

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

DISSERTATION

Reduktion proinflammatorischer Zytokine durch eine
Methylprednisolon-Therapie hirntoter Spender vor
Lebertransplantation

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Warnick

aus Rostock

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Bahra
2. Prof. Dr. med. C. Graeb
3. Prof. Dr. R. Öllinger

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Lebertransplantation	6
1.2	Risikofaktoren der Transplantatdysfunktion	9
1.2.1	Antigen-abhängige Faktoren.....	9
1.2.2	Antigen-unabhängige Faktoren	9
1.3	Der Hirntod als Spender-spezifischer Risikofaktor	10
1.3.1	Hämodynamische Veränderungen.....	11
1.3.2	Hormonelle Veränderungen	11
1.3.3	Immunologische Veränderungen	11
1.4	Spendervorbehandlung.....	12
1.5	Aufgabenstellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Auswahl der Organspender.....	15
2.2	Materialgewinnung und Verfahren zur Bestimmung der Zytokinpiegel im Spenderserum.....	16
2.2.1	Zytokin-Bestimmung durch Immunoassay	17
2.2.2	Cytometric Bead Array System (CBA)	17
2.2.3	Bestimmung der Cortisol-Spiegel im Spenderserum.....	17
2.3	Organentnahme	18
2.3.1	Präparation im Abdomen.....	18
2.3.2	Präparation im Thorax.....	19
2.3.3	Organperfusion	19
2.3.4	Entnahme der Leber (ohne Pankreas)	19
2.4	Auswahl der Organempfänger	20
2.5	Lebertransplantation	20
2.5.1	Vorbereitung des venösen Bypasses	21
2.5.2	Vorbereitung zur Hepatektomie mit Anlage des Bypasses.....	21
2.5.3	Hepatektomie	22
2.5.4	Ex-Situ-Präparation des Transplantats	22
2.5.5	Implantation.....	22
2.6	Klinischer Verlauf nach Lebertransplantation	23

2.6.1	Biochemische Parameter	23
2.6.2	Quantifizierung der Galleproduktion	24
2.6.3	Bestimmung der Rejektionsrate, ITBL und PNF	24
2.7	Statistische Methoden	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Spender-Charakteristika	25
3.2	Empfänger-Charakteristika	27
3.3	Applizierte Medikamente	29
3.4	Cortisol-Spiegel im Serum	30
3.5	Zytokin-Spiegel im Serum	31
3.5.1	IL-2-Spiegel im Serum	31
3.5.2	Konzentration des IL-2-Rezeptors im Serum	32
3.5.3	IL-6-Spiegel im Serum	33
3.5.4	TNF- α -Spiegel im Serum	34
3.5.5	MCP-1-Spiegel im Serum	35
3.5.6	IP-10-Spiegel im Serum	36
3.5.7	Konzentrationen der Zytokine IL-8, IL-10 und IFN- γ	37
3.6	Initiale Organfunktion und Rejektionsrate nach Lebertransplantation	38
3.6.1	Biochemische Parameter	38
3.6.2	Galleproduktion und Bilirubin-Spiegel nach Lebertransplantation	41
3.6.3	ITBL und Rejektionsrate nach Transplantation	43
4	Diskussion	44
4.1	Der Hirntod als Antigen-unabhängiger Risikofaktor	44
4.1.1	Hormonelle Veränderungen infolge des Hirntods	44
4.1.2	Immunologische Veränderungen infolge des Hirntods	45
4.1.3	Einfluss des Hirntods auf den klinischen Verlauf nach Transplantation	49
4.2	Spendervorbehandlung	50
4.2.1	Hormonspiegel nach Vorbehandlung	50
4.2.2	Zytokinspiegel nach Vorbehandlung	51
4.2.3	Klinische Parameter nach Transplantation	54
4.3	Schlussfolgerungen	55

5	Zusammenfassung	58
6	Publikation der Studie	60
7	Literaturverzeichnis	61
8	Danksagung.....	70
9	Curriculum vitae.....	71
10	Publikationsliste.....	72

1 Einleitung

1.1 Lebertransplantation

Versuche von Organübertragungen zwischen verschiedenen Individuen gibt es bereits seit langem. Für erste Arbeiten zur Gefäß und Organtransplantation erhielten CARREL und GUTHRIE bereits 1912 den Nobelpreis für Medizin. Aber erst durch die Möglichkeit einer spezifischen immunsuppressiven Therapie des Organempfängers gelang der klinische Durchbruch in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts. Die erste erfolgreiche Nierentransplantation gelang 1954 durch J.E. MURRAY in Boston (USA) [1]. Eine Lebertransplantation wurde am 1. März 1963 erstmalig erfolgreich durch T. E. STARZL in Denver (USA) durchgeführt [2, 3]. Eine Herztransplantation erfolgte zum ersten Mal 1967 durch C. N. BARNARD im Groote Schuur Hospital, Kapstadt (Südafrika) [4].

Seitdem entwickelte sich die Organtransplantation insbesondere durch die Entwicklung hochpotenter Immunsuppressiva zur klinischen Routine. Gleichzeitig wurden die Indikationen zur Organtransplantation – insbesondere zur Lebertransplantation – stetig ausgeweitet (siehe Tabelle 1.1). Häufige Indikationen für die Lebertransplantation sind eine Leberzirrhose auf dem Boden einer Hepatitis B oder C, einer Autoimmunhepatitis, einer primär biliären Zirrhose (PBC) oder eine Leberzirrhose infolge einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC). Eine eingeschränkte Indikation besteht bei einer ethyloxischen Zirrhose. Weitere Indikationen sind metabolische Erkrankungen wie Morbus Wilson oder Hämochromatose sowie das Budd-Chiari-Syndrom. Unter bestimmten Voraussetzungen ist eine Lebertransplantation sogar bei malignen Grunderkrankungen wie dem hepatozellulären Karzinom (HCC) oder Klatskin-Tumoren möglich [5-8].

Durch die weitergefasste Indikationsstellung stieg die Zahl der Neuanmeldungen zur Lebertransplantation in den letzten Jahren stetig an. Die Zahl der erfolgreichen Lebertransplantationen konnte aber nicht in demselben Maß erhöht werden, so dass in Deutschland, Europa und Nordamerika ein Mangel an verfügbaren Organen entstand (siehe Abbildung 1.1). Für Deutschland steht im Jahr 2008 einer Zahl von 1866 Neuanmeldungen zur Lebertransplantation nur eine Gesamtzahl von 1.067 durchgeführten Lebertransplantationen gegenüber [9]. Leberlebenspenden können

diese Lücke nicht schließen, da sie zahlenmäßig nur eine untergeordnete Rolle spielen und diese Option nur einer Minderheit potentieller Organempfänger zur Verfügung steht.

2008 DEUTSCHLAND		DSO
Indikationen für eine Lebertransplantation		
DIE ZEHN HÄUFIGSTEN ICD-10 HAUPTDIAGNOSEN (BEI NEUANMELDUNG)		
K70.2	Alkoholische Fibrose und Sklerose der Leber	520
C22.0	Leberzellkarzinom	266
K74.6	Sonstige und nicht näher bezeichnete Zirrhose der Leber	195
K74/B18.2	Fibrose und Zirrhose der Leber / Chronische Virushepatitis C	184
K83.0	Cholangitis	86
K76.8	Sonstige näher bezeichnete Krankheiten der Leber	53
Q44.2	Atresie der Gallengänge	44
K72.0	Akutes und subakutes Leberversagen	41
K74.3	Primäre biliäre Zirrhose	39
Q44.6	Zystische Leberkrankheit (Zystenleber)	33
		1.461
Bei einem Patienten sind mehrere Diagnosen möglich. Insgesamt: 67 Hauptdiagnosen bei 1.866 Fällen		
Quelle: Eurotransplant		DSO 98

Tabelle 1.1: Indikationen zur Lebertransplantation (Quelle: DSO)

Ziel der aktuellen Forschung ist deshalb die Suche nach Wegen, die Qualität der Transplantate zu verbessern. Weltweit versuchen Forschungsgruppen, die die Transplantatqualität bestimmenden Faktoren zu identifizieren. Gesucht werden Möglichkeiten durch entsprechende Behandlungen diese Faktoren günstig zu beeinflussen, um eine vorzeitige Organdysfunktion des Transplantats zu vermeiden und um auch Organe mit grenzwertiger Funktion für Transplantationen nutzen zu können.

2008 DEUTSCHLAND

Neuanmeldungen und Lebertransplantationen

DSO

ANZAHL

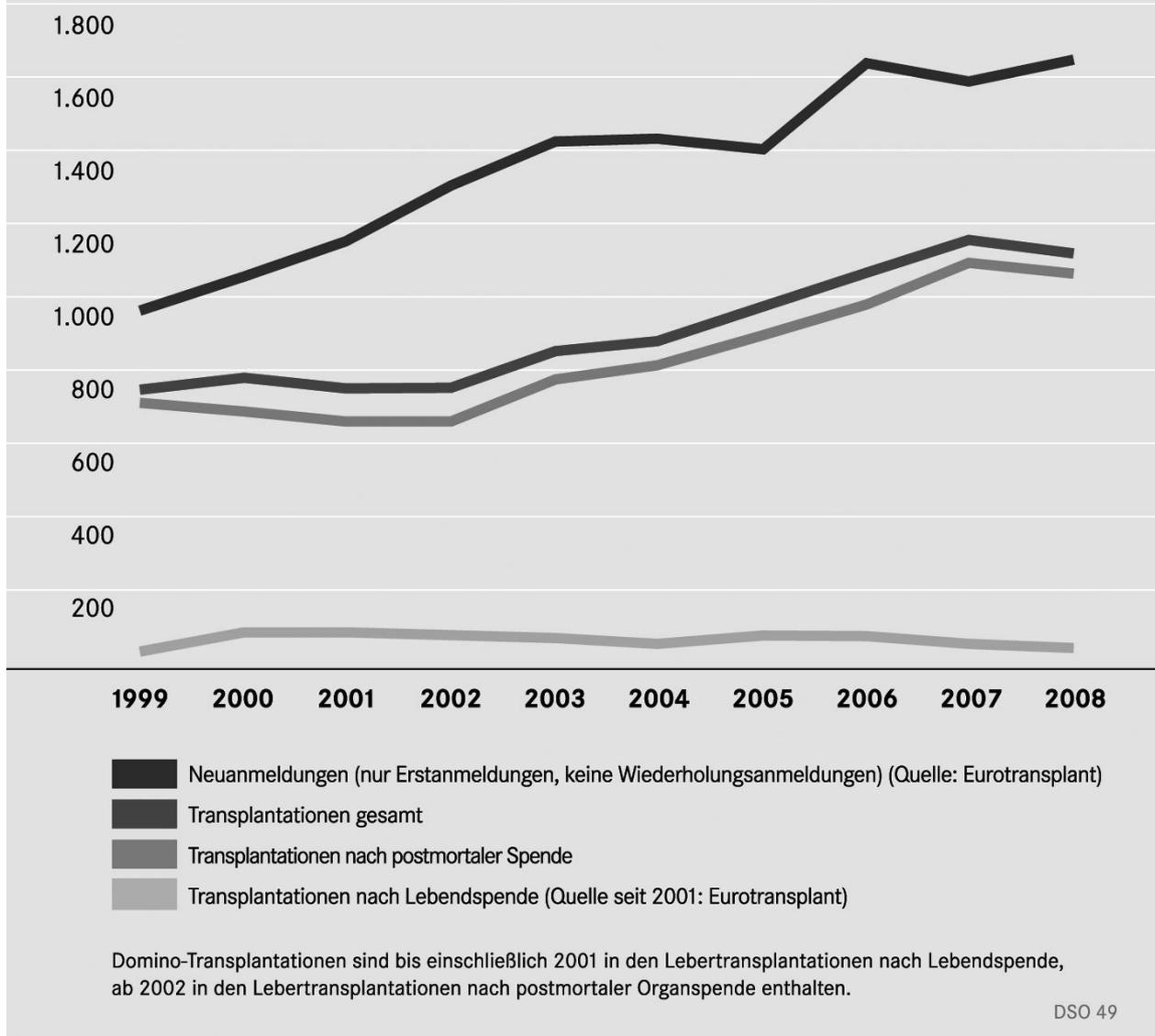


Abbildung 1.1: Neuanmeldung und Lebertransplantationen in Deutschland bis 2008 (Quelle: DSO)

1.2 Risikofaktoren der Transplantatdysfunktion

Sowohl klinische als auch experimentelle Untersuchungen zeigen, dass Antigen-abhängige und Antigen-unabhängige Faktoren entscheidend für die Ausbildung und das Fortschreiten einer Transplantatdysfunktion sind [10]. Ein multifaktorielles Zusammenspiel von Antigen-abhängigen und Antigen-unabhängigen Faktoren scheint der chronischen Transplantatdysfunktion zugrunde zu liegen [11].

1.2.1 Antigen-abhängige Faktoren

Der Grad der Übereinstimmung der HLA-Antigene bei Spender und Empfänger beeinflusst sowohl die Frequenz als auch die Intensität akuter Rejektionen nach einer Transplantation [12]. Trotz scheinbar erfolgreicher Therapie des akuten Abstoßungsereignisses begrenzt die Zahl akuter Rejektionen durch progredienten Verlust von funktionellem Parenchym auch den Langzeitverlauf der Transplantatfunktion.

Bei Nierentransplantationen zeigen HLA-kompatible Spender-Empfänger-Kombinationen eine signifikant bessere Langzeitfunktion der Transplantate. Gleichwohl spielt die HLA-Kompatibilität bei der Lebertransplantation nur eine geringere Rolle.

1.2.2 Antigen-unabhängige Faktoren

Experimentelle und klinische Daten führten zur Identifizierung einer Reihe von Spender-spezifischen Antigen-unabhängigen Risikofaktoren. Einige Risikofaktoren, wie das Alter der Spender oder Spender-assoziierte Erkrankungen, stehen zur Organentnahme bereits fest und lassen sich nicht beeinflussen. Dauer und Art der Intensivtherapie bestimmen ebenso die Organqualität, jedoch ergeben sich hier Einflussmöglichkeiten. Ähnliches gilt für die chirurgischen Maßnahmen bei der Organentnahme inklusive der Organperfusion und Konservierung. Einfluss auf die Organqualität vor einer Transplantation hat auch der Organtransport und die Dauer der Ischämiezeit [13].

Durch den Vergleich von Kadaver-Spenden mit Lebendspenden konnte der Hirntod selbst als bedeutender Antigen-unabhängiger Faktor herausgearbeitet werden. Zahlreiche tierexperimentelle und klinische Arbeiten zeigten Störungen der

Spenderorgane auf unterschiedlichen Ebenen, die eng mit den Veränderungen nach dem Hirntod verbunden sind [14-17].

Diese Risikofaktoren verursachen in ihrer Gesamtheit eine unspezifische immunologische Aktivierung des Organs, welche nach der Transplantation eine verstärkte Immunantwort des Empfängers hervorruft. Die Transplantate weisen einen erhöhten Besatz an endothelialen Oberflächenmolekülen auf, die zu einer verstärkten unspezifischen Aktivierung, Adhäsion und Migration von Entzündungszellen im Transplantat führen. Daneben findet sich eine erhöhte Expression von HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-Molekülen, die eine spezifische, Antigen-getriggerte Immunantwort induzieren. Die unspezifische und die spezifische Immunreaktion beeinflussen und verstärken sich gegenseitig. Ihre synergistischen Effekte verursachen nach der Transplantation häufigere Rejektionen mit schwereren Verläufen, die zu einer vorzeitigen Schädigung des Transplantats führen [18].

Zusätzlich dazu existieren auch Empfänger-spezifische Antigen-unabhängige Risikofaktoren. Hierzu zählen die Grund- und Begleiterkrankungen des Empfängers, Infektionen und die Art der Immunsuppression.

1.3 Der Hirntod als Spender-spezifischer Risikofaktor

In den letzten Jahren konnte der Hirntod als wichtiger Antigen-unabhängiger Risikofaktor für eine Transplantatdysfunktion identifiziert werden. Die vielschichtigen Veränderungen im Spender als Folge des Hirntods verursachen Schädigungen des Transplantats noch vor der Transplantation. Diese führen zu gehäuften akuten Rejektionen, einer beschleunigten chronischen Rejektion und zu einem verringerten Transplantatüberleben [16, 19-30].

Durch tierexperimentelle und klinische Studien konnten Mechanismen und Auswirkungen des Hirntods auf die Qualität der Spenderorgane herausgearbeitet werden. Gefunden wurden zahlreiche Veränderungen auf hämodynamischer, hormoneller und immunologischer Ebene. Entsprechende Untersuchungsergebnisse liegen für Herz, Lungen, Nieren und Leber vor [14, 15, 31].

1.3.1 Hämodynamische Veränderungen

Die hämodynamischen Auswirkungen des Hirntods auf den Spender lassen sich in zwei Abschnitte teilen. Auf eine frühe hypertensive Phase folgte eine Phase der Normo- oder Hypotension [32].

Die frühe hypertensive Phase wird durch eine massive Ausschüttung von Katecholaminen verursacht. Auf die cerebrale Ischämie reagiert der Körper mit einer ausgeprägten Sympathikus-Aktivierung, in deren Folge große Mengen endogener Katecholamine freigesetzt werden. Die massive Katecholaminfreisetzung – auch *autonomic storm* genannt – bewirkt eine periphere Vasokonstriktion, die zu Organminderperfusionen und Organischämien führt. In diesen Organen kommt es zu einem vermehrten anaeroben Stoffwechsel mit Anhäufung anaerober Metabolite.

Die Metabolite bewirken wiederum eine Vasodilatation, die zu einer normo- oder hypotensiven Phase überleitet. Vasodilatation, Hypotonie und kardiale Dysfunktion können so den hämodynamischen Kollaps mit Organminderperfusion und Organischämie hervorrufen.

1.3.2 Hormonelle Veränderungen

Neben der Freisetzung von Katecholaminen ist in hormoneller Hinsicht besonders die Hypothalamus-Hypophysen-Achse vom Hirntod beeinflusst. Verminderte Vasopressin-Spiegel führen zum Diabetes insipidus des Spenders. Einige tierexperimentelle Arbeiten zeigten einen verringerten Cortisol-Spiegel im Spender. Außerdem wurden verringerte Konzentrationen der Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 registriert [14, 15].

Untersuchungen beim Menschen zeigten jedoch ein uneinheitliches Bild mit zum Teil nur minimalen hormonellen Veränderungen [33].

1.3.3 Immunologische Veränderungen

Der Schwerpunkt der Forschungen über die Rolle des Hirntodes lag in den letzten Jahren bei den immunologischen Veränderungen, die durch den Hirntod ausgelöst werden.

Der Hirntod bewirkt einen Anstieg proinflammatorischer Zytokine im Spender, der in mehreren tierexperimentellen und klinischen Arbeiten nachgewiesen wurde. Gezeigt werden konnte ein erhöhter Ausstoß von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β ,

IL-2, IL-6, TNF- α und IFN- γ [17, 34-42]. Diese Zytokine bewirken auf unterschiedliche Weise die Aktivierung von immunkompetenten Zellen.

Parallel konnten mehrere Forschungsgruppen eine Hochregulation von immunologisch wirksamen Membranproteinen nachweisen [13, 17, 36, 43-47]. Hierzu zählen Oberflächenproteine wie ICAM-1, VCAM-1, P- und E-Selektin oder MHC-II. Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1, P- und E-Selektin wird durch Zytokine induziert und bewirkt eine verstärkte transepitheliale Migration von Leukozyten in das Organparenchym [48, 49].

Die Gesamtheit dieser Mechanismen führt zu einer verstärkten immunologischen Aktivität des Transplantats, die nach der Transplantation eine verstärkte Immunantwort des Empfängers induziert. Die Folge sind häufigere Rejektionsepisoden mit einem verringerten Transplantatüberleben.

1.4 Spendervorbehandlung

Die Erkenntnisse über die Organveränderungen infolge des Hirntods und deren Auswirkungen auf die Transplantatfunktion motivierten zur Suche nach Behandlungsmöglichkeiten, die Auswirkungen des Hirntods zu minimieren, Organveränderungen zu unterdrücken oder umzukehren [50-52].

SINGER et al. diskutierten nutritive Therapieoptionen (Antioxidantien, Spurenelemente, Fischöl) und sehen darin einen Beitrag zur Optimierung des Spendermanagements [53].

Die frühe Phase des Hirntods bewirkt einen *autonomic storm* durch eine massive Ausschüttung von Katecholaminen. Durch eine Therapie des *autonomic storm* konnten bei der Herztransplantation eine verbesserte myokardiale Funktion, eine höhere Rate an transplantierten Herzen und ein verlängertes Überleben erzielt werden [54].

Ausgehend von den hormonellen Störungen wurde der Einfluss einer Hormonsubstitution nach dem Hirntod untersucht [55]. Eine konsequente Substitution mit Steroiden, Vasopressin und T3/T4 führte zu einer höheren Rate an transplantierten Organen im Vergleich zu unbehandelten Spendern [56, 57]. In Bezug auf die Herztransplantation konnte durch die Hormontherapie eine höhere Rate an

transplantierten Herzen mit einer besseren Funktion und einem verlängerten Überleben beobachtet werden [58].

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der Vorbehandlung des hirntoten Organspenders zur Minimierung der immunologischen Veränderungen, die durch den Hirntod des Spenders ausgelöst werden.

Die anti-inflammatorische Wirkung von Glucocorticoiden ist seit langem bekannt und wird in der klinischen Praxis routinemäßig zur Modulation des Immunsystems eingesetzt. Durch die Gabe von Glucocorticoiden zur Vorbehandlung des hirntoten Spenders konnte im Rattenmodell eine signifikante Reduktion proinflammatorischer Marker gezeigt werden. Dies führte zu einer besseren Funktion und einer geringeren Zahl an akuten Rejektionen transplanzierter Nieren [59-62].

Beim Menschen konnte für die Lungentransplantation durch eine hochdosierte Steroidtherapie eine signifikant erhöhte Rate an transplantablen Organen erreicht werden. Außerdem zeigte sich zur Explantation eine verbesserte Oxygenierung der Organe [63].

Die Auswirkungen einer Steroidtherapie des hirntoten Spenders auf die Organqualität der Leber wurden bisher nur unzureichend untersucht. Erste Arbeiten zeigen auch hier eine Unterdrückung proinflammatorischer Marker [64]. Deren Auswirkungen auf die Organqualität und das Outcome nach der Transplantation sind noch unklar.

1.5 Aufgabenstellung

Nach derzeitigem Erkenntnisstand bewirkt der Hirntod eine gesteigerte Ausschüttung proinflammatorischer Serummarker. Die Expression scheint sich durch eine Steroidtherapie des Spenders zwischen Hirntod und Organentnahme günstig beeinflussen zu lassen. Insbesondere die Auswirkungen einer solchen Therapie auf Lebertransplantate wurden bisher nur unzureichend untersucht.

In der hier dargestellten prospektiv randomisierten klinischen Studie soll der Einfluss einer Therapie des hirntoten Spenders mit Methylprednisolon auf die Zytokin-Serumspiegel im Spender untersucht werden. Dabei ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Können durch eine Therapie hirntoter Organspender mit Methylprednisolon signifikante Unterschiede in den Serumkonzentrationen von löslichen Zytokinen (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , MCP-1, IP-10) im Vergleich zu nicht vorbehandelten Spendern gezeigt werden?
2. Lassen sich durch die Vorbehandlung immunologische Veränderungen infolge des Hirntods unterdrücken?
3. Verändert die Vorbehandlung der Spender mit Methylprednisolon den klinischen Verlauf nach der Lebertransplantation (biochemische Parameter, primäre Non-Funktion, Rejektionsrate) im Vergleich zu nicht vorbehandelten Spendern?

2 Material und Methoden

Die vorliegende prospektiv randomisierte klinische Studie wurde genehmigt von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin.

2.1 Auswahl der Organspender

Im Zeitraum von 2003 bis 2006 wurden in dieser Single-Center-Studie 100 Hirntodspender aus dem Gebiet Berlin-Brandenburg der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) prospektiv in 2 Gruppen randomisiert. Das Ergebnis der Randomisation wurde in einem verschlossenen Umschlag verwahrt und war gegenüber dem Untersucher, dem Organempfänger, dem Pathologen, dem Immunologen und den Chirurgen verblindet.

Gruppe 1:

Die erste Gruppe bestehend aus 50 hirntoten Spendern (Gruppe 1: n=50) erhielt ab dem Zeitpunkt des Einverständnisses zur Organspende und nach Abschluss der Hirntoddiagnostik eine Methylprednisolon-Therapie (Urbason®). Hierzu wurde eine Induktionsdosis von 250 mg i.v. Methylprednisolon appliziert. Daran schloss sich eine kontinuierliche Methylprednisolon-Gabe mit 100 mg/h i.v. bis zur Organentnahme an.

Gruppe 2:

Die zweite Gruppe enthielt ebenfalls 50 hirntote Spender (Gruppe 2: n=50), die jedoch keine Therapie mit Methylprednisolon erhielten.

Alle Spender, die aufgrund ihrer Grunderkrankung eine Therapie mit Steroiden außerhalb des Studienprotokolls erhielten und alle Spender mit Infektionen wurden von der Studie ausgeschlossen. Eine Infektion wurde angenommen, wenn eine Notwendigkeit zur Applikation von Antibiotika bestand.

Das weitere Management des Spenders, insbesondere die intensivmedizinische Therapie, erfolgte gemäß dem standardisierten Protokoll zur Spenderbehandlung der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) Berlin-Brandenburg.

Hirntote Spender, deren Leber im Rahmen des Allokationsverfahrens von EUROTRANSPLANT Empfängern außerhalb des Transplantationszentrums der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum) zugewiesen wurden, konnten wegen des fehlenden *follow-up* in der Studie nicht berücksichtigt werden. Deshalb konnten von mehr als 450 möglichen Spendern nur 100 Spender in die Studie eingeschlossen werden. Nach der Randomisation wurden keine Ausfälle beobachtet. Alle 100 randomisierten Spender konnten bis zum Endpunkt der Studie verfolgt werden.

2.2 Materialgewinnung und Verfahren zur Bestimmung der Zytokinspiegel im Spenderserum

Die 100 randomisierten Spender wurden zur Organentnahme begleitet. Zur Gewinnung von Spenderserum erfolgte eine Blutentnahme zu zwei definierten Zeitpunkten:

Zeitpunkt TP1:

Die Blutentnahme zum Zeitpunkt TP1 erfolgte nach Abschluss der Hirntoddiagnostik und Einwilligung zur Organspende auf der Intensivstation.

Zeitpunkt TP2:

Die Blutentnahme zum Zeitpunkt TP2 erfolgte direkt vor der Laparotomie zur Organentnahme.

Hierzu wurden 10 ml Blut des Spenders mit einer Einwegspritze entnommen und 10 min zur Gewinnung des Serums mit einer transportablen Zentrifuge (Capsulefuge, TOMY, Centrifuge PMC-060; TOMY KOGYO CO. LTD, Tokio, Japan) bei 5000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum durch Abpipettieren gleichmäßig auf 6 Nalgene-Röhrchen (Nalgene® Cryoware, Nalge Company, Rochester, NY, USA) verteilt und in flüssigem Stickstoff (Stickstoffbehälter: MVE SC4/2V, MVE Inc., Burnsville, MN, USA) bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C kryokonserviert.

2.2.1 Zytokin-Bestimmung durch Immunoassay

In den Spenderseren wurde die Konzentration der löslichen Zytokine IL-2R α , IL-6, IL-8, und TNF- α analysiert. Das Messprinzip bestand in einem Immunoassay. Die Bestimmung erfolgte automatisiert durch das Immunoassay-Messsystem Immulite[®] (DPC-Bühlmann GmbH, Salzburg, Österreich)

2.2.2 Cytometric Bead Array System (CBA)

Die Bestimmung der Konzentration der Zytokinmoleküle IL-2, IP-10 (CXCL10), IFN- γ , MCP-1 (CCL2) und IL-10 im Serum erfolgte mit Hilfe des BD Cytometric Bead Array System (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland).

In diesem Test wurden fluoreszierende Kunststoffkügelchen (Beads) verwendet, die mit spezifischen Antikörpern gegen die zu messenden Zytokine markiert waren. Die Beads wurden zusammen mit der zu analysierenden Probe sowie einem PE-konjugierten Zweitantikörper inkubiert. Die nachfolgend im Durchflusszytometer im PE-Messbereich bestimmte Fluoreszenzintensität der jeweiligen Beads ist proportional zur Menge des gebundenen Zytokins. Mit diesem Verfahren lassen sich gleichzeitig mehrere Zytokine bei geringen Probenvolumina (50 μ l) bestimmen. Die Zytokinkonzentrationen der jeweiligen Proben können im Vergleich zu standardisierten Konzentrationen quantifiziert werden. Der Test wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt und mit Hilfe der BD Cytometric Bead Array Software ausgewertet.

2.2.3 Bestimmung der Cortisol-Spiegel im Spenderserum

In den Spenderseren wurde zu den Zeitpunkten TP1 und TP2 der Cortisolspiegel und die Konzentration der Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 vorgenommen. Die Messungen erfolgten durch das Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, (Campus Virchow-Klinikum, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland) mit den dort etablierten Nachweisverfahren.

2.3 Organentnahme

Nach Abschluss der Hirntoddiagnostik und Einwilligung zur Organspende erfolgte die Vorbereitung zur Organentnahme durch Ärzte der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO). Die Organexplantation wurde durch Chirurgen der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum) im Auftrag der DSO durchgeführt. Sie erfolgte für beide Spendergruppen (Gruppe 1 und Gruppe 2) in gleicher Weise.

Die postmortale Mehrorganentnahme erfolgte dann in flacher oder leicht überstreckter Rückenlagerung mit abgespreizten Armen und nach ausgiebiger Desinfektion der Haut des Körperstammes. Als erstes wurde die komplette Sterno-Laparotomie mit Einsatz eines Thoraxspreizers durchgeführt. Nach Ligatur und Durchtrennung des Lig. teres hepatis und Inzision des Lig. falciforme bis etwa 2-3 cm an die V. cava bzw. an die Lebervenen erfolgte der Einsatz des Bauchdeckenspreizers.

2.3.1 Präparation im Abdomen

Die Präparation im Abdomen begann mit der Mobilisierung von Zöcum und Kolon ascendens sowie der rechten Kolonflexur und Ablösung des Mesenteriums von der Bauchrückwand bis zur A. mesenterica superior. Dann erfolgten die Mobilisierung von Duodenum und Pankreaskopf mit nachfolgendem Zurückschlagen des rechten Hemikolon und des gesamten Dünndarms, die abgangsnahe Durchtrennung der A. mesenterica inferior und die basisnahe Ablösung des Mesokolon. Danach erfolgten die Präparation des Lig. hepatoduodenale durch Umfahren des Ductus choledochus, die Durchtrennung der A. gastroduodenalis und Anschlingen der A. hepatica sowie die anschließende stumpfe Darstellung der Pfortader und ggf. das Anschlingen derselben. Als nächster Schritt erfolgte das Anschlingen der V. cava inferior. Nun wurde die Aorta knapp oberhalb der Bifurkation zweimal im Abstand von 2-3 cm frei gelegt und unterfahren. Gegebenenfalls erfolgte schon jetzt die Darstellung der Einmündung der linken Nierenvene in die V. cava. Die abdominelle Präparation endet mit dem Anschlingen der Aorta proximal des Truncus coeliacus.

2.3.2 Präparation im Thorax

Nach der Eröffnung des Herzbeutels und nach dem Hochnähen der Perikardränder wurde die obere Hohlvene freigelegt und unterfahren. Nachfolgend erfolgte die stumpfe Präparation zwischen Hohlvenenhinterwand und Vorderfläche des rechten Pulmonalisastes. Nach Heparinisierung und Vorlegen einer Tabaksbeutelnaht im Bereich der Aortenwurzel wurde eine Kanüle eingebracht und fixiert, die mit dem Behälter der Perfusionslösung konnektiert war. Bei einer Lungenentnahme wurde eine weitere Kanüle im Hauptstamm der A. pulmonalis platziert und fixiert.

2.3.3 Organperfusion

Danach erfolgte die Organperfusion. Als Perfusionslösungen wurden UW- oder HTK-Bretschneider-Lösung verwendet (UW: University of Wisconsin). Zur topischen Kühlung wurde eiskalte Kochsalzlösung in die Bauchhöhle eingebracht.

2.3.4 Entnahme der Leber (ohne Pankreas)

Vor der eigentlichen Entnahme der Leber erfolgte zunächst die makroskopische Beurteilung des Spenderorgans in situ. Hierbei wurden neben der Größe, Farbe, Konsistenz und Form der Leber bei Unsicherheiten der makroskopischen Abschätzung des Fettgewebsgehalts des Organs eine Schnellschnittdiagnostik eingeleitet (Fettgehalt > 30% bedeutet meist schlechte Funktion). Nach der Perfusion wurde die Leber entnommen.

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

Danach wurde die Leber entnommen und sofort in eiskalte Kochsalz- oder Ringer-Laktat-Lösung gelegt.

2.4 Auswahl der Organempfänger

Die Auswahl der geeigneten Empfänger erfolgt durch EUROTRANSPLANT (Leiden, Niederlande) gemäß dem dortigen standardisierten Allokationsverfahren. Nach Akzeptanz einer nach Größen und Gewicht passenden Spenderleber durch das Transplantationszentrum der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum) erfolgt nach entsprechenden organisatorischen Maßnahmen die Empfängeroperation als orthotope Lebertransplantation mit Pfortaderinterponat.

Im Folgenden werden nur die Organempfänger betrachtet, die im Rahmen der Studie eine Spenderleber aus der vorbehandelten Gruppe 1 oder aus der nicht vorbehandelten Gruppe 2 zugewiesen bekamen:

Gruppe 1:

Die Empfänger der Gruppe 1 erhielten Organe von Spendern (Gruppe 1), die mit Methylprednisolon vorbehandelt wurden.

Gruppe 2:

Die Empfänger der Gruppe 2 erhielten Organe von Spendern (Gruppe 2), die nicht vorbehandelt wurden.

2.5 Lebertransplantation

Die Organtransplantation erfolgte für beide Empfängergruppen gleich. Nach dem Einleiten einer tiefen Intubationsnarkose, der Lagerung des Organempfängers mit abgespreizten Armen in Rückenlage auf einem Operationstisch und der Desinfektion

der Haut des Körperstammes inklusive der linken Leistenregion und der Axilla gliederte sich die Transplantation in folgende Schritte:

2.5.1 Vorbereitung des venovenösen Bypasses

Zuerst erfolgte die Längsinzision der linken Leiste, dann die Darstellung der V. saphena magna bis zur Mündung der V. femoralis und anschließend die Präparation der V. brachialis/axillaris links über einen Längsschnitt im Bereich des Oberarms.

2.5.2 Vorbereitung zur Hepatektomie mit Anlage des Bypasses

Nun erfolgten die quere Oberbauchlaparotomie mit aufgesetztem medianen Längsschnitt zum Processus xiphoideus, eine weitere Inzision des Subkutangewebes bis auf die Muskelfaszien, die schrittweise Durchtrennung der Rectusmuskulatur, die Inzision der hinteren Rektusscheide und das Eröffnen der freien Bauchhöhle, die Durchtrennung der Bauchwand bis zu beiden Wundpolen, die Inzision der Mittellinie, das Umnähen der Hautlefen auf die vordere Thoraxwand und anschließendes Einbringen eines Retraktors. Daraufhin erfolgte die Mobilisierung der erkrankten Leber mittels Durchtrennung ligamentöser Strukturen (Lig. falciforme, Lig. triangulare sinistrum, Lig. hepatogastricum, Lig. teres hepatis, Lig. coronarium), Durchtrennung des Omentum minus und Hiluspräparation mit Darstellung und Absetzung von A. hepatica communis und Ductus hepaticus communis sowie das Darstellen und Anschlingen der Vena portae mit nachfolgender Präparation der suprahepatischen Vena cava inferior und anschließendem Anschlingen. Zur Anlage des extrakorporalen Bypasses erfolgte zunächst die Insertion eines Gott-Shunts über die V. saphena magna in die V. iliaca externa und über die V. brachialis bis in die V. subclavia und Fixierung mittels Tourniquets. Nach Inzision und Kanülierung der V. portae wurde ein gebogener Spiralshunt eingebracht, der Shunt fixiert und die V. portae lebernah abgesetzt. Nun erfolgten der Anschluss und die Entlüftung des Schlauchsystems mit nachfolgendem Beginn der extrakorporalen Zirkulation mit einem Fluss von ca. 2,5 l/min und einem Wärmetauscher, der das Blut auf etwa 36,5 – 37,0 °C erwärmt.

2.5.3 Hepatektomie

Nach Abklemmen der infra- und suprahepatischen V. cava und Durchtrennung dieser Strukturen erfolgte die schrittweise Exzision der Leber aus dem Situs unter Mitnahme der retrohepatischen V. cava. Anschließend wurde eine sorgfältige Blutstillung des Retroperitoneums mit Umstechung und Infrarotkoagulation vorgenommen.

2.5.4 Ex-Situ-Präparation des Transplantats

Die zeitgleiche *backtable*-Präparation umfasste die Darstellung der A. hepatica und des Truncus coeliacus mit Ligatur und Übernähung von Gefäßabgängen. Selten wurden akzessorische linke und/oder rechte Leberarterien gefunden. Die linke Leberarterie entspringt dann aus der A. gastrica sinistra, und wurde bei Entnahme, wenn möglich, in ihrer Kontinuität belassen. Häufig mussten hier kleine Gefäßabgänge aus der A. gastrica sinistra umstochen und ligiert werden. Eine akzessorische rechte Leberarterie entspringt häufig aus der A. mesenterica superior.

Im Bereich der V. cava wurden die Venenzuflüsse wie die rechte Nebennierenvene und die Zwerchfellvenen übernäht oder ligiert. Abschließend erfolgte die Präparation des Gallengangs. Falls bei der Entnahme keine Cholezystektomie erfolgte wurde diese nachgeholt.

2.5.5 Implantation

Dann wurde das Transplantat in den Bauchraum eingebracht. Es folgten die Anastomose der supra- und infrahepatischen V. cava mit Belassen einer Lücke in der Vorderwand der infrahepatischen V.-cava-Anastomose zum Ablassen des Perfusates, die Anastomose der A. hepatica und die Anastomose der V. portae mit nachfolgender Entfernung des portalen Bypasskatheters. Nach Anästhesievorbereitung erfolgte die simultane arterielle und portale Reperfusion, mit Drainage des Perfusates aus der infrahepatischen V. cava und anschließender Vervollständigung der Anastomose. Die Anastomose des Gallengangs wurde durch Seit-zu-Seit-Choledochocholedochostomie mit Einlage einer T-Drainage vollendet. Nachfolgend erfolgten die Einlage von Drainagen zum Abfluss von Wundsekret, sorgfältige Blutstillung um die Leber, im Retroperitoneum und abschließende Fibrinklebung. Danach wurde die Bauchdecke

schichtweise verschlossen. Das Platzieren eines sterilen Verbandes beendete die Operation.

2.6 Klinischer Verlauf nach Lebertransplantation

Zur Charakterisierung des postoperativen Verlaufs nach Lebertransplantation wurden die Organempfänger bis zu 6 Monate nach Transplantation nachbeobachtet. In diesem Zeitraum wurden regelmäßig klinische Parameter erhoben.

2.6.1 Biochemische Parameter

Durch tägliche Blutentnahmen beim Organempfänger innerhalb der ersten 10 postoperativen Tage wurde im Rahmen der klinische Routine die Konzentrationen folgender biochemischer Parameter im Empfängerblut ermittelt:

- Laktat
- Albumin
- Totales Bilirubin
- INR – International Normalized Ratio
- ALT – Alanin-Aminotransaminase
- AST – Aspartat-Aminotransaminase
- AP – Alkalische Phosphatase
- γ GT – Gamma-Glutamyltransferase
- GLDH – Glutamat-Dehydrogenase

Anschließend wurden die Blutentnahmen in regelmäßigen Abständen bis zu 6 Monaten nach Transplantation fortgesetzt. Die Messungen der Konzentrationen der biochemische Parameter erfolgten durch das Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, (Campus Virchow-Klinikum, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland) mit den dort etablierten Nachweisverfahren.

2.6.2 Quantifizierung der Galleproduktion

Durch intraoperative Einlage einer T-Drainage konnte der initiale Gallefluss ermittelt werden. Das Volumen der abgeleiteten Galle wurde innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Lebertransplantation gemessen.

2.6.3 Bestimmung der Rejektionsrate, ITBL und PNF

Bei Verdacht auf eine akute Rejektion und routinemäßig nach 6 Monaten wurden beim Empfänger sonographisch gestützte perkutane Leberbiopsien veranlasst. Die Proben wurden von qualifizierten Pathologen begutachtet und der Rejektionsgrad anhand der Banff-Klassifikation evaluiert [65].

Im Fall einer primären Non-Funktion (PNF) des Transplantats wurden die Ereignisse getrennt für beide Empfängergruppen dokumentiert.

Zur Diagnose einer ITBL (*ischemic-type biliary lesion*) wurde eine endoskopische retrograde Cholangiographie (ERC) veranlasst. Die Anzahl der beobachteten ITBL wurde registriert.

2.7 Statistische Methoden

Alle Daten wurden in Text, Tabellen und Abbildungen als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Zweistichproben normal verteilter Daten wurden mit dem *unpaired, two-tailed t-test* analysiert, nicht normal verteilte Daten mit dem *Mann-Whitney test*. Kategoriale (nominalskalierte) Variablen wurden als Zahlen verschlüsselt und mit Hilfe des *chi square test* oder *Fisher's exact test* statistisch untersucht.

Als signifikant wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ (zweiseitig) erachtet.

Eine Powerkalkulation (Type 1 Error (α) von 0,05; 80% Power) für AST zur Bestimmung einer mindestens 50%-Differenz zwischen den beiden Spendergruppen am 1. postoperativen Tag nach Lebertransplantation ergab eine Mindestanzahl von 40 Patienten je Gruppe. Diese Anforderung wurde erreicht.

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS® der Firma SPSS Inc. (Chicago, Illinois, USA).

3 Ergebnisse

Im Zeitraum von 2003 bis 2006 wurden im Transplantationszentrum der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum) 100 hirntote Spender aus dem Raum Berlin-Brandenburg in diese Studie eingeschlossen. Die Spender wurden prospektiv in zwei Gruppen randomisiert. Die Spender aus der Gruppe 1 wurden mit Methylprednisolon (Urbason®) vorbehandelt, die Spender aus der Gruppe 2 nicht.

3.1 Spender-Charakteristika

Variable	Gruppe 1 (n = 50)	Gruppe 2 (n = 50)
Spender-Geschlecht [M:W]	23:27	30:20
Spender-Alter [Jahre ± SD]	48 ± 16	47 ± 17
ITS-Aufenthalt [h ± SD]	105 ± 76	110 ± 103
Spender-Infektion [ja/nein]	0/50	0/50
Herzstillstand [ja/nein]	3/47	0/50
Hypotensive Periode [ja/nein]	5/45	0/50
Lebergewicht [g ± SD]	1756 ± 145	1699 ± 183
Konservierungszeit [min ± SD]	634 ± 121	601 ± 153

Tabelle 3.1: Spender-Charakteristika (SD : Standardabweichung)

In beide Gruppen wurden jeweils 50 Patienten randomisiert. Das mittlere Alter der Spender in der Gruppe 1, der mit Methylprednisolon vorbehandelten Spender, betrug 48 ± 16 Jahre. Das Geschlechterverhältnis männlicher Spender gegenüber weiblichen Spendern betrug $m:w = 23:27$ (siehe Tabelle 3.1).

Das mittlere Alter der Spender in Gruppe 2 mit den nicht vorbehandelten Spendern betrug 47 ± 17 Jahre. Das Geschlechterverhältnis männlicher Spender gegenüber weiblichen Spendern betrug in dieser Gruppe m:w = 30:20. Hierbei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Die Konservierungszeit, bestehend aus kalter und warmer Ischämiezeit, dauerte 634 ± 121 min in Gruppe 1 gegenüber 601 ± 153 min in Gruppe 2. Durchschnittlich befanden sich die Spender aus Gruppe 1 105 ± 76 Stunden auf der Intensivstation, die Spender aus Gruppe 2 hingegen 110 ± 103 Stunden. Das Gewicht der entnommenen Organe aus Gruppe 1 betrug durchschnittlich 1756 ± 145 g. Die Lebern aus Gruppe 2 wogen durchschnittlich 1699 ± 183 g. Auch diese Parameter (Konservierungszeit, ITS-Zeit, Lebergewicht) waren in beiden Gruppen statistisch gleichwertig.

Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede der Gruppe 1 gegenüber der Gruppe 2 fanden sich hinsichtlich der Anzahl hypotensiver Perioden (5 vs. 0), perioperativer Herzstillstände (3 vs. 0), Reanimationen und Spenderinfektionen (0 vs. 0) – definiert als Notwendigkeit einer Antibiotika-Therapie des Spenders. Auch das intensivmedizinische Management (Infusionen, Albumingabe, Gabe von Katecholaminen etc.) war in beiden Gruppen gleich.

3.2 Empfänger-Charakteristika

Variable	Gruppe 1 (n = 50)	Gruppe 2 (n = 50)
Empfänger-Geschlecht [M:W]	31:19	29:21
Empfänger-Alter [Jahre ± SD]	44 ± 14	43 ± 13
Konservierungszeit [min ± SD]	634 ± 121	601 ± 153
Warme Ischämiezeit [min ± SD]	43 ± 11	45 ± 9
Mittlerer MELD-Score	14,8	14,1
<i>Ätiologie end-stage liver disease</i>		
HCC	9	10
HCV	8	5
HBV	2	3
Alkoholtoxische Zirrhose	12	11
Kryptogen	6	5
Amyloidose	1	-
Oxalose	1	-
Budd-Chiari-Syndrom	1	1
Primär biliäre Zirrhose	2	2
Autoimmun	1	2
Primär sklerosierende Cholangitis	2	3
Sonstige	5	8

Tabelle 3.2: Empfängercharakteristika (SD : Standardabweichung)

Alle entnommenen Lebern wurden transplantiert, so dass 50 Patienten die Organe aus Gruppe 1 und 50 Patienten die Organe aus Gruppe 2 erhielten. Im Weiteren werden in

Gruppe 1 alle Empfänger betrachtet, die mit Methylprednisolon vorbehandelte Organe erhielten. Die Empfänger aus Gruppe 2 erhielten Organe, die nicht vorbehandelt wurden.

Die Geschlechterverteilung war in beiden Empfängergruppen (m:w = 31:19 in Gruppe 1 vs. m:w = 29:21 in Gruppe 2) statistisch gleich. Auch das mittlere Alter (44 ± 14 Jahre in Gruppe 1 vs. 45 ± 9 Jahre in Gruppe 2) unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 3.2).

Hinsichtlich des Stadiums der Lebererkrankung unterschieden sich die beiden Gruppen nicht. Der MELD-Score (*Model for End-stage Liver Disease*) war statistisch gleich in beiden Gruppen. Der durchschnittliche MELD-Score für Empfänger der Gruppe 1 betrug 14,8 gegenüber 14,1 für Empfänger der Gruppe 2.

Die häufigste Diagnose zur Lebertransplantation war in beiden Gruppen die alkoholtoxische Leberzirrhose (n=12 in Gruppe 1 vs. n=11 in Gruppe 2). Danach folgte das HCC mit 9 Empfängern in Gruppe 1 und 10 Empfängern in Gruppe 2. An dritter Stelle stand die HCV-Zirrhose mit 8 Empfängern in Gruppe 1 und 5 Empfängern in Gruppe 2. In absteigender Häufigkeit folgten die kryptogene Zirrhose (6 vs. 5), die HBV-Zirrhose (2 vs. 3), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) (2 vs. 3), die primär biliäre Zirrhose (PBC) (2 vs. 2), Autoimmunhepatitiden (1 vs. 2), das Budd-Chiari-Syndrom (1 vs. 1), Amyloidose (1 vs. 0) und die Oxalose (1 vs. 0).

Die intraoperative Zeit der Transplantatleber im Empfänger bis zur Vollendung der Gefäßanastomosen und Reperfusion, definiert als warme Ischämiezeit, war vergleichbar in beiden Gruppen (43 ± 11 min in Gruppe 1 vs. 45 ± 9 min in Gruppe 2).

3.3 Applizierte Medikamente

Die Spender aus Gruppe 1 erhielten bis zur Organexplantation eine Therapie mit Methylprednisolon (Urbason[®]) gemäß dem Studienprotokoll. Insgesamt wurden den Spendern aus Gruppe 1 durchschnittlich 1650 ± 142 mg Methylprednisolon appliziert. Die mittlere Behandlungszeit mit Methylprednisolon betrug 855 ± 137 min. Komplikationen im Zusammenhang mit der Methylprednisolon-Gabe wurden nicht beobachtet. Die Spender aus Gruppe 2 – der nicht vorbehandelten Gruppe – erhielten kein Methylprednisolon.

Das weitere intensivmedizinische Management hinsichtlich Infusionen, Albumin etc. war vergleichbar in beiden Gruppen ohne statistisch signifikante Unterschiede. In beiden Gruppen wurde Insulin verabreicht, wenn der Blutzuckerspiegel 250 mg/dl überstieg.

Das Regime zur Immunsuppression basierte in beiden Gruppen auf Tacrolimus oder Cyclosporin A erweitert um zusätzlich Mycophenolat-Mofetil (CellCept[®]) und Steroiden. Eine Induktionstherapie wurde bei keinem Empfänger beider Gruppen eingesetzt.

Die immunsuppressiven Regime unterschieden sich im Kurzzeit- und Langzeitverlauf in beiden Gruppen nicht signifikant voneinander. Das betraf sowohl die verabreichten Substanzen als auch die Dosierungen. Insbesondere gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Dosierung und des Einsatzes von Steroiden im postoperativen Verlauf nach der Transplantation.

3.4 Cortisol-Spiegel im Serum

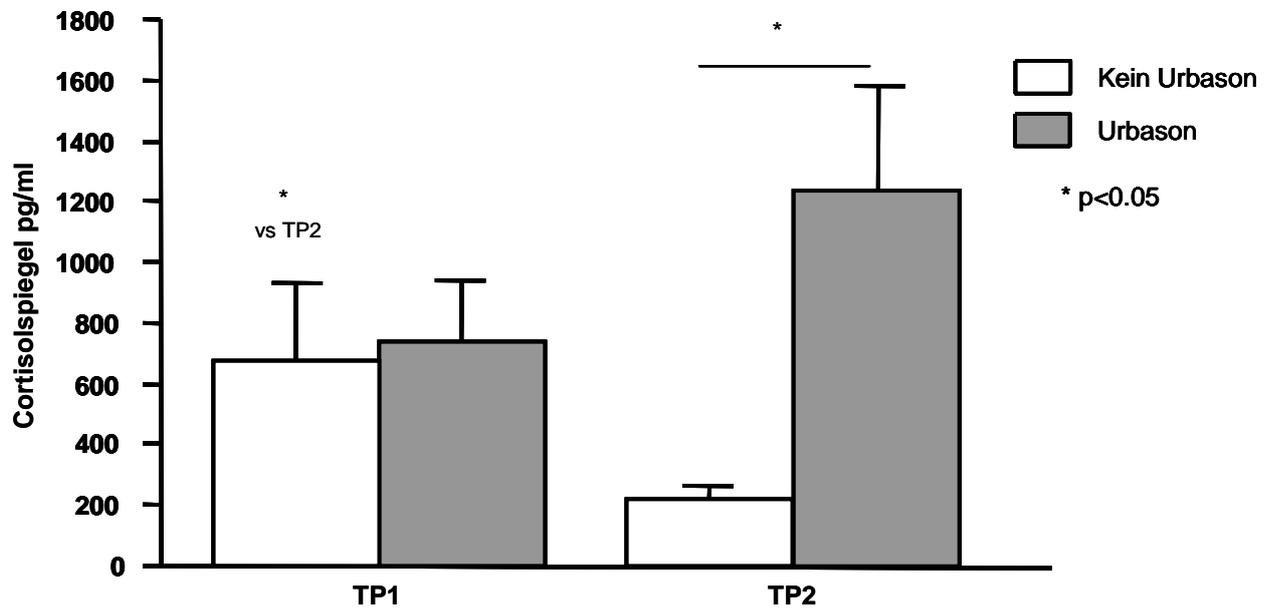


Abbildung 3.1: Cortisol-Spiegel im Serum

Zum Zeitpunkt nach Abschluss der Hirntoddiagnostik (TP1) war der Cortisol-Spiegel im Serum bei beiden Gruppen gleich (siehe Abbildung 3.1). Durch die anschließende Applikation von Methylprednisolon bis zur Explantation in der Gruppe 1 stieg der Cortisolspiegel hier bis zum Zeitpunkt der Explantation (TP2) signifikant an ($p < 0,05$). In der Gruppe 2 kam es hingegen zu einem signifikanten Abfall des Cortisol-Spiegels bis zu Explantation ($p < 0,05$). Zum Zeitpunkt der Explantation (TP2) war der Cortisol-Spiegel in der vorbehandelten Gruppe 1 deshalb signifikant höher als in der nicht vorbehandelten Gruppe 2 ($p < 0,05$).

Die Messung der Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 ergab hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen zu beiden Zeitpunkten.

3.5 Zytokin-Spiegel im Serum

Die Messung der Zytokin-Konzentrationen im Serum erfolgte zum Zeitpunkt nach Abschluss der Hirntoddiagnostik (TP1) und zu Beginn der Explantation (TP2). Zum Zeitpunkt TP1 waren bei den untersuchten Zytokinen die Konzentrationen gleich in der mit Methylprednisolon vorbehandelten Gruppe 1 und in der nicht vorbehandelten Gruppe 2.

3.5.1 IL-2-Spiegel im Serum

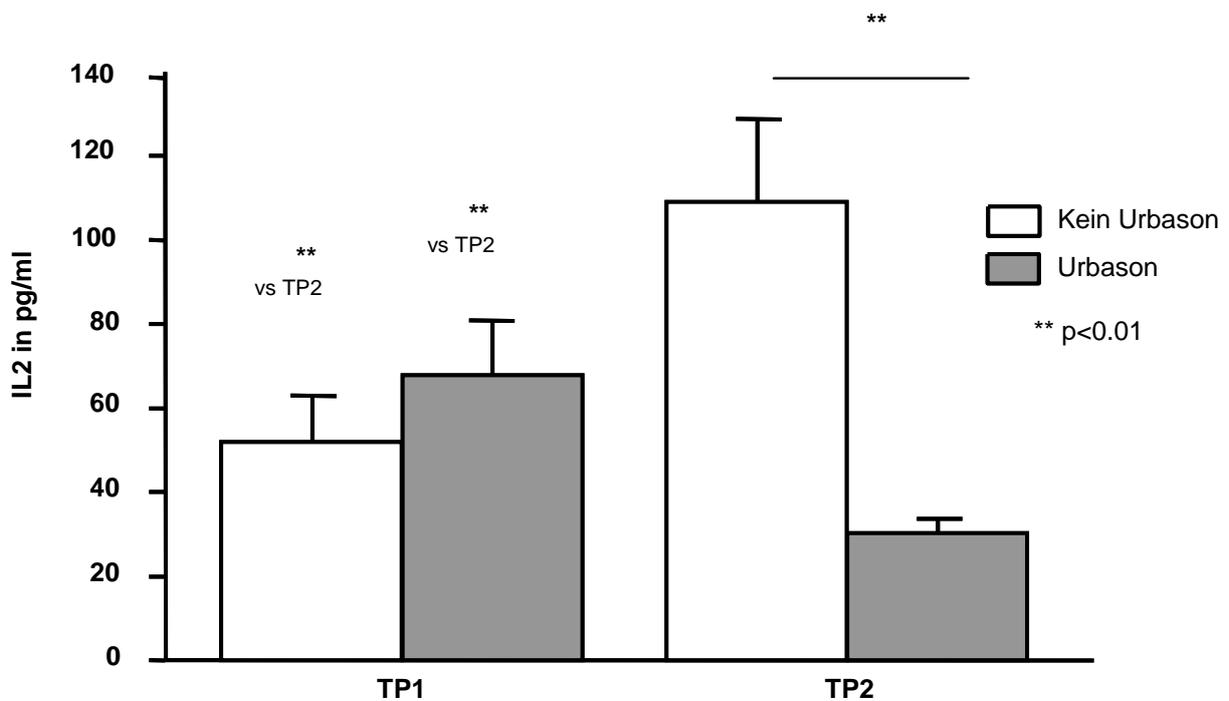


Abbildung 3.2: IL-2-Spiegel im Serum

Die Konzentration des Zytokins IL-2 war zum Zeitpunkt der Zustimmung zur Organspende (TP1) gleich in vorbehandelten und in der nicht vorbehandelten Spendergruppe (siehe Abbildung 3.2). Bei den Spendern der nicht vorbehandelten Gruppe 2 stieg der IL-2-Spiegel bis zur Explantation (TP2) signifikant an ($p < 0,01$). Bei den mit Methylprednisolon therapierten Spendern der Gruppe 2 kam es hingegen zu einem Abfall der IL-2-Konzentration im Serum ($p < 0,01$). Zu Beginn der Explantation

(TP2) war der Spiegel des Zytokin IL-2 deshalb deutlich verringert in der vorbehandelten Gruppe gegenüber der nicht vorbehandelten Spendergruppe ($p < 0,01$).

3.5.2 Konzentration des IL-2-Rezeptors im Serum

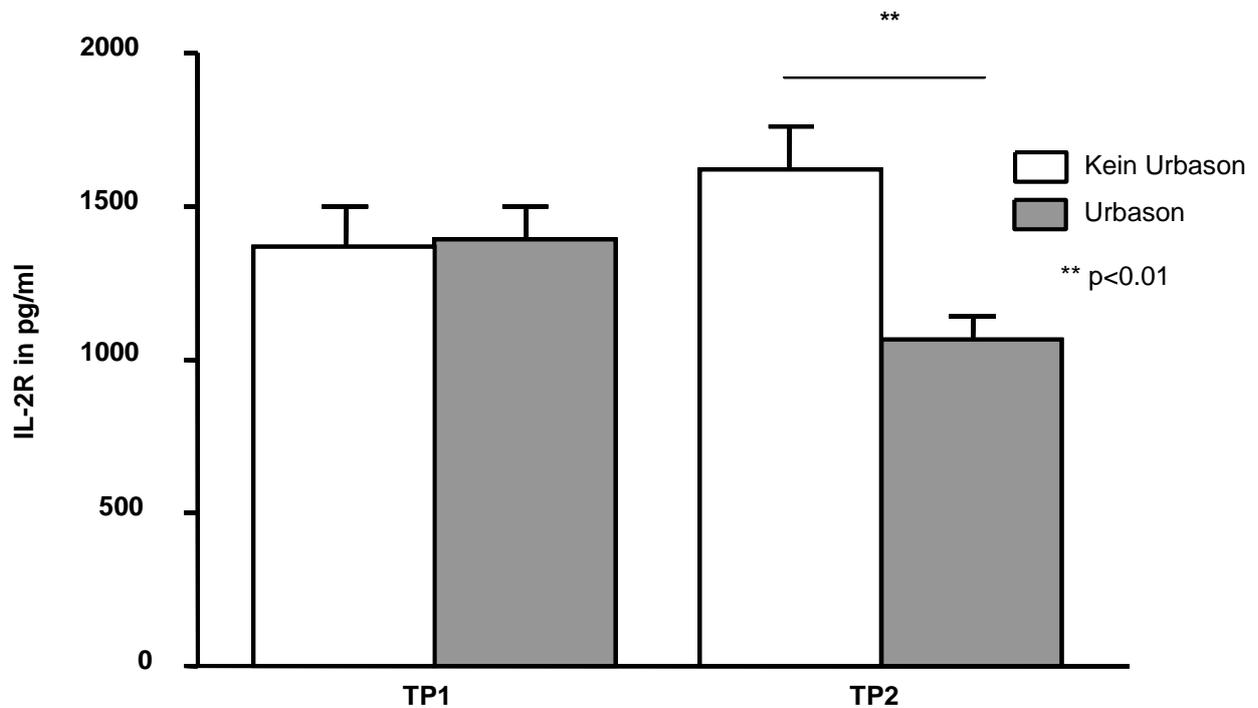


Abbildung 3.3: IL-2R α -Spiegel im Serum

Auch das Level der IL-2-Rezeptoren (IL-2 R α) im Serum war zum Zeitpunkt TP1 gleich in beiden Gruppen (siehe Abbildung 3.3). Nach Vorbehandlung der Spender in Gruppe 1 sank der IL-2-Rezeptor-Spiegel zur Explantation (TP2) ab, während die Konzentration des IL-2R α in der nicht vorbehandelten Spendergruppe anstieg. Folglich war der Spiegel des IL-2-Rezeptors zur Explantation in der vorbehandelten Gruppe 1 deutlich niedriger gegenüber der nicht vorbehandelten Spendergruppe 2 ($p < 0,01$).

3.5.3 IL-6-Spiegel im Serum

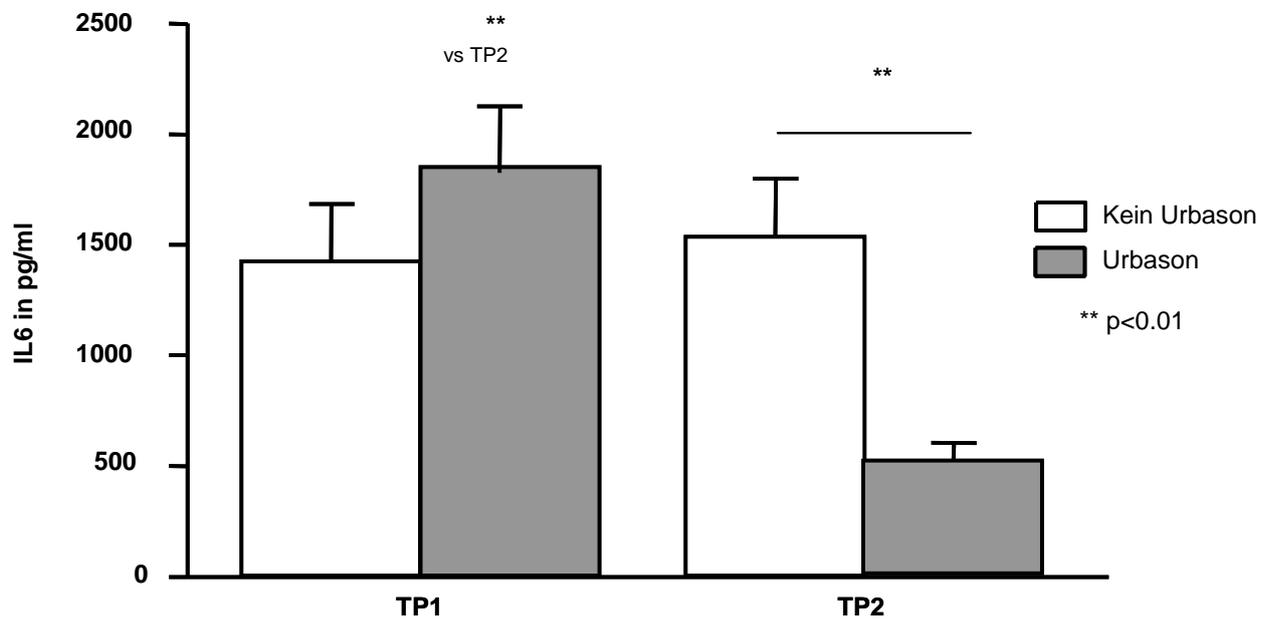


Abbildung 3.4: IL-6-Spiegel im Serum

Die gemessenen Konzentrationen des Zytokins IL-6 im Serum waren zum Zeitpunkt TP1 erneut in beiden Gruppen gleich (siehe Abbildung 3.4). Danach sank der IL-6-Spiegel bei den vorbehandelten Spendern bis zu Beginn der Explantation (TP2) signifikant ab ($p < 0,01$). Zur Explantation war der IL-6-Spiegel in der vorbehandelten Spendergruppe signifikant gegenüber den nicht vorbehandelten Spendern herabgesetzt ($p < 0,01$).

3.5.4 TNF- α -Spiegel im Serum

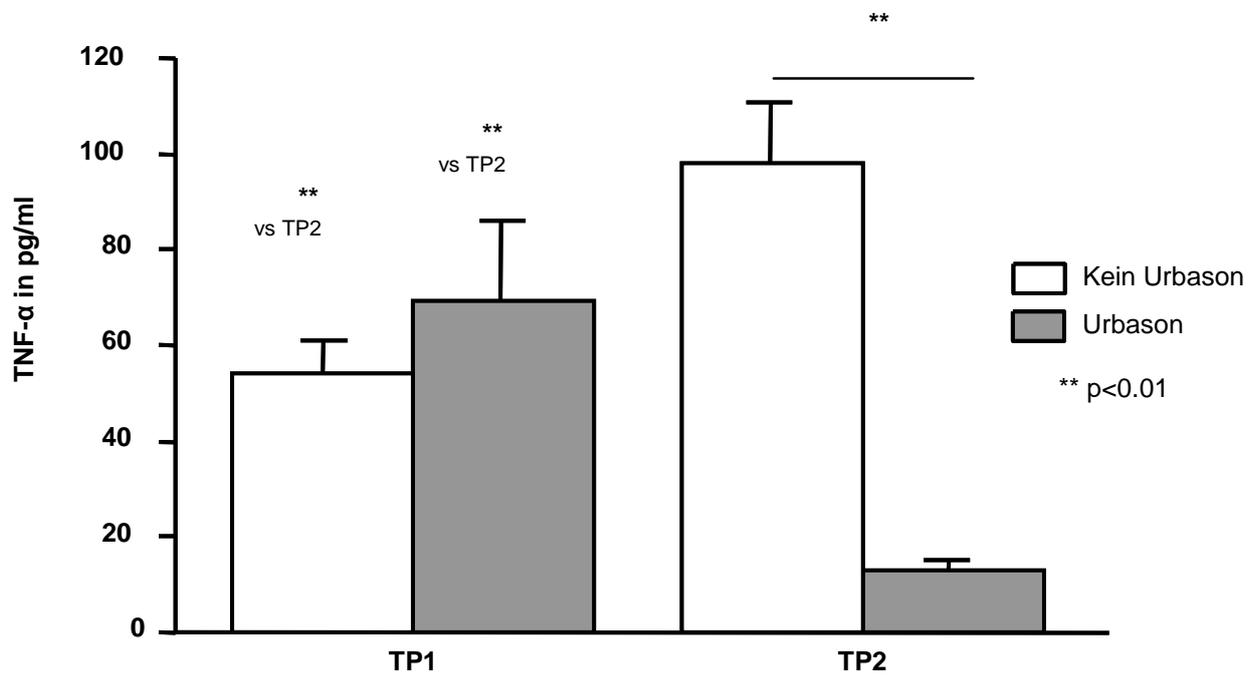


Abbildung 3.5: TNF- α -Spiegel im Serum

Die Konzentration des Zytokin TNF- α im Serum unterschied sich zum Zeitpunkt TP1 in beiden Gruppen nicht voneinander (siehe Abbildung 3.5). Nach Vorbehandlung der Spender in Gruppe 1 mit Methylprednisolon fiel die Konzentration von TNF- α zur Explantation (TP2) signifikant ab ($p < 0,01$), wohingegen der TNF- α -Spiegel bei den nicht vorbehandelten Spendern signifikant anstieg ($p < 0,01$). Zu Beginn der Organentnahme (TP2) war die Konzentration des TNF- α bei den Spendern der vorbehandelten Gruppe signifikant kleiner als bei den nicht vorbehandelten Spendern ($p < 0,01$).

3.5.5 MCP-1-Spiegel im Serum

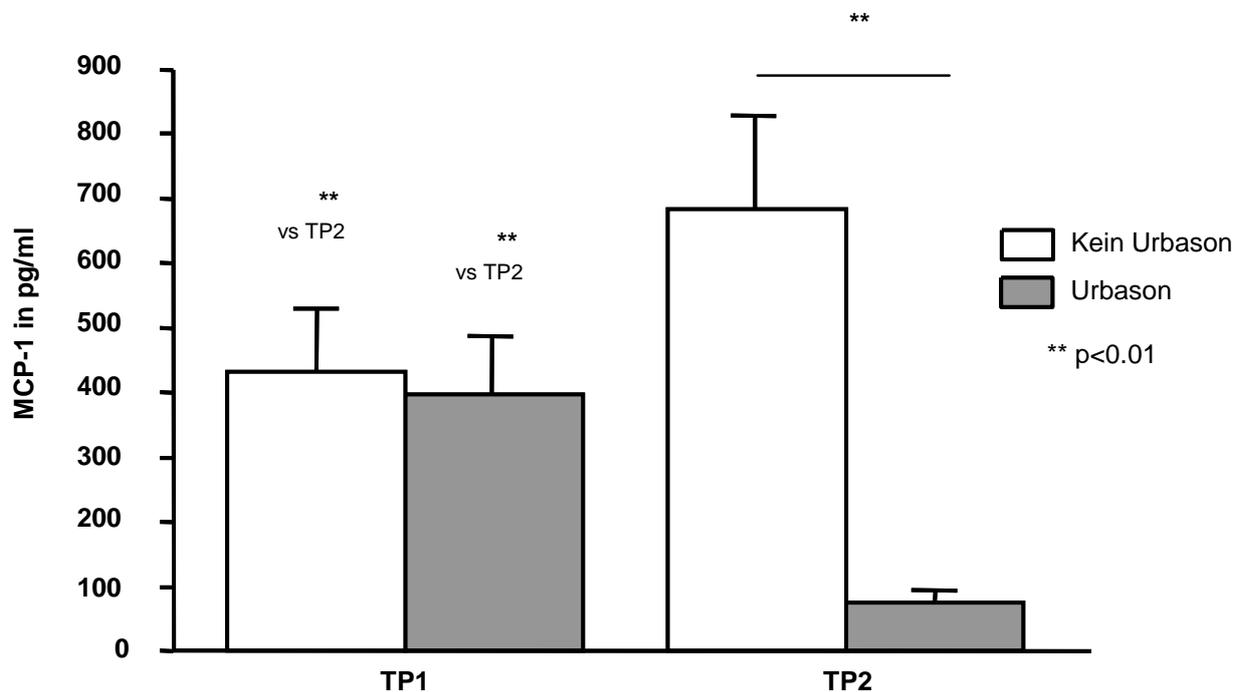


Abbildung 3.6: MCP-1-Spiegel im Serum

Die Messwerte der MCP-1-Spiegel im Serum waren zum Zeitpunkt (TP1) der Einwilligung zur Organspende in beiden untersuchten Spendergruppen identisch (siehe Abbildung 3.6). Bei den nicht vorbehandelten Spendern der Gruppe 2 stieg der MCP-1-Spiegel bis zum Zeitpunkt der Explantation (TP2) signifikant an ($p < 0,01$), während die Konzentration von MCP-1 in der vorbehandelten Spendergruppe signifikant absank ($p < 0,01$). Daraus ergab sich vor Beginn der Organentnahme eine deutlich niedrigere MCP-1-Konzentration bei den vorbehandelten Spendern der Gruppe 1 gegenüber den nicht vorbehandelten Spendern der Gruppe 2 ($p < 0,01$).

3.5.6 IP-10-Spiegel im Serum

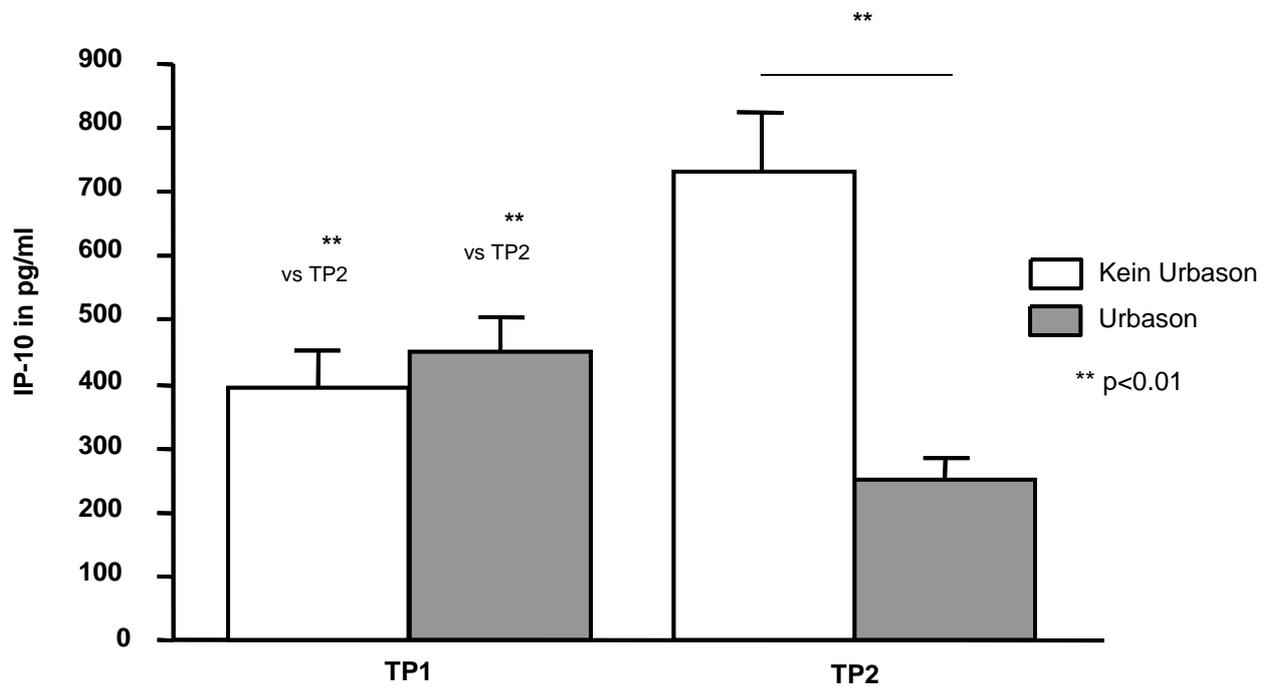


Abbildung 3.7: IP-10-Spiegel im Serum

In Bezug auf die Serumkonzentration des Zytokins IP-10 fand sich ein analoges Verlaufsmuster wie bei den vorher betrachteten Zytokinen (siehe Abbildung 3.7). Zum Zeitpunkt der Zustimmung zur Organspende (TP1) waren die Konzentrationen von IP-10 bei den vorbehandelten und bei den nicht vorbehandelten Spendern gleich. Im Folgenden stieg der IP-10-Spiegel bei der nicht vorbehandelten Spendergruppe an, so dass der Spiegel vor der Organentnahme (TP2) signifikant gegenüber dem Zeitpunkt TP1 erhöht war ($p < 0,01$). Bei der vorbehandelten Spendergruppe fiel der IP-10-Spiegel ab, so dass der Spiegel vor der Explantation (TP2) gegenüber dem Zeitpunkt TP1 signifikant erniedrigt war ($p < 0,01$). Dementsprechend war die IP-10-Konzentration zu Beginn der Organentnahme (TP2) bei den vorbehandelten Spendern der Gruppe 1 im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Spendern der Gruppe 2 deutlich kleiner ($p < 0,01$).

3.5.7 Konzentrationen der Zytokine IL-8, IL-10 und IFN- γ

Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen fanden sich bei den Konzentrationen der Zytokine IL-8, IL-10 und IFN- γ zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den beiden Spendergruppen.

3.6 Initiale Organfunktion und Rejektionsrate nach Lebertransplantation

Zur Charakterisierung der Organfunktion nach der Transplantation der Spenderlebern wurden unterschiedliche laborchemische Parameter und klinische Parameter wie die Galleproduktion und die Rejektionsrate untersucht.

3.6.1 Biochemische Parameter

Parameter	Gruppe 1 (Urbason)	Gruppe 2 (Ø Urbason)	p-Wert
AST Tag 1 [IU/l ± SD]	327 ± 53	1470 ± 314	0,0132
AST Tag 10 [IU/l ± SD]	31 ± 5	41 ± 7	0,033
ALT Tag 1 [IU/l ± SD]	461 ± 110	758 ± 213	0,9045
ALT 10 Tag [IU/l ± SD]	76 ± 12	115 ± 18	0,1063
γGT Tag 10 [IU/l ± SD]	135 ± 25	236 ± 35	0,0130
γGT 6 Monate [IU/l ± SD]	30 ± 3	40 ± 7	0,3893
AP Tag 10 [IU/l ± SD]	176 ± 25	190 ± 22	0,4281
AP 6 Monate [IU/l ± SD]	128 ± 19	158 ± 23	0,2234
GLDH Tag 3 [IU/l ± SD]	192 ± 41	644 ± 406	0,8833
GLDH 6 Monate [IU/l ± SD]	4,2 ± 0,9	8 ± 5	0,8612

Tabelle 3.3: Biochemische Serumparameter nach Lebertransplantation (SD: Standardabweichung)

Die Konzentration der klinisch wichtigen Transaminase AST (GOT) war am 1. postoperativen Tag nach der Transplantation im Serum des Empfängers in der Gruppe der vorbehandelten Spender signifikant niedriger als die AST-Konzentration bei den Empfängern in der Gruppe der nicht vorbehandelten Organe (327 ± 53 IU/l vs.

1470 ± 314 IU/l; $p < 0,05$) (siehe Tabelle 3.3 und Abbildung 3.8). Auch am 10. postoperativen Tag war der Spiegel der AST im Serum der Empfänger mit den vorbehandelten Organen kleiner im Vergleich zu der AST-Konzentration bei den Empfängern von Organen der nicht vorbehandelten Spender (31 ± 5 IU/l vs. 41 ± 7 IU/l; $p < 0,05$).

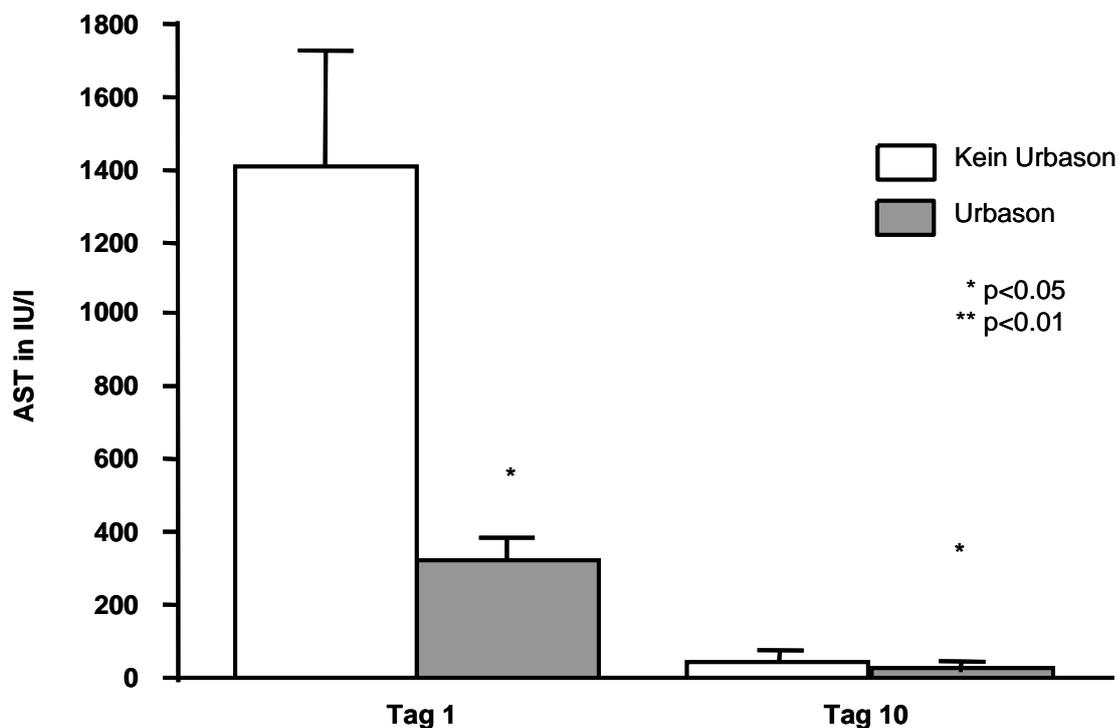


Abbildung 3.8: AST (GOT) am Tag 1 und Tag 10 nach Lebertransplantation

Die γ GT im Serum als Marker für biliäre Schäden war am 10. postoperativen Tag signifikant bei den Empfängern von vorbehandelten Organen gegenüber den Empfängern von nicht vorbehandelten Organen erniedrigt (135 ± 25 IU/l vs. 236 ± 35 IU/l; $p < 0,05$) (siehe Tabelle 3.3 und Abbildung 3.9). Sechs Monate nach Transplantation zeigte sich ebenfalls ein Trend zu niedrigeren γ GT-Konzentrationen in der vorbehandelten Gruppe (30 ± 3 IU/l vs. 40 ± 7 IU/l), allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant.

Auch bei den Serumkonzentrationen der Enzyme ALT, AP und GLDH zeigte sich zu den einzelnen Untersuchungszeiten eine Tendenz zu kleineren Serumkonzentrationen bei Empfängern von vorbehandelten Organen im Gegensatz zu Empfängern von nicht vorbehandelten Organen (siehe Tabelle 3.3). Jedoch erreichte die Differenz hier keine Signifikanz.

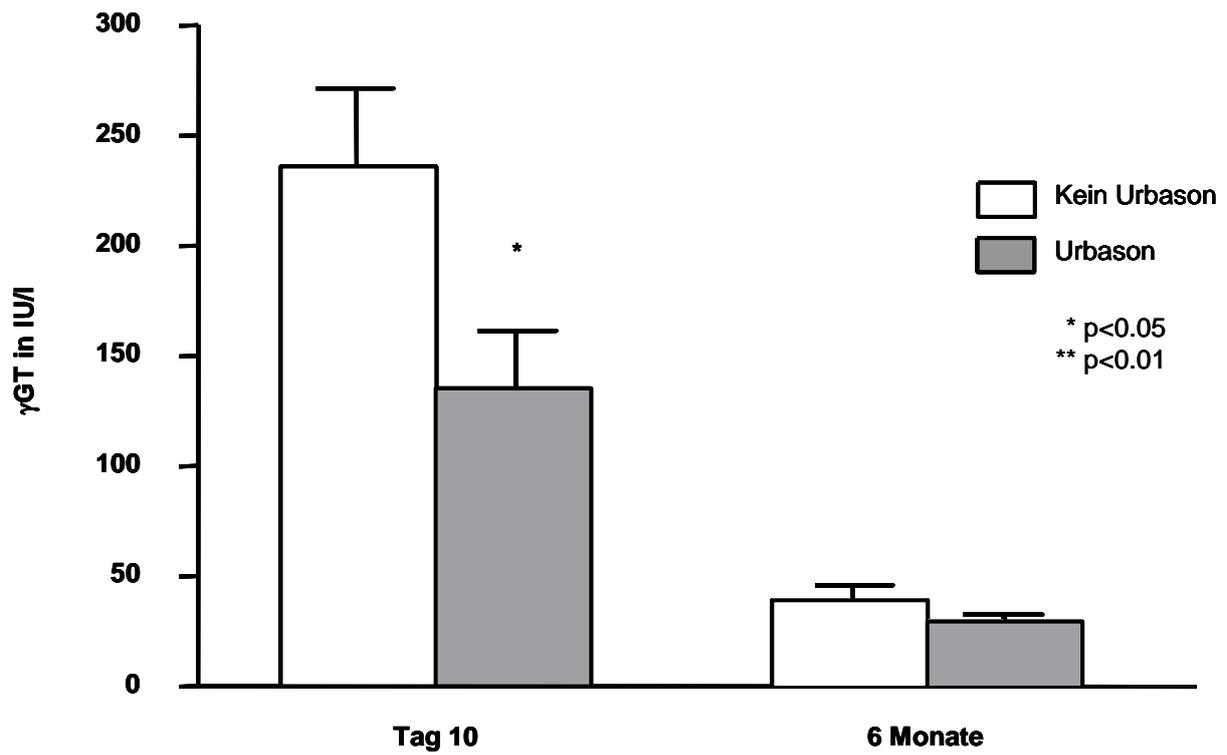


Abbildung 3.9: γ GT am Tag 10 und nach 6 Monaten nach Lebertransplantation

Nicht signifikant verschieden waren ebenso die Konzentration von Laktat, Albumin sowie die INR zwischen beiden Empfängergruppen.

3.6.2 Galleproduktion und Bilirubin-Spiegel nach Lebertransplantation

Parameter	Gruppe 1 (Urbason)	Gruppe 2 (Ø Urbason)	p-Wert
Totales Bilirubin Tag 10 [mg/dl]	2,3 ± 0,4	4,9 ± 1,0	0,045
Totales Bilirubin 6 Monate [mg/dl]	0,68 ± 0,06	1,03 ± 0,08	0,0021
Gallefluss in 24h [ml]	144 ± 23	109 ± 26	0,1543

Tabelle 3.4: Galleproduktion und Bilirubin nach Lebertransplantation (±SD : Standardabweichung)

Das Bilirubin im Serum ist ein Indikator für die Abbauleistung der Leber. Zehn Tage nach der Transplantation war die Konzentration des totalen Bilirubins mit $2,3 \pm 0,4$ mg/dl signifikant niedriger in der Empfängergruppe mit den vorbehandelten Organen ($p < 0,05$) gegenüber $4,9 \pm 1,0$ mg/dl bei den Empfängern mit nicht vorbehandelten Organen (siehe Tabelle 3.4 und Abbildung 3.10).

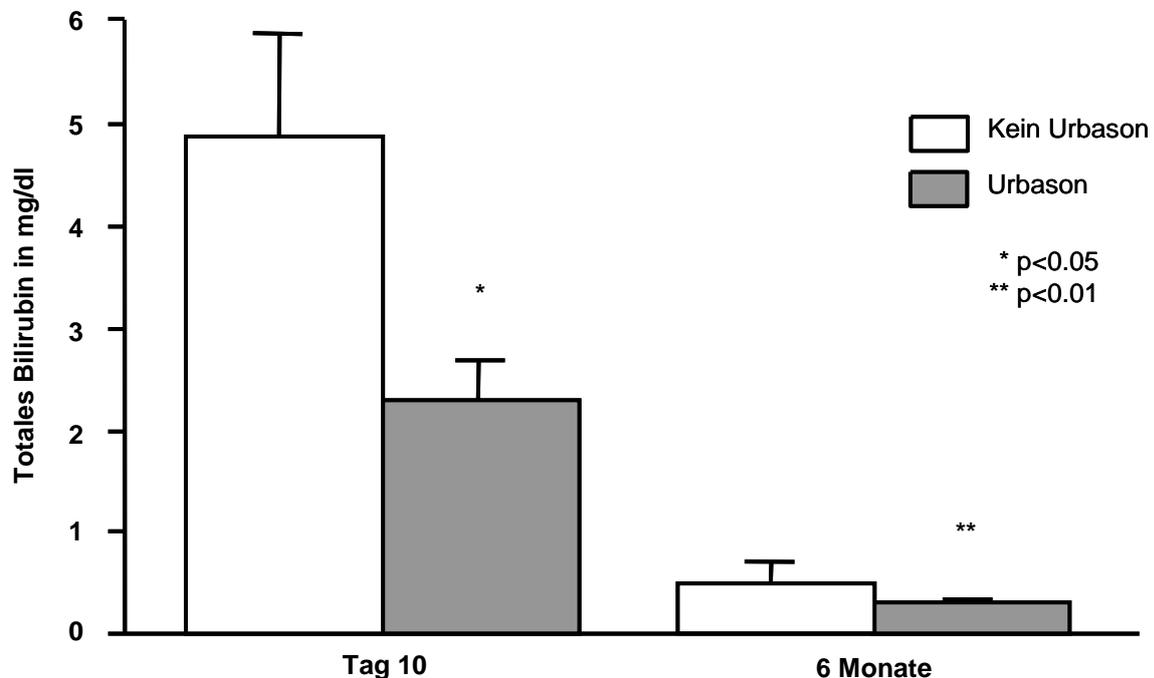


Abbildung 3.10: Bilirubin im Serum nach Transplantation

Auch 6 Monate nach der Transplantation war das totale Bilirubin im Empfängerserum bei der Gruppe 1 mit den Organen von vorbehandelten Spendern geringer als in der Gruppe 2 mit Organen von nicht vorbehandelten Spendern ($0,68 \pm 0,06$ mg/dl vs. $1,03 \pm 0,08$ mg/dl; $p < 0,01$) (siehe Tabelle 3.4 und Abbildung 3.10).

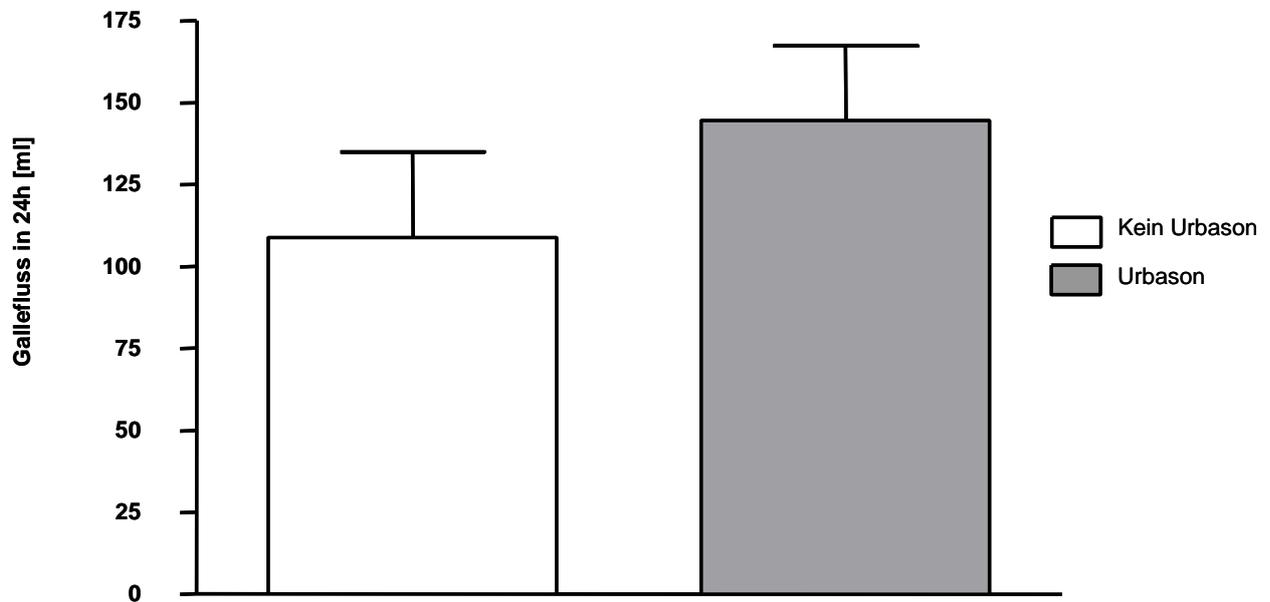


Abbildung 3.11: Initialer Gallefluss innerhalb von 24 Stunden nach Lebertransplantation

Hinsichtlich der initialen Galleproduktion in den ersten 24 Stunden nach der Lebertransplantation fand sich ein Trend zu einer höheren Galleproduktion bei der Empfängergruppe mit den vorbehandelten Organen gegenüber der Empfängergruppe mit Organen von nicht vorbehandelten Spendern. Dieses Ergebnis verfehlte jedoch das Signifikanzniveau (siehe Tabelle 3.4 und Abbildung 3.11).

3.6.3 ITBL und Rejektionsrate nach Transplantation

Parameter	Gruppe 1 (Urbason)	Gruppe 2 (Ø Urbason)	p-Wert
Primäre Non-Funktion	2 (4%)	3 (6%)	<0,05
ITBL in 6 Monaten	2 (4%)	5 (10%)	
Rejektionen in 6 Monaten	11 (22%)	19 (38%)	
Grad Ia	6	9	
Grad Ib	4	4	
Grad IIa	-	5	
Grad IIb	1	1	

Tabelle 3.5: PNF, ITBL und Rejektionen innerhalb von 6 Monaten nach Transplantation

Die Zahl der histologisch gesicherten akuten Rejektionen war in der Gruppe 2 mit Empfängern von nicht vorbehandelten Organen deutlich höher als in der Gruppe 1 mit Empfängern von vorbehandelten Organen (38% vs. 22%; $p < 0,05$) (siehe Tabelle 3.5). Außerdem zeigte sich eine Tendenz zu schwereren, höhergradigen Rejektionen in der Gruppe 2 ohne Methylprednisolon. Die Anzahl von Rejektionen mit einem Grad IIa und IIb betrug $n=6$ (12%) in der Gruppe 2 gegenüber $n=1$ (2%) in der Gruppe 1. Ebenso wurde eine höhere Rate an ITBL (*ischemic-type biliary lesions*) und an primären Non-Funktionen (PNF) der transplantierten Lebern bei Empfängern mit nicht vorbehandelten Organen festgestellt. Diese Ergebnisse waren aber nicht signifikant.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht erstmalig im Rahmen einer prospektiv randomisierten klinischen Studie den Einfluss einer Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon zwischen Hirntod und Organentnahme auf die Organqualität und die Organfunktion nach Transplantation.

Für die Ausbildung einer Organdysfunktion nach Transplantation wurde eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert. Dazu zählen Antigen-abhängige Faktoren wie die fehlende HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger sowie Antigen-unabhängige Faktoren wie Spenderalter und Spender-assoziierte Erkrankungen. Erst in den letzten Jahren rückte der Hirntod als wichtiger Antigen-unabhängiger Faktor in den Mittelpunkt tierexperimenteller und klinischer Forschung.

4.1 Der Hirntod als Antigen-unabhängiger Risikofaktor

Infolge des Hirntods kommt es im Spender zu Gleichgewichtsverschiebungen auf verschiedenen Ebenen. Hämodynamische, hormonelle und immunologische Veränderungen wurden beschrieben [14, 15].

4.1.1 Hormonelle Veränderungen infolge des Hirntods

Im Rahmen des Hirntods entwickelt sich auf hormoneller Ebene vor allem eine Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Verminderte Vasopressin-Spiegel bewirken einen Diabetes insipidus, der zu einer Polyurie und unbehandelt zur Hypovolämie und zu schweren Elektrolyt-Entgleisungen führen kann [66].

Über den Verlauf von TSH und den Schilddrüsenhormonen T3/T4 variieren die Angaben in der Literatur. AMADO und RABANAL et al. berichten von erniedrigten TSH, fT4 und T3 Werten infolge des Hirntods [67, 68]. Im Gegensatz dazu sahen andere Arbeitsgruppen wie LOPAU et al. keine signifikanten Veränderungen der Schilddrüsenhormone und des TSH [33]. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Studie

zeigen bei den unbehandelten Spendern keine signifikanten Veränderungen der T3/T4-Spiegel zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten.

Weitere hormonelle Veränderungen betreffen die Cortisolregulation. DIMOPOULOU et al. und andere Autoren beschreiben einen signifikant erniedrigten Cortisolspiegel bei hirntoten Spendern infolge einer verringerten adrenalen Cortisolausschüttung [69]. Die Resultate dieser Studie stützen diese Ergebnisse. Bei den nicht vorbehandelten Spendern konnte im Verlauf vom Abschluss der Hirntoddiagnostik (TP1) bis zur Organentnahme (TP2) ein signifikanter Abfall des Cortisolspiegels um 66% nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.1).

Eine Substitution des depletierten Cortisols ist neben der wahrscheinlich bedeutenderen anti-inflammatorischen Wirkung eine Rationale für eine Steroidtherapie des hirntoten Spenders.

4.1.2 Immunologische Veränderungen infolge des Hirntods

Aufgrund des Hirntods entwickeln sich weit reichende immunologische Veränderungen, die in ihrer Summe zu einer immunologischen Aktivierung des Organs führen. Daran beteiligt sind verschiedene Zytokine, die in unterschiedlicher Weise das Immunsystem beeinflussen. Hierzu zählen Interleukine, Chemokine, Tumornekrosefaktoren und Interferone, von denen folgende in dieser Arbeit untersucht wurden:

Interleukin-2 (IL-2):

IL-2 ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin. IL-2 wird im Rahmen der Immunantwort von T-Zell-Lymphozyten (TH1) ausgeschüttet. Es bewirkt die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und natürlichen Killerzellen [70].

Interleukin-6 (IL-6):

Das IL-6 ist einer der wichtigsten Mediatoren der Akute-Phase-Reaktion und nimmt dort eine Schlüsselstellung ein. IL-6 wird vor allem von Makrophagen und T-Zellen gebildet und bewirkt in der Leber die vermehrte Bildung von Akute-Phase-Proteinen. Außerdem stimuliert IL-6 die Differenzierung von B-Zellen zu Plasma-Zellen und deren Antikörperbildung [71].

Interleukin-8 (IL-8):

IL-8 (CXCL8) ist ein Chemokin, das unter anderem von Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen und Fibroblasten produziert wird. Es wirkt vor allem auf neutrophile Granulozyten und stimuliert diese durch Chemotaxis zur Migration. Außerdem erhöht IL-8 die Expression von Adhäsionsmolekülen an Endothelien [72].

Interleukin-10 (IL-10):

IL-10 ist ein Zytokin, das vor allem anti-inflammatorische Wirkungen besitzt. Es hemmt unter anderem die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-2 und IL-6. Außerdem wird die Antigenpräsentation von Antigen-präsentierenden Zellen gehemmt und die T-Zell-Antwort hin zu TH2-Zellen gelenkt. IL-10 wird primär von Monozyten ausgeschüttet [73].

Tumornekrosefaktor- α (TNF- α):

TNF- α steht als Zytokin am Anfang der Immunreaktion. TNF- α verursacht durch seine vielfältigen Wirkungen eine Kaskade, die im Körper zur Initiierung lokaler und systemischer Entzündungsreaktionen führt. Es wird hauptsächlich durch Makrophagen gebildet und freigesetzt. TNF- α bewirkt in der Leber die vermehrte Produktion von Akute-Phase-Proteinen. Es verstärkt die Phagozytose, fördert die Migration von neutrophilen Granulozyten und kann Apoptosen einleiten [74].

Interferon- γ (IFN- γ):

Das Zytokin IFN- γ wird hauptsächlich von TH1-Zellen gebildet. IFN- γ wirkt unter anderem auf Makrophagen und bewirkt dort eine Steigerung der Phagozytose sowie eine vermehrte Antigenpräsentation [75].

MCP-1:

MCP-1 (CCL2) ist ein Chemokin. Es bewirkt durch Chemotaxis eine vermehrte Migration von Monozyten und T-Zellen ins Gewebe [76, 77].

IP-10:

Das Chemokin IP-10 (CXCL10) wird nach Induktion durch IFN- γ von verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet. IP-10 fördert durch

Chemotaxis die Migration von Monozyten, T-Zellen und dendritischen Zellen und unterstützt die T-Zell-Adhäsion an Endothelzellen [77, 78].

Die immunologischen Auswirkungen des Hirntods anhand der Zytokine wurden bereits weltweit von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Arbeiten am Tiermodell und klinische Untersuchungen zu den transplantationsmedizinisch relevanten Organen wie Nieren, Leber, Herz und Lunge wurden publiziert.

PRATSCHKE et al. etablierten ein Hirntodmodell für Ratten, durch das umfangreiche Tierversuche zu den Auswirkungen des Hirntods realisiert werden konnten [79]. Anhand dieses Modells konnten TAKADA et al. erhöhte Zytokinspiegel und eine erhöhte Expression von Zytokinen anhand ihrer mRNA-Spiegel messen. Gezeigt werden konnten mit zunehmendem zeitlichen Abstand zum Hirntod kontinuierlich wachsende Zytokinspiegel für IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α und IFN- γ [49]. In guter Korrelation dazu waren die mRNA-Spiegel der entsprechenden Zytokine in den peripheren Organen erhöht [49].

VAN DER HOEVEN et al. konnten in mehreren Versuchsreihen bei Rattenlebern und Rattennieren hirntoter Tiere eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 sowie von MHC-II zeigen [44-47].

SEGEL et al. untersuchten die Expression inflammatorischer Marker in Herzen hirntoter Ratten. Sie fanden eine signifikante Überexpression für IL-1 β , IL-6, VCAM-1 und ICAM-1. Im Gegensatz zu vorherigen Untersuchungen aber keine Erhöhung für TNF- α , IL-2, IL-2R β und MCP-1 [41].

Anhand des Vergleiches von humanen Nierentransplantaten hirntoter Spendern mit Lebendspenden zeigten KOO et al. auch im Menschen eine erhöhte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 [13]. JASSEM aus derselben Arbeitsgruppe konnte die Resultate an humanen Lebertransplantaten von hirntoten Spendern verifizieren [43].

Im Menschen konnte WEIß aus der Arbeitsgruppe PRATSCHKE et al. durch den Vergleich von hirntoten Leberspendern mit Leberlebendspenden vor der Organentnahme ebenfalls eine Erhöhung inflammatorischer Marker infolge des Hirntods zeigen. In der Leber hirntoter Spender fanden sich eine Hochregulation von IL-6, IL-10, TGF- β , IL-4 und IFN- γ . Analog waren die Serumkonzentrationen der Zytokine IL-6 und IL-10 in guter Korrelation zu den entsprechenden mRNA-Expressionen erhöht. Im Gegensatz dazu und entgegen den Erkenntnissen aus dem Tiermodell fand sich aber kein signifikanter

Unterschied des Serumspiegels für TNF- α zwischen hirntoten Spendern und Leberlebendspendern [17].

In der vorliegenden Arbeit können ebenfalls ansteigende Zytokinspiegel infolge des Hirntods bestätigt werden. Werden nur die nicht vorbehandelten Spender der Gruppe 2 betrachtet, so zeigt sich mit zunehmender Dauer des Hirntods eine Erhöhung der Zytokinspiegel im Serum. Der Vergleich der Zytokinspiegel zum Zeitpunkt der Organentnahme (TP2) mit dem vorherigen Spiegel nach Abschluss der Hirntoddiagnostik (TP1) liefert einen signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-2 und TNF- α sowie der Chemokine MCP-1 und IP-10 (siehe Abbildung 3.2 bis Abbildung 3.7).

Der Anstieg proinflammatorischer Zytokine und Chemokine nach dem Hirntod spricht für eine zunehmende immunologische Aktivierung des hirntoten Spenders. IL-2 bewirkt eine verstärkte T-Zell-Aktivierung und eine verstärkte Rekrutierung von natürlichen Killerzellen in den Organen. TNF- α verursacht eine systemische Inflammationsreaktion mit einer stimulierenden Wirkung auf Monozyten und auf neutrophile Granulozyten. Die vermehrte Ausschüttung der Chemokine MCP-1 und IP-10 ist durch ihre chemotaktische Wirkung ein guter Indikator für eine zunehmende Migration von aktivierten Monozyten und T-Zellen in das Organewebe.

Tatsächlich konnten JASSEM et al. und KOO et al. immunhistologisch eine vermehrte Organinfiltration mit CD3-positiven Lymphozyten (T-Zellen) und CD68-positiven Monozyten/Makrophagen noch vor der Transplantation nachweisen [13, 48, 80]. Zusätzlich zeigten VAN DER HOEVEN et al. eine verstärkte Gewebeeinfiltration mit CD45-positiven Leukozyten (Granulozyten) und CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen [45-47]. Im Zusammenhang mit diesen immunologischen Veränderungen können infolge des Hirntods bereits vor der Explantation Organschäden entstehen, wie VAN DER HOEVEN et al. am Beispiel der Rattenleber berichteten [16, 24, 45].

Die Organe eines hirntoten Spenders sind durch eine höhere Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E- und P-Selektin etc.) und Zytokinen (IL-2, IL-6, TNF- α etc.), einen verstärkten Besatz mit Antigen-präsentierenden MHC-II-Molekülen und durch eine Infiltration mit Entzündungszellen gekennzeichnet. Die Summe dieser Vorgänge bewirkt eine immunologische Aktivierung der Transplantorgane noch vor der Transplantation.

4.1.3 Einfluss des Hirntods auf den klinischen Verlauf nach Transplantation

Die vermehrte immunologische Aktivierung der Organe hirntoter Spender induziert nach der Transplantation eine verstärkte Immunantwort des Empfängers. Deshalb lassen sich in der frühen Phase nach der Transplantation im Empfänger erhöhte Zytokinspiegel, eine erhöhte Expression proinflammatorischer Marker (Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle) und eine erhöhte Infiltration der Organe mit Entzündungszellen beobachten. In mehreren Versuchsreihen untersuchten PRATSCHKE und KUSADA et al. im Rattenmodell die immunologischen Veränderungen nach der Transplantation von Organen hirntoter Spender im Vergleich zu Lebendspendern. In Nierentransplantaten waren die mRNA-Expression für die Marker IL-1 β , TNF- α , TGF- β , MCP- 1 und ICAM-1 hochreguliert. Zusätzlich fand sich eine vermehrte Infiltration der Transplantate mit Monozyten, T-Zellen und Granulozyten nach der Transplantation [20-22, 36, 37].

Diese Veränderungen korrelierten mit einer schlechteren Transplantatfunktion der Organe hirntoter Spender. Empfänger von Transplantaten hirntoter Spender entwickelten im Vergleich zu Lebendspenden eine höhere Rate an akuten Rejektionen und eine beschleunigte chronische Organdysfunktion [20-22]. WILHELM et al. aus der gleichen Arbeitsgruppe konnten diese Ergebnisse bei Herztransplantaten [25, 26, 28, 42] und VAN DER HOEVEN et al. bei Lebertransplantaten [16] im Rattenmodell bestätigen.

Diese Ergebnisse sind auf die Lebertransplantation beim Menschen übertragbar. JASSEM et al. zeigten in Leberbiopsien von Empfängern mit Lebertransplantaten hirntoter Spender eine Überexpression inflammatorischer Marker [43].

WEIß aus der Arbeitsgruppe um PRATSCHKE et al. verglich den klinischen Verlauf nach der Lebertransplantation bei Empfängern von Organen hirntoter Spender mit dem Verlauf bei Empfängern von Leberlebendspenden [17]. Die Empfänger von Organen hirntoter Spender hatten dort ein signifikant schlechteres Outcome als Empfänger von Leberlebendspenden. Am 1., 3. und 10. postoperativen Tag waren AST und ALT als Marker für Leberzellschäden bei den Empfängern von Organen hirntoter Spender signifikant erhöht. Auch die Leberfunktion war schlechter, das Bilirubin im Serum war in der Hirntod-Gruppe gegenüber den Lebendspenden signifikant erhöht. Empfänger von

Organen hirntoter Spender entwickelten häufigere Episoden akuter Rejektionen und zeigten eine Tendenz zu vermehrten primären Non-Funktionen der Transplantate.

4.2 Spendervorbehandlung

Ausgehend von den ungünstigen immunologischen Veränderungen der Transplantate infolge des Hirntods und aufgrund des nachgewiesenen schlechteren klinischen Verlaufs bei Empfängern von Organen hirntoter Spender stellt sich die Frage einer Behandlung des hirntoten Spenders noch vor der Organentnahme. Ziel der Vorbehandlung ist eine Unterdrückung, Minimierung oder sogar Umkehr der negativen Effekte des Hirntods [52].

4.2.1 Hormonspiegel nach Vorbehandlung

Infolge des Hirntods ergeben sich im Spender hormonelle Verschiebungen. Betroffen sind neben einer Kreislaufdysregulation durch einen inadäquaten Katecholaminausstoß die Hypothalamus-Hypophysen-Achse und der Cortisolspiegel.

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluss der Gabe einer Hormonkombination auf die Organqualität der Hirntodspende [55]. ROSENDALE et al. berichteten von den Ergebnissen einer Therapie der hirntoten Spender mit einem Hormon-Cocktail aus Methylprednisolon, Vasopressin und Trijodthyronin (T3) bzw. L-Thyroxin. Im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Spendern ließ sich zur Organentnahme die Zahl der transplantablen Organe signifikant steigern. Bei Nieren wurde eine Steigerung um 7,3%, bei Pankreas um 6,0%, bei Lebern um 4,9% und bei Herzen um 4,7% erreicht [56]. In Bezug auf die Herztransplantation zeigten die vorbehandelten Organe nach der Transplantation eine geringere Rate an akuten Dysfunktionen, eine Reduktion chronischer Dysfunktionen und ein verlängertes Transplantatüberleben [58].

In der vorliegenden Studie konnte bei der vorbehandelten Spendergruppe dem Abfall des Cortisolspiegels nach dem Hirntod entgegengewirkt werden (siehe Abbildung 3.1). Statt eines 66%-igen Abfalls bei der nicht vorbehandelten Gruppe lag der Cortisolspiegel zur Organentnahme (TP2) 67% über dem Wert nach Abschluss der

Hirntoddiagnostik (TP1). Zum Zeitpunkt der Organentnahme war der Wert des Cortisolspiegels der vorbehandelten Gruppe gegenüber der nicht vorbehandelten Gruppe ca. 5-fach erhöht.

Zusammenfassend war die Methylprednisolon-Gabe im Rahmen des Studienprotokolls effektiv. Der Abfall des Cortisolspiegel nach dem Hirntod konnte signifikant kompensiert werden, so dass ein Cortisol-Anstieg in der vorbehandelten Spendergruppe resultierte.

4.2.2 Zytokinspiegel nach Vorbehandlung

Die anti-inflammatorische und immunsuppressive Potenz von Glucocorticoiden ist seit langem bekannt. Klinisch werden Glucocorticoide erfolgreich zur Therapie von Autoimmunkrankheiten, Allergien und zur Immunsuppression in der Transplantationsmedizin eingesetzt.

Glucocorticoide binden an Glucocorticoidrezeptoren, die im Zellplasma fast jeder Körperzelle vorkommen. Der Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex überschreitet die Kernmembran, bindet im Nukleus an Promoter-Regionen verschiedenster Zielgene und beeinflusst so deren Expression [81, 82].

Im Rahmen der immunsuppressiven Wirkung werden die Expression von IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ , TNF- α , anderer Zytokine und Chemokine sowie die Bildung des IL-2-Rezeptors inhibiert. Insbesondere durch eine Reduktion des IL-2 wird die Proliferation der T-Zell-Population unterdrückt [83]. Außerdem wird die Bildung von Adhäsionsmolekülen eingeschränkt, wodurch die Migration und Infiltration von Leukozyten in das Organparenchym reduziert wird.

Eine weitere anti-inflammatorische Wirkung besteht in der Unterdrückung der Eicosanoidsynthese und damit die Inhibition der Prostaglandin- und Leukotriensynthese.

Glucocorticoide scheinen im Vergleich ihrer Wirkungen mit den bekannten ungünstigen immunologischen Veränderungen nach dem Hirntod, eine viel versprechende Substanz zur Therapie des hirntoten Spenders zu sein. In der vorliegenden prospektiv randomisierten klinischen Studie wurde der Einfluss einer Spendervorbehandlung mit dem Glucocorticoid Methylprednisolon auf die immunologischen Veränderungen infolge des Hirntods untersucht.

Hierbei waren zum Zeitpunkt der Hirntoddiagnostik (TP1) die Serumspiegel der untersuchten Zytokine in der vorbehandelten und in der nicht vorbehandelten Spendergruppe gleich. Danach zeigte sich zum Zeitpunkt der Organentnahme (TP2) verbunden mit der Methylprednisolon-Gabe für die proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-6, TNF- α , MCP-1 und IP-10 in der vorbehandelten Spendergruppe ein signifikanter Abfall der Serumkonzentrationen, während die Konzentrationen in der nicht vorbehandelten Spendergruppe stetig zunahmen. Demzufolge waren die Zytokinspiegel zur Organentnahme in der nicht vorbehandelten Spendergruppe gegenüber den vorbehandelten Spendern um ein Vielfaches erhöht (5,5-fach bei IL-2; 1,5-fach bei IL-2R; 3-fach bei IL-6; 7,8-fach bei TNF- α ; 9,7-fach bei MCP-1; 2,8-fach bei IP-10). Hiermit kann ein deutlicher Therapieeffekt der Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.2 bis Abbildung 3.7).

Die unterdrückte Bildung der untersuchten Zytokine bewirkt eine geringere immunologische Aktivierung des Transplantats. Die verringerte IL-2-Konzentration in Verbindung mit einem niedrigeren Spiegel an IL-2-Rezeptoren spricht für eine geringere T-Zell-Proliferation und eine geringere T-Zell-Aktivierung. Die Inhibition von IL-6 und TNF- α senken die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und unterdrücken die Ausbildung der inflammatorischen Kaskade. Durch die gesunkene Konzentration der chemotaktischen Faktoren TNF- α , MCP-1 und IP-10 resultiert eine verringerte Migration und Infiltration des Organparenchyms mit Entzündungszellen wie T-Zellen, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten.

Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Konzentrationen der Zytokine IL-8, IL-10 und IFN- γ keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Spendergruppen. Über das Zytokin IL-10 wird berichtet, dass Glucocorticoide die Bildung von IL-10 eher fördern und nicht unterdrücken [84, 85]. Dieses könnte das Ergebnis erklären, zumal IL-10 als anti-inflammatorisches Zytokin eher synergetisch zu Glucocorticoiden wirkt und eine Steroid-vermittelte Inhibition physiologisch nicht sinnvoll wäre.

PRATSCHKE et al. berichteten erstmals von den Ergebnissen einer Spendervorbehandlung mit Glucocorticoiden [59, 60]. Bei der Nierentransplantation im Rattenmodell applizierten sie unmittelbar nach dem Hirntod eine einmalige i.v. Glucocorticoid-Bolusgabe von 10 mg/kg KG. Zusätzlich zu einer nicht vorbehandelten, hirntoten Spendergruppe untersuchten sie auch eine Lebendspendergruppe. In der nicht vorbehandelten Spendergruppe waren 6 Stunden nach Hirntod und noch vor

Transplantation die proinflammatorischen Marker TNF- α , IFN- γ und MIP-1 α gegenüber den vorbehandelten Spendern und den Lebendspendern signifikant erhöht. Hier zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der nun vorliegenden klinischen Studie. Auch nach der Transplantation blieben die Zytokine bei den nicht vorbehandelten Spendern signifikant gegenüber den anderen Spendergruppen (vorbehandelte und Lebendspender) erhöht. Außerdem waren die eng mit der Initiierung von Apoptosen verbundenen Faktoren FasLigand und Perforin sowie die Expression von MHC-II-Molekülen ebenfalls hochreguliert. Die niedrigsten Marker zeigte zu allen Zeitpunkten die Gruppe der Lebendspender. Allerdings befanden sich die Marker der vorbehandelten Spendergruppe demgegenüber nur leicht erhöht auf demselben Niveau.

Nach der Transplantation wurde bei den Organen der vorbehandelten Spender immunhistologisch eine signifikant verminderte Infiltration des Nierengewebes mit Monozyten/Makrophagen und T-Zellen im Vergleich zu Organen nicht vorbehandelter Spender festgestellt. Diese Beobachtung bestätigt die oben getroffene Voraussage aufgrund der Glucocorticoid-vermittelten Zytokinunterdrückung. Auch hier war die Infiltration des Gewebes durch Entzündungszellen durch die Vorbehandlung auf dem Niveau der Lebendspender. Die Vorbehandlung mit Glucocorticoiden scheint die immunologischen Veränderungen nach dem Hirntod nahezu auf das Niveau einer Lebendspende drücken zu können.

Zu diesem Ergebnis gelangte auch KUECUEK in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um PRATSCHKE. Die Arbeitsgruppe konnte erste Ergebnisse für die humane Lebertransplantation liefern, bei der der Einfluss einer Spendervorbehandlung mit Methylprednisolon auf die Expression proinflammatorischer Zytokine gezeigt wurde [64]. Betrachtet wurden vorbehandelte hirntote Spender gegenüber nicht vorbehandelten Spendern und gegenüber Leberlebendspenden. KUECUEK berichtet über eine signifikante Reduktion der Zytokinexpression bei der vorbehandelten Spendergruppe gegenüber den nicht vorbehandelten hirntoten Spendern. Das verringerte Level der Zytokine nach Vorbehandlung soll dabei mit den niedrigen Werten der Lebendspender vergleichbar sein.

Die Vorbehandlung hirntoter Spender mit Glucocorticoiden bewirkt eine signifikante Reduktion proinflammatorischer Zytokine. Dadurch entwickelt sich eine geringere immunologische Aktivität des Transplantats zur Transplantation. Die immunologische

Aktivität der Organe hirntoter Spender scheint durch die Vorbehandlung mit Glucocorticoiden auf das günstigere Niveau der Lebendspenden gedrückt zu werden. Hieraus kann ein Vorteil für den klinischen Verlauf nach der Transplantation resultieren.

4.2.3 Klinische Parameter nach Transplantation

Ein Effekt der Spendervorbehandlung mit Glucocorticoiden auf das klinische Ergebnis nach der Transplantation konnte erstmals durch PRATSCHKE et al. bei der Nierentransplantation im Rattenmodell gezeigt werden [59, 60]. Empfänger von Organen nicht vorbehandelter Spender zeigten gehäufte Episoden akuter Rejektion verglichen mit den Empfängern von Organen vorbehandelter Spender und Lebendspender und starben signifikant früher an Nierenversagen. Außerdem entwickelten sie im Verlauf von 6 Monaten nach Transplantation eine exponentiell zunehmende Proteinurie, was als klinischer Parameter für eine akzelerierte Verschlechterung der Nierenfunktion gilt. Demgegenüber zeigten Organempfänger vorbehandelter Organe und Organempfänger von Lebendspenden nur eine minimale Proteinurie [62]. Außerdem wiesen Empfänger vorbehandelter Organe ein deutlich verlängertes Überleben auf, das mit denen der Empfänger von Lebendspenden vergleichbar war.

FOLETTE et al. berichteten über den Vorteil einer hoch dosierten Methylprednisolon-Gabe bei hirntoten Spendern für eine Lungentransplantation [63]. Die vorbehandelten Organe zeigten eine verbesserte Funktion, was sich in einer gesteigerten Oxygenierung bzw. in einem höheren p_aO_2/FiO_2 -Verhältnis äußerte.

Ein klinischer Vorteil durch eine Vorbehandlung hirntoter Spender mit Methylprednisolon lässt sich auch in der vorliegenden Arbeit nachweisen. Die Lebertransplantate vorbehandelter Spender wiesen nach der Transplantation eine bessere Leberfunktion auf.

Das totale Bilirubin im Serum war am 10. postoperativen Tag als Marker für die Ausscheidungsleistung der Leber bei Empfängern vorbehandelter Organe signifikant niedriger gegenüber Empfängern nicht vorbehandelter Organe. Auch im Langzeitverlauf nach 6 Monaten war das Bilirubin hier signifikant verringert (siehe Abbildung 3.10). In den ersten 24 Stunden nach Transplantation ist eine Tendenz zur vermehrten Galleproduktion bei den vorbehandelten Spendern festzustellen (siehe Abbildung 3.11).

Die Serumkonzentrationen für AST und γ GT waren bei Empfängern nicht vorbehandelter Organe besonders an den ersten postoperativen Tagen gegenüber den vorbehandelten Transplantaten um ein Vielfaches erhöht (siehe Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9). Ursächlich kann ein erhöhter Ischämie/Reperfusionsschaden der nicht vorbehandelten Organe sein.

Ausgehend von einer verringerten immunologischen Aktivität der vorbehandelten Transplantate konnte eine signifikant geringere Rate an akuten Rejektionen erzielt werden (22% vs. 38%). Die Rejektionen der Empfänger vorbehandelter Transplantate zeigten außerdem eine Tendenz zu mildereren Verläufen (Grad II: 2% vs. 12%; Grad I: 20% vs. 26%). Darüber hinaus traten im Trend weniger primäre Non-Funktionen (4% vs. 6%) und weniger durch ERCP nachgewiesene ITBL (4% vs. 10%) auf (siehe Tabelle 3.5).

4.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals im Rahmen einer prospektiv randomisierten klinischen Studie der Effekt einer Glucocorticoidtherapie auf die immunologischen Veränderungen beim Menschen infolge des Hirntods gezeigt werden.

Die Applikation des Methylprednisolons nach Abschluss der Hirntoddiagnostik bis zur Organentnahme ist eine einfache, sichere und kostengünstige Methode. Unerwünschte Wirkungen verbunden mit der Methylprednisolon-Gabe wurden nicht beobachtet. Vermehrte Komplikationen bei der Organentnahme und bei der Transplantation traten nicht auf. Die mit dem Hirntod verbundene Cortisol-Depletion konnte kompensiert und eine Steigerung des Cortisolspiegels erreicht werden.

Die Therapie der hirntoten Spender mit Methylprednisolon führte zu einer signifikanten Reduktion wichtiger proinflammatorischer Zytokine (IL-2, IL-2R, IL-6, TNF- α , MCP-1, IP-10) im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Spendern. Demgegenüber stiegen die Zytokinkonzentrationen der nicht vorbehandelten Spender im Verlauf des Hirntods bis zur Organentnahme weiter an. Vorbehandelte Spender weisen zur Transplantation eine geringere immunologische Aktivität der Organe aus, wodurch eine verbesserte Organqualität erreicht werden konnte.

Nach der Lebertransplantation ruft die unterdrückte immunologische Aktivität der Transplantate vorbehandelter Spender eine geringere Immunantwort des Spenders hervor. Damit verbunden ist ein geringerer Ischämie/Reperfusionsschaden nach der Transplantation. Transplantate vorbehandelter Spender weisen nach Lebertransplantation einen günstigeren klinischen Verlauf auf. Die Organe haben eine bessere Funktion und entwickeln eine geringere Rate an akuten Rejektionen, welche zudem milder verliefen.

Die Vorbehandlung hirntoter Spender mit Methylprednisolon ist eine einfache, sichere und wirksame Therapie zur Unterdrückung immunologischer Veränderung infolge des Hirntods. Sie verbesserte die Organqualität und führt nach der Transplantation zu signifikant günstigeren klinischen Ergebnissen.

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen berichten im Rahmen der Explantation von einer Steigerung transplantabler Organe nach einer Spendervorbehandlung [56, 58, 63]. Die Spendervorbehandlung scheint vor allem die Qualität marginaler Organe günstig zu beeinflussen und so die Rate an transplantablen Organen zu erhöhen [61]. Die Arbeitsgruppe um REUTZEL-SELKE zeigte, dass vor allem Organe älterer Spender eine erhöhte immunologische Aktivität aufweisen und nach Transplantation eine verstärkte Immunantwort hervorrufen [86, 87].

Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die Vorbehandlung der hirntoten Spender mit Glucocorticoiden die immunologische Aktivität der Transplantate auf das wesentlich günstigere Niveau der Lebendspender gedrückt werden kann. Auch die Ergebnisse nach Transplantation hinsichtlich Organfunktion, Rejektionen und Transplantatüberleben scheinen mit den günstigeren Verläufen bei Lebendspendern vergleichbar zu sein.

Eine konsequente Vorbehandlung hirntoter Spender könnte die Organqualität und die Rate an transplantablen Organen erhöhen. Somit würde angesichts steigender Patientenzahlen auf den Wartelisten ein Beitrag zur Bekämpfung des Organmangels geleistet werden. Verbunden damit wären eine verbesserte Funktion der Organe und ein verlängertes Transplantatüberleben.

Aus der Untersuchung der Veränderungen nach dem Hirntod ergeben sich zahlreiche weitere Therapieansätze zur Spendervorbehandlung. Ein besseres Verständnis der immunologischen Veränderungen könnte Ansätze für einen gezielteren Einsatz immunsuppressiver Substanzen ergeben. Die klinischen Therapieeffekte anderer

Immunsuppressiva müssen weiter untersucht werden. Erste Ergebnisse für Mycophenolat-Mofetil (CellCept®), Everolimus (RAD) und Tacrolimus (FK506) im Tiermodell liegen bereits vor [62]. Dort zeigten sich besonders für Tacrolimus ähnlich gute Resultate wie für das Methylprednisolon.

Einen ergänzenden Beitrag zur Verbesserung der Organqualität kann eine Vorbehandlung des Spenders mit Antioxidantien haben [53]. Darüber hinaus zeigen erste Studien im Tiermodell ein verlängertes Transplantatüberleben nach Induktion von Enzymen wie zum Beispiel Hämoxxygenase-1 (HO-1), die antioxidativen Stress reduzieren können [88]. Auch auf diesem Gebiet ergeben sich viel versprechende Therapieansätze.

Wahrscheinlich sind zur optimalen Spendervorbehandlung mehrere sich ergänzende Maßnahmen notwendig, um eine Maximierung der Organqualität zur Transplantation zu erreichen. Die konsequente Therapie hirntoter Spender mit Glucocorticoiden könnte dort ein fester Bestandteil werden.

5 Zusammenfassung

Einleitung

Für den klinischen Verlauf nach Transplantation wurde der Hirntod des Spenders als Antigen-unabhängiger Risikofaktor identifiziert. Durch den Hirntod werden hämodynamische, hormonelle und immunologische Veränderungen im Spender ausgelöst. Die immunologischen Veränderungen verursachen durch eine gesteigerte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, verbunden mit einer vermehrten Infiltration des Parenchyms durch Entzündungszellen, eine immunologische Aktivierung der Organe zur Transplantation. Daraus folgend zeigen Transplantate hirntoter Spender gegenüber Lebendspenden eine schlechtere Organfunktion, eine erhöhte Rejektionsrate und ein verkürztes Überleben. Eine Spendervorbehandlung mit Glucocorticoiden könnte den ungünstigen immunologischen Veränderungen infolge des Hirntods entgegenwirken.

