

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der
Universität des Saarlandes, Homburg / Saar
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger)

**Multidrug donor preconditioning zur Verminderung des kalten
Konservierungsschadens steatotischer Rattenlebern**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes**

2016

vorgelegt von Katharina Seibert
geboren am 09.10.1986 in Heidelberg

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Summary	4
Zusammenfassung	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Steatose	7
1.2 Verwendung protektiver Konservierungslösungen	9
1.3 Strategien zur Organkonservierung	11
1.4 Multidrug donor preconditioning	12
1.5 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Tiermodell und Fettleberinduktion.....	14
2.2 Narkose, Operation und Konservierung	14
2.3 Die isolierte Leberperfusion	16
2.4 Proben.....	16
2.5 Histologie und Immunhistochemie	17
2.6 Western Blot Analyse	19
2.7 Lipidperoxidation	20
2.8 Experimentelles Protokoll	20
2.9 Statistik.....	22
3 Ergebnisse.....	24
3.1 Galleproduktion	24
3.2 Malondialdehyd	25
3.3 Zytokine.....	27
3.4 Enzymanalyse	28
3.5 Steatose	31
3.6 Apoptose	32
3.7 Neutrophileninfiltration	34

3.8 NF κ B	35
3.9 Freisetzung von Total Protein	36
4 Diskussion	38
5 Literatur	48
6 Abkürzungsverzeichnis.....	58
7 Publikationen	60
8 Danksagung	61

Summary

Introduction: The advantage of a medical preconditioning of brain dead donors consists of a high bioavailability of pharmacological substances to the liver tissue. We studied the effect of a pharmacological preconditioning of steatotic rat livers in an isolated liver perfusion model.

Material and Methods: Sprague-Dawley rats were allocated to three groups (n=8 each), including a control group (Control, normal livers) and two steatotic liver groups (SL-Control/SL-PD). The Control group and the SL-Control received NaCl 0,9% before organ perfusion in contrast to the SL-PD group, which was treated according to the short-term multidrug donor preconditioning protocol (MDDP, including glycine (100mg/kgbw), pentoxiphylline (50mg/kgbw), deferoxamine (30mg/kgbw), simvastatin (5mg/kgbw), N-acetylcysteine (150mg/kgbw), melatonin (10mg/kgbw) and erythropoietin (1000 IU). Organ harvesting and 24h cold storage in HTK solution was followed by a 60min reperfusion period with Krebs-Henseleit bicarbonate buffer in an isolated liver perfusion model.

Results: MDDP preconditioning of steatotic livers significantly attenuated cellular and mitochondrial reperfusion injury as measured by the liver enzymes ASAT, ALAT, LDH and GLDH. After 60 minutes reperfusion the inflammatory reaction was also significantly reduced in the SL-PD compared to SL-Control group. This was shown in both cytokine release and recruitment of neutrophils in the hepatic tissue. SL-Control showed a marked increase of apoptotic cell death when compared to normal control livers, whereas MDDP was able to reduce apoptotic cell death.

Discussion: Steatotic rat livers showed a significantly higher cell- and mitochondrial damage as well as a pro-inflammatory reaction after 24h cold storage. By preconditioning of these steatotic livers according to the MDDP protocol, organ quality could be improved. Therefore, MDDP may be a promising approach to enhance the quality of marginal livers for transplantation in clinical practice.

Zusammenfassung

Einleitung: Aufgrund des Mangels an Spenderorganen werden zunehmend marginale Lebern transplantiert. Problematisch ist hierbei das erhöhte Risiko der postoperativen Leberdysfunktion und der konsekutiven Empfängersterblichkeit. In einem isolierten Leber-Perfusions-Modell an der Ratte sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, inwieweit die Qualität von Fettlebern durch eine kurzzeitige medikamentöse Präkonditionierung (multidrug donor preconditioning [MDDP]) verbessert werden kann.

Material und Methoden: Sprague-Dawley Ratten wurden in 3 Gruppen (jeweils $n=8$), bestehend aus einer Kontrollgruppe mit gesunden Lebern (Kontrolle) und 2 Fettlebergruppen (FL-Kontrolle/FL-MDDP) eingeteilt. Wir induzierten zunächst Fettlebern, von welchen je eine Gruppe eine medikamentöse Vorbehandlung (multidrug donor preconditioning, FL-MDDP) bzw. NaCl 0,9% (FL-Kontrolle), beginnend jeweils 30 Minuten vor Perfusionsbeