Radical Biology and Medicine* 1995;19:311-317
13. **Biasi F**, Poli G, Salizzoni M, Cerutti E, Battista S *et al.*. Effect of perioperative infusion of antioxidants on neutrophil activation during liver transplantation in humans. *Transplantation Proceedings* 2002;34:755-758

14. **Biesalski HK**, Frank J. Vitamine , Physiologie, Pathophysiologie, Therapie. Thieme 1997; 41-58:173-181
15. **Boros P**, Suehiro T, Curtiss S, Sheiner P, Emre S, Guy S, Schwartz ME, Miller CM. Differential contribution of graft and recipient to perioperative TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6 and IL-8 levels and correlation with early graft function in clinical liver transplantation. Clin. Transplant 1997;11:588-592
16. **Bulkley GB**. Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury, aberrant triggering of reticuloendothelial function. Lancet 1994;344:934-6
17. **Bzeizi K I**, Jalan R, MacGregor I, Drummond O, Lee A, Hayes P C. Neutrophil Elastase: a determinant of endothelial damage and reperfusion injury after liver transplantation? Transplantation 1996; 15; 916-920
18. **Burton GW**, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. Lancet 1982;7(2):327
19. **Burton GW**, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? Archives of Biochemistry and Biophysics 1983;221(1):281-290
20. **Carden DL**, Granger ND. Pathophysiology of ischemia/reperfusion injury. Journal of Pathology 2000;190:255-266
21. **Consensus conference** of indication of liver transplantation. Hepatology 1994;125: 781-785
22. **De Zwart LL**, Meermann JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radical Biology and Medicine 1999;26:202-226
23. **Esterbauer H**, Cheeseman KH. Lipid peroxidation: part 1, Biochemical and Biophysical Aspects. Sonderband Chem. Phys. Lipids 1987;44:71-365
24. **Esterbauer H**, Cheeseman KH. Lipid peroxidation: part 2, Pathological Implications. Sonderband Chem. Phys. Lipids 1987;45:103-397
25. **Frei B**, Ames BN. Ascorbic acid protects plasma lipids against oxidative damage. Nutrition and cancer 1991;15:250-251
26. **Fujita T**, Furitsu H, Nishikawa M, Takakura Y, Sezaki H, -hashida M. Therapeutic effects of superoxide dismutase derivatives modified with mono-or polysaccharides on hepatic injury induced by ischemia/reperfusion. Biochemical Biophysics Res Commun 1992;189:191-196
27. **Fry D**. Multiorgan system failure.3-25

28. **Giakoustidis D**, Papageorgiou G, Iliadis S *et al.*. Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia/reperfusion injury. *World J. of Surgery* 2002;26:872-877
29. **Glantzounis Georgis K.**, Salcinski Henryk J., Yang Wenxuan *et al.*, The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia/reperfusion injury: a review. *Liver Transplantation* 2005;11(9):1031-1047
30. **Granger DN.** Role of Xanthine oxidase and granulocytes in ischemia/reperfusion injury. *American Journal of Physiology* 1988;255:H1269-H1275
31. **Halliwell B**, Gutteridge MC. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press 1999, reprinted 2000; 116:200-219;458:578:640-645:645-661
32. **Halliwell B**, Hu ML. Interaction of nitrogendioxide with human plasma. Antioxidant depletion and oxidative damage. *FEBS* 1992;313:62-66
33. **Heller R**, Münsher-Paulig F, Gräbner R, Till U. L-ascorbic acid potentiates nitric oxide synthesis in endothelial cells. *Journal Biol. Chem.* 1999;274:8254-8260
34. **Herold G.** *Innere Medizin* 1993. 401 – 404
35. **Iwamoto A**, Egashira T, Takayama F *et al.*. Change in free radical-related substances in plasma following ischemia-reperfusion in rat liver. *Pathophysiology* 2002;8:167-174
36. **Jaeschke H.** Molecular mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and preconditioning. *American Journal of Physiology* 2002;284:G15-G26
37. **Jaeschke H.** Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia/reperfusion injury in rat liver. *American Journal of Physiology* 1991;260:G355-62
38. **Janero DR.** Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 1990;515-540
39. **Jassem W**, Fuggle SV, Rela M, Koo DH, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2002;73:493-499
40. **Jassem W**, Roake J. The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation. *Transplantation Rev.* 1998;12:14
41. **Karwinski W**, Soreide O. Allopurinol improves scavenging ability of the liver after ischemia/reperfusion injury. *Liver* 1997;17:139-143
42. **Kehrer JP.** The Haber Weiss reaction and mechanism of toxicity. *Toxikology* 2000; 149(1):43-50
43. **Klempnauer J.** *Liver Transplantation Today.* *Transplantation Proceedings* 2002;33: 3433-3435