Ziele

In einer prospektiv randomisierten klinischen Studie wurde anhand der Serumspiegel wichtiger Zytokine der Einfluss einer Vorbehandlung hirntoter Spender mit Methylprednisolon auf die immunologischen Veränderungen und auf die klinischen Ergebnisse nach einer Lebertransplantation untersucht.

Material und Methoden

Hirntote Spender aus der Region Berlin-Brandenburg wurden prospektiv randomisiert in 2 Gruppen (n=50) aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt nach Abschluss der Hirntoddiagnostik einen initialen Bolus von 250 mg Methylprednisolon i.v. und anschließend eine kontinuierliche Methylprednisolon-Therapie mit 100 mg/h. Direkt nach Abschluss der Hirntoddiagnostik und vor der Organentnahme wurden Blutentnahmen zur Bestimmung der Serumspiegel der Zytokine IL-2, IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , MCP-1 und IP-10 vorgenommen. Nach Lebertransplantation wurden biochemische und klinische Parameter zur Charakterisierung des klinischen Verlaufs ausgewertet.

Ergebnisse

Die Serumkonzentrationen der Zytokine IL-2, IL-6, TNF- α , MCP-1, IP-10 und IL-2R waren zur Organentnahme bei den vorbehandelten Spendern gegenüber den nicht vorbehandelten Spendern und im Vergleich zu den Konzentrationen zum Zeitpunkt der Hirntoddiagnostik signifikant verringert. Im gleichen Zeitraum stiegen die Zytokinspiegel der nicht vorbehandelten Spender weiter an.

Nach Lebertransplantation zeigten die Empfänger vorbehandelter Organe eine bessere Transplantatfunktion und eine geringere Rate an akuten Rejektionen, welche zudem milder verliefen.

Schlussfolgerungen

Erstmals konnte im Rahmen einer prospektiv randomisierten Studie anhand signifikant unterdrückter Zytokinspiegel der vorteilhafte Einfluss einer Spendervorbehandlung hirntoter Organspender mit Methylprednisolon auf die immunologischen Veränderungen infolge des Hirntods nachgewiesen werden. Transplantate vorbehandelter Spender zeigen nach Transplantation einen günstigeren klinischen Verlauf.

Die Spendervorbehandlung mit Glucocorticoiden kann ein wichtiger Beitrag zur Optimierung der Organqualität zur Transplantation und zur Verbesserung des Outcome sein. Insbesondere könnte die Rate transplantabler marginaler Organe erhöht werden.

6 Publikation der Studie

Die Ergebnisse dieser Studien wurden 2008 publiziert in Annals of Surgery:

Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P, Hoffman S, Francuski M, Kunert C, Kuecuk O, Schumacher G, Wesslau C, Lun A, Kohler S, Weiss S, Tullius S G, Neuhaus P, Pratschke J.

Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial.

Annals of Surgery 2008; 248 (6): 1042-50.

7 Literaturverzeichnis

1. Murray G, Holden R. Transplantation of kidneys, experimentally and in human cases. *Am J Surg* 1954;87(4):508-515.
2. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, et al. Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surg Gynecol Obstet* 1963;117:659-676.
3. Starzl TE, Marchioro TL, Porter KA. Experimental and clinical observations after homotransplantation of the whole liver. *Rev Int Hepatol* 1965;15(8):1447-1480.
4. Barnard MS. Heart transplantation: an experimental review and preliminary research. *S Afr Med J* 1967;41(48):1260-1262.
5. Kassahun WT, Fangmann J, Harms J, et al. Liver resection and transplantation in the management of hepatocellular carcinoma: a review. *Exp Clin Transplant* 2006;4(2):549-558.
6. Schwartz M, Roayaie S, Konstadoulakis M. Strategies for the management of hepatocellular carcinoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2007;4(7):424-432.
7. Schwartz ME, D'Amico F, Vitale A, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Are the Milan criteria still valid? *Eur J Surg Oncol* 2008;34(3):256-262.
8. Pandey D, Lee KH, Tan KC. The role of liver transplantation for hilar cholangiocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007;6(3):248-253.
9. DSO - Deutsche Stiftung Organtransplantation. 2009. (Accessed 07/22/2009, at <http://www.dso.de/>.)
10. Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, et al. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet* 1999;354(9185):1147-1152.
11. Tullius SG, Tilney NL. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 1995;59(3):313-318.

12. Wilhelm MJ, Kusaka M, Pratschke J, et al. Chronic rejection: increasing evidence for the importance of allogen-independent factors. *Transplant Proc* 1998;30(5):2402-2406.
13. Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, et al. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int* 1999;56(4):1551-1559.
14. Barklin A. Systemic inflammation in the brain-dead organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009;53(4):425-435.
15. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Brain death and its influence on donor organ quality and outcome after transplantation. *Transplantation* 1999;67(3):343-348.
16. van der Hoeven JA, Lindell S, Van Schilfgaarde R, et al. Donor brain death reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr. *Transplantation* 2001;72(10):1632-1636.
17. Weiss S, Kotsch K, Francuski M, et al. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7(6):1584-1593.
18. Junge G, Tullius SG, Klitzing V, et al. The influence of late acute rejection episodes on long-term graft outcome after liver transplantation. *TransplantProc* 2005;37(4):1716-1717.
19. Contreras JL, Eckstein C, Smyth CA, et al. Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes* 2003;52(12):2935-2942.
20. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Ann Surg* 2000;232(2):263-271.
21. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Acute rejection of rat renal allografts is accelerated by donor brain death. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):874-875.
22. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(11):2474-2481.

23. Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, et al. The influence of donor brain death on long-term function of renal allotransplants in rats. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):693-694.
24. van der Hoeven JA, Moshage H, Schuurs T, et al. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. *Transplantation* 2003;76(8):1150-1154.
25. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, et al. Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation. *Circulation* 2000;102(19):2426-2433.
26. Wilhelm MJ, Pratschke J, Kusaka M, et al. Donor brain death affects tempo and intensity of acute rejection of rat chronic allografts. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):1008-1009.
27. Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski IA, et al. Altered alloimmune response toward grafts from brain-dead donors in chronic rat cardiac allograft rejection. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):366-367.
28. Wilhelm MJ, Pratschke J, Laskowski IA, et al. Brain death and its impact on the donor heart-lessons from animal models. *J Heart Lung Transplant* 2000;19(5):414-418.
29. Wilhelm MJ, Pratschke J, Paz DM, et al. Donor hypertension and recipient immune responsiveness in chronic rat cardiac allograft rejection. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):321-322.
30. Zweers N, Petersen AH, van der Hoeven JA, et al. Donor brain death aggravates chronic rejection after lung transplantation in rats. *Transplantation* 2004;78(9):1251-1258.
31. Olinga P, van der Hoeven JA, Merema MT, et al. The influence of brain death on liver function. *Liver Int* 2005;25(1):109-116.
32. Herijgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, et al. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. *Transplantation* 1996;62(3):330-335.

33. Lopau K, Mark J, Schramm L, et al. Hormonal changes in brain death and immune activation in the donor. *Transpl Int* 2000;13 Suppl 1:S282-S285.
34. Colombo G, Gatti S, Turcatti F, et al. Alteration in the transcriptional profile of livers from brain-dead organ donors. *Transplantation* 2006;82(1):69-79.
35. Gatti S, Colombo G, Turcatti F, et al. Reduced expression of the melanocortin-1 receptor in human liver during brain death. *Neuroimmunomodulation* 2006;13(1):51-55.
36. Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, et al. Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation* 2000;69(3):405-410.
37. Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, et al. Early and late inflammatory changes occurring in rat renal isografts from brain dead donors. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):867-868.
38. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, et al. Effects of brain death on stress and inflammatory response in the human donor kidney. *Transplant Proc* 2005;37(1):367-369.
39. Plenz G, Eschert H, Erren M, et al. The interleukin-6/interleukin-6-receptor system is activated in donor hearts. *J Am Coll Cardiol* 2002;39(9):1508-1512.
40. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. Activation of proinflammatory genes in somatic organs as a consequence of brain death. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):1003-1005.
41. Segel LD, vonHaag DW, Zhang J, et al. Selective overexpression of inflammatory molecules in hearts from brain-dead rats. *J Heart Lung Transplant* 2002;21(7):804-811.
42. Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, et al. Activation of proinflammatory mediators in heart transplants from brain-dead donors: evidence from a model of chronic rat cardiac allograft rejection. *Transplant Proc* 2002;34(6):2359-2360.
43. Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, et al. Cadaveric versus living-donor livers: differences in inflammatory markers after transplantation. *Transplantation* 2003;76(11):1599-1603.

44. van der Hoeven JA, Molema G, Ter Horst GJ, et al. Relationship between duration of brain death and hemodynamic (in)stability on progressive dysfunction and increased immunologic activation of donor kidneys. *Kidney Int* 2003;64(5):1874-1882.
45. van der Hoeven JA, Ploeg RJ, Postema F, et al. Induction of organ dysfunction and activation of inflammatory markers in donor liver and kidney during hypotensive brain death. *Transplant Proc* 1999;31(1-2):1006-1007.
46. van der Hoeven JA, Ploeg RJ, Postema F, et al. Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors. *Transplantation* 1999;68(12):1884-1890.
47. van Der Hoeven JA, Ter Horst GJ, Molema G, et al. Effects of brain death and hemodynamic status on function and immunologic activation of the potential donor liver in the rat. *Ann Surg* 2000;232(6):804-813.
48. Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, et al. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. *Transplantation* 2003;75(12):2001-2007.
49. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, et al. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation* 1998;65(12):1533-1542.
50. Kutsogiannis DJ, Pagliarello G, Doig C, et al. Medical management to optimize donor organ potential: review of the literature. *Can J Anaesth* 2006;53(8):820-830.
51. Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JA, et al. Effect of brain death on gene expression and tissue activation in human donor kidneys. *Transplantation* 2004;78(7):978-986.
52. Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death models? *Transpl Int* 2005;18(1):15-21.
53. Singer P, Shapiro H, Cohen J. Brain death and organ damage: the modulating effects of nutrition. *Transplantation* 2005;80(10):1363-1368.

54. Audibert G, Charpentier C, Seguin-Devaux C, et al. Improvement of donor myocardial function after treatment of autonomic storm during brain death. *Transplantation* 2006;82(8):1031-1036.
55. Novitzky D, Cooper DK, Rosendale JD, et al. Hormonal therapy of the brain-dead organ donor: experimental and clinical studies. *Transplantation* 2006;82(11):1396-1401.
56. Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA, et al. Aggressive pharmacologic donor management results in more transplanted organs. *Transplantation* 2003;75(4):482-487.
57. Venkateswaran RV, Patchell VB, Wilson IC, et al. Early donor management increases the retrieval rate of lungs for transplantation. *Ann Thorac Surg* 2008;85(1):278-286; discussion 286.
58. Rosendale JD, Kauffman HM, McBride MA, et al. Hormonal resuscitation yields more transplanted hearts, with improved early function. *Transplantation* 2003;75(8):1336-1341.
59. Pratschke J, Kofla G, Wilhelm M, et al. Improvements in early behaviour of kidney allografts after donor treatment. *Transplant Proc* 2002;34(6):2213-2214.
60. Pratschke J, Kofla G, Wilhelm MJ, et al. Improvements in early behavior of rat kidney allografts after treatment of the brain-dead donor. *Ann Surg* 2001;234(6):732-740.
61. Reutzel-Selke A, Tullius SG, Zschockelt T, et al. Donor pretreatment of grafts from marginal donors improves long-term graft outcome. *Transplant Proc* 2001;33(1-2):970-971.
62. Reutzel-Selke A, Zschockelt T, Denecke C, et al. Short-term immunosuppressive treatment of the donor ameliorates consequences of ischemia/ reperfusion injury and long-term graft function in renal allografts from older donors. *Transplantation* 2003;75(11):1786-1792.

63. Follette DM, Rudich SM, Babcock WD. Improved oxygenation and increased lung donor recovery with high-dose steroid administration after brain death. *J Heart Lung Transplant* 1998;17(4):423-429.
64. Kuecuk O, Mantouvalou L, Klemz R, et al. Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. *Transplant Proc* 2005;37(1):387-388.
65. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology (Baltimore, Md)* 1997;25(3):658-663.
66. Smith M. Physiologic changes during brain stem death--lessons for management of the organ donor. *J Heart Lung Transplant* 2004;23(9 Suppl):S217-222.
67. Amado JA, Lopez-Espadas F, Vazquez-Barquero A, et al. Blood levels of cytokines in brain-dead patients: relationship with circulating hormones and acute-phase reactants. *Metabolism* 1995;44(6):812-816.
68. Rabanal JM, Amado JA, Quesada A, et al. [Study of thyroid function in the organ donor during brain death]. *Rev Esp Anestesiol Reanim* 1992;39(5):306-308.
69. Dimopoulou I, Tsagarakis S, Anthi A, et al. High prevalence of decreased cortisol reserve in brain-dead potential organ donors. *Crit Care Med* 2003;31(4):1113-1117.
70. Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 1988;240(4856):1169-1176.
71. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374(Pt 1):1-20.
72. Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett* 1992;307(1):97-101.
73. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.

74. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 2005;115(1):1-20.
75. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004;75(2):163-189.
76. Carr MW, Roth SJ, Luther E, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(9):3652-3656.
77. Colvin BL, Thomson AW. Chemokines, their receptors, and transplant outcome. *Transplantation* 2002;74(2):149-155.
78. Neville LF, Mathiak G, Bagasra O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8(3):207-219.
79. Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, et al. A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats. *Transplantation* 2000;69(3):427-430.
80. Jassem W, Koo DD, Muiesan P, et al. Non-heart-beating versus cadaveric and living-donor livers: differences in inflammatory markers before transplantation. *Transplantation* 2003;75(8):1386-1390.
81. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 2000;55(7):603-613.
82. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005;353(16):1711-1723.
83. Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94(6):557-572.
84. John M, Lim S, Seybold J, et al. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(1):256-262.

85. Tabardel Y, Duchateau J, Schmartz D, et al. Corticosteroids increase blood interleukin-10 levels during cardiopulmonary bypass in men. *Surgery* 1996;119(1):76-80.
86. Reutzel-Selke A, Filatenkov A, Jurisch A, et al. Grafts from elderly donors elicit a stronger immune response in the early period posttransplantation: a study in a rat model. *Transplant Proc* 2005;37(1):382-383.
87. Reutzel-Selke A, Jurisch A, Denecke C, et al. Donor age intensifies the early immune response after transplantation. *Kidney Int* 2007;71(7):629-636.
88. Kotsch K, Francuski M, Pascher A, et al. Improved long-term graft survival after HO-1 induction in brain-dead donors. *Am J Transplant* 2006;6(3):477-486.

8 Danksagung

Ich widme diese Arbeit meiner Frau Patricia und meinen Kindern. Ohne ihre tägliche Liebe, Zuwendung und Beistand wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ein erfolgreicher Abschluss ist ein wichtiger Meilenstein unseres Lebens.

Zuallererst möchte ich mich bei Professor Dr. Johann Pratschke für seine Unterstützung, Supervision und seinen fachlichen Rat ganz herzlich bedanken. Er war stets ein geduldiger und lenkender Begleiter meiner Arbeit.

Professor Peter Neuhaus möchte ich ebenfalls aufrichtig danken. Unter seiner Leitung besteht an der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie ein fruchtbares und produktives Klima, das seinen Mitarbeitern neben der klinischen Ausbildung eine umfangreiche wissenschaftliche Betätigung ermöglicht.

Mein Dank gilt auch PD Dr. Marcus Bahra für seine zuverlässige und effiziente Hilfe im entscheidenden Augenblick.

Außerdem gilt mein Dank Professor Dr. Hans-Dieter Volk und der Arbeitsgruppe um PD Dr. Katja Kotsch für ihre kompetente Unterstützung bei der Laborarbeit und der Probenauswertung.

9 Curriculum vitae

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

10 Publikationsliste

1. Warnick P, Bahra M, Andreou A, Neuhaus P, Glanemann M. Pankreas malignom: Second-Look-Operation trotz auswärtiger Inoperabilität? Zentralblatt für Chirurgie. 2010 Feb;135(1):70-4.
2. Hagen A, Grosenick D, Macdonald R, Rinneberg H, Burock S, Warnick P, et al. Late-fluorescence mammography assesses tumor capillary permeability and differentiates malignant from benign lesions. Optics express. 2009 Sep 14;17(19):17016-33.
3. Li J, Rudas M, Kemmner W, Warnick P, Fischer J, Gnant M, et al. The location of small tumor deposits in the SLN predicts Non-SLN macrometastases in breast cancer patients. Eur J Surg Oncol. 2008 Aug;34(8):857-62.
4. Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P, et al. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. Annals of surgery. 2008 Dec;248(6):1042-50.
5. Gretschel S, Warnick P, Bembenek A, Dresel S, Koswig S, String A, et al. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy in epidermoid carcinoma of the anal canal. Eur J Surg Oncol. 2008 Aug;34(8):890-4.
6. Macdonald R, Kentischer F, Warnick P, Heppke G. Investigation of Polar Order in Liquid Crystals of Nonchiral, Banana Shaped Molecules By Second Harmonic Generation. Molecular Crystals and Liquid Crystals. 1998;320:101 - 13.
7. Macdonald R, Kentischer F, Warnick P, Heppke G. Antiferroelectricity and Chiral Order in New Liquid Crystals of Nonchiral Molecules Studied by Optical Second Harmonic Generation. Physical Review Letters. 1998;81(20):4408.
8. Kentischer F, Macdonald R, Warnick P, Heppke G. Second harmonic generation (SHG) investigations of different phases of banana shaped molecules. Liquid Crystals. 1998;25:341-7.

9. Kentischer F, Macdonald R, Warnick P, Heppke G, Rauch S. Second harmonic generation in liquid crystals of nonchiral banana-shaped molecules. In: Iam-Choon K, editor.; 1997: SPIE; 1997. p. 128-35.

Erklärung

„Ich, Peter Warnick, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Reduktion proinflammatorischer Zytokine durch eine Methylprednisolon-Therapie hirntoter Spender vor Lebertransplantation‘ 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.“

Datum

Unterschrift