44. **Kubala L**, Ciz M, Vondracek J, Cizova H, Cerny J, Memec P, Studenik P, Duskova M, Lojek A. Peri- and postoperative course of cytokines and the metabolic activity of neutrophils in human liver transplantation. *Cytokine* 2001;16(3):97-101
45. **Kurukawa T**, Takagi H. Mechanism and prevention of ischemia/reperfusion injury; *Transplantation Proceedings* 1999;31:1775-1776
46. **Lentsch AB**, Atushi K, Yoshidome H, McMasters KM., Edwards MJ. Inflammatory mechanismus und therapeutic strategies for warm hepatic/reperfusion injury. *Hepatology* 2000;32:169-173
47. **Locatelli F**, Canaud B, Echkard KU *et al.*, Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patients outcome. *Nephrol. Dial. Transplant* 2003;18:1272-1280
48. **Lohmann R**, Langrehr JM, Neuhaus R, Raakow R, Bechstein WO, Neuhaus P. Long-term survival and complications after orthotopic liver transplantation for postnecrotic cirrhosis. *Transplantation Proceeding* 2000;5:599
49. **Maddrey WC**. Liver Transplantation: An Overview. *Hepatology*;8(4):948-959
50. **Marabuayashi S**, Dohi K, Sugino K, Kawasaki T. The protective effect of administered alpha-tocopherol against hepatic damage cause by ischemia-reperfusion or endotoxemia. *Ann N.Y. Acad. Science* 1989;570:225-234
51. **May JM**. How does ascorbic acid prevent endothel dysfunction. *Free Radical Biology Medicine* 2000;1421-1429
52. **McCord JM**. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 2000; 652 – 659.
53. **Molyneux CA**, Matthew CG, Ward BJ. Oxidative stress and cardiac microvascular structure in ischemia and reperfusion: the protective effect of antioxidant vitamins. *Microvascular Research* 2002;64:265-277.
54. **Mühlhöfer A**, Mrosek S, Schlegel B, Trommer W, Rozario F, Böhlrs H, Zoller W, Biesalski H. Intravenous high dose vitamin C is not associated with prooxidant damages in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 2002;75:410
55. **Müller AR**, Platz KP, Schuhmacher G, Riger J, Gebauer B, Neumann U, Neuhaus P. Mechanisms of preservation and reperfusion injury in human liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 1997;29:3455-3457

56. **National Institutes of Health Consensus Development.** Conference Statement: liver transplantation. *Hepatology* 1983; (Suppl.):107-110
57. **Neuhaus P.** Charité, Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie, Internetinformation
58. **Nguyen WD,** Kim DH, Alam HB, Provido HS, Kirkpatrick JR. Polyethylene glycol-superoxide dismutase inhibits lipid peroxidation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Critical Care* 1999;3:127-130
59. **Öztürk SH,** Burak Cimen MY *et al.*. Oxidant/antioxidant status of plasma samples from patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. International* 1999;19:35-37
60. **Orr WC,** Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994;236:1128-1133
61. **Ozaki M,** Fuchinoue S, Teraoka S, Ota K. The in vivo cytoprotection of ascorbic acid against ischemia/reoxygenation injury in rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 318:439-445
62. **Padh H,** Cellular function of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* 1990;68:1166-1173
63. **Paolini M,** Pozzetti L, Pedulli GF *et al.*. The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life Science* 1999;64:PL 273-278
64. **Parks DA,** Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol. Scand.* 1986; Suppl 548:97-100
65. **Peter Shawn D St,** Imber Charles J. *et al.*, β -Galaktosidase as a marker of ischemic injury and a mechanism for viability assessment in porcine liver transplantation. *Liver Transplantation* 2002;8(1):21-26
66. **Pfitzmann R.** Persönliche Mitteilung 3/2004
67. **Pierenne J,** Gunson H, Khaleef H, Hubscher S, Afford S, McMaster P, Adams D. Influence of ischemia reperfusion injury on rejection after liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 1997;29:366-367
68. **Pilz J,** Meineke I, Gleiter C. H, Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography B* 2000;742:315-325
69. **Plecko TH,** Rügauer M, Kruse-Jarres JD. Der oxidative Stress. *Klinische Chemie* 1998;9:624-630

70. **Plösch W**, Krenn GC, Pokorny H, Pezawas L. The use of the antioxidant tirilazad mesylate in human liver transplantation: is there a therapeutic benefit?. *Intensive Care Medicine* 1999;25:616-619
71. **Roth E**, Manhart N, Punz A. Antioxidative Abwehrmechanismen während systemischer Inflammation. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 1998; 35(2):95-105
72. **Selzner N**, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003;125:917-936
73. **Seo MY**, Lee SM. Protective effect of low dose ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Journal of Hepatology* 2002;36:72-77
74. **Serracino-Inglott F**, Nagy A *et al.*. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *The American Journal of Surgery* 2001;181:160-166
75. **Serrano E**, Diaz J, Acosta F *et al.*. Oxidative stress during ischemia/reperfusion in liver transplantation. *Transplantation Proceedings* 2000;32:2651
76. **Shenkin A**, Fraser WD, Series J, Winstanley FP, McCartney AC, Burns HJ, van Damme J. The serum interleukin-6 response to elective surgery. *Lymphokine Research* 1989;8:123-127
77. **Sies H (ed)**. *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*. Academic Press 1991, New York and London; XVI-XXIII.:222-224
78. **Soltys K**, Dikdan G, Koneru B, Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2001;34:13-18
79. **Starzl TE**, Machiro TL, von Kaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg-Gyn-Obst* 1963;117:659 – 679
80. **Starzl TE**. Experimental and clinical homotransplantation of the liver. *Annals of N Y Academic Science* 1964;30(120):739-765
81. **Steininger R**, Roth E, Fugger R, Winkler S, Langle F, Grunberger T, Gotzinger P, Sautner T, Muhlbacher F. Transhepatic metabolism of TNF-alpha, IL-6, and endotoxin in the early hepatic reperfusion period after human liver transplantation. *Transplantation* 1994;58:179-183
82. **Sussman MS**, Schiller HJ, Buchman TG, Bulkley GB. Oxygen Free Radicals. *Multiorgan System Failure*:143-163

83. **Tange S**, Höfer Y, Welte M, Anthuber M, Jauch K W, Geissler E K, Ertel W. Lokal secretion of TNF- α from the liver does not correlate with endotoxin, IL-6, or organ function in the early phase after orthotopic liver transplantation. *Transpl. Int.* 2001;14: 80 - 86
84. **Teramoto K**, Bowers JL, Khettry U *et al.*. A rat fatty liver transplant model. *Transplantation* 1993;55:737-41
85. **Thies JC**, Teklote J, Clauer U, Töx U, Klar E, Hofmann WJ, Herfarth C, Otto G. The efficacy of N-acetylcysteine as a hepatoprotective agent in liver transplantation. *Transpl. Int.* 1998;11:S390-S392
86. **Thomas E**, Andreoli MD. Free radicals and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 2000;650-651
87. **Vollbracht C**. Vitamin-C-Infusionstherapie. *Naturmedizin im Spektrum* 2001;14-15
88. **Warle MC**, Metselaar HJ, Hop WCJ, Gyssens IC, Kap M, Kwekkeboom J, de Rave S, Zondervan PE, Ijzermans JNM, Tilanus HW, Bouma GJ. Early differentiation between rejection and infection in liver transplant patients by serum and biliary cytokine patterns. *Transplantation* 2003;75:146-151
89. **Wilson JX**. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters* 2002;527: 5-9
90. **Winterbourn C**, Vissers M, Kettle A. Myeloperoxidase; *Current Opinion in Hematology* 2000;7:53-58
91. **Wood RP**, Ozaki CF, Katz SM, Monsour HP, Dyer CH, Johnston TD. Liver Transplantation: The last ten years. *Horizont-Org-Transplantation* 1994;74(5):1133- 1147
92. **Yagi K**. Assay for Blood Plasma or Serum. *Methods in Enzymology* 1984;105:328- 331
93. **Yagi K**. Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids* 1987; 45:337- 351
94. **Yagi K**. *Methods Mol. Biol.* 1998;108:101
95. **Zeng LH**, Wu J, Carey D, Wu TW. Trolox and ascorbate: are they synergistic in protecting liver cells in vitro and in vivo? *Biochem Cell Biol* 1991;69:198-201

7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Kalzium
Cl ⁻	Chloridanion
Cu	Kupfer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
Fe	Eisen
GSH	Glutathion
GSSH	Glutathiondisulfid
HOCl	Hypochlorige Säure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IL-6	Interleukin-6
INF	Initiales Transplantatversagen
LO [·]	Alkoxyradikal
LOO [·]	Lipidperoxidradikal
MAD	Malondialdehyd
MPO	Myeloperoxidase
NAD	Nicotinamid – Adenin - Dinukleotid
NADH	Nicotinamid – Adenin – Dinukleotid – Dehydrogenase
NADPH	Nicotinamid – Adenin – Dinukleotid – Phosphat - Dehydrogenase
Na	Natrium
NO	Stickstoffmonoxid
NF – κ B	Nuklear – Faktor kappa B
O ₂	Molekularer Sauerstoff
O ₃	Ozon
O ₂ ^{·-}	Superoxidradikal
OH [·]	Hydroxylradikal
OLT	Orthotope Lebertransplantation
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen

RNS	Reaktive Stickstoffverbindungen
R`RNH	Aminverbindungen
R`RNCl	Chloraminverbindungen
SOD	Syperoxiddismutase
TBA	Thiobarbituratsäure
TNF	Tumornekrosefaktor

8 Anhang

8.1 Testkits, Ein- und Mehrwegartikel, Reagenzien

Testkits:

Human IL-6-Immunoassay	BD Bioscience K 550799 (Heidelberg)
Human MPO-Immunoassay	Immundiagnostik K6630 (Bensheim)
Human SOD-Immunoassay	Seramun Diagnostica GmbH KE-002 (Dolgenbrodt)

Ein- und Mehrwegartikel:

Pipette, 10 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipette, 100 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipette, 100 – 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipette, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen blau, 100-1000 µm, 72 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen gelb, 1 – 100 µm, 51 mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Polypropylen Röhrchen, 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Polystyrol Reagenzglas, 12 x 75 mm	Becton Dickinson (Heidelberg)
Polystyrol Reagenzglas 15 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
S-Monovette 75/15	Sarstedt (Nümbrecht)
Monovette Li-Heparin 10 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Monovette EDTA K 2,7 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten 1 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Serologische Pipetten 5 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Serologische Pipetten 10 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)

Reagenzien:

Aqua dest.	Braun AG (Melsungen)
Ortho-Phosphorsäure (85%), 1.00573	Merck (Darmstadt)
ButylatedHydroxyToluene (BHT) B-1378	Sigma-aldrich (USA)
ThioBarbituricAcid (TBA)	Fluka (Schweiz)
1.1.3.3 TetraMethoxyPropan (TMP)	Sigma-aldrich (USA)

NaCl, 106404	Merck (Darmstadt)
HCL, 100317	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, (Darmstadt)

8.2 Geräte

Photometer Dynatech MR5000	DPC Biermann (Bad Nauheim)
Mikrotiterplatten-Waschgerät 812 SW1	SLT-LAB-Instruments (Straßburg)
Heizblockthermostat HBT 130	HAP Labor Consult (Bovenden)
Fluoroscans Ascent FL	Thermo Electron Corporation (USA)
Megafuge 1.0R, Zentrifuge	Heraeus Instruments (Berlin)

9 Danksagung

Bei folgenden Personen möchte ich mich bedanken, die mich bei der Erstellung der Arbeit unterstützt haben.

Zuallererst ist hier mein Doktorvater Herr Professor H. Gerlach zu nennen, der mir bei der Planung, Durchführung und Fertigstellung der Arbeit mit seiner fachlichen Kompetenz und seinem Ideenreichtum stets hilfreich zur Seite stand, wofür ich mich an dieser Stelle sehr herzlich bedanken möchte.

Herrn Professor K. J. Falke gebührt mein Dank, der es mir ermöglichte, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich meinen ärztlichen Kolleginnen und Kollegen, besonders Frau Sonja Keßner sowie dem Pflegepersonal der Anästhesie für die Unterstützung beim Sammeln der Proben aussprechen.

Für ihre stete Hilfsbereitschaft beim Messen der Proben bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Labors, insbesondere bei Frau Margareta Petterson. Frau Dr. Wartenberg danke ich für die Hilfe und Koordination bei der Messung der TBARS an der Universität Stuttgart Hohenheim.

Meinem Bruder Alexander möchte ich für seinen Rat in statistischen Fragen danken, ebenso meinen Eltern ein herzliches Dankeschön für das Korrekturlesen der Arbeit.

10 Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Susanne Gößling, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Hochdosierte Gabe von Vitamin C bei Lebertransplantationen: Einfluss auf 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.“

Berlin, 21. Februar 2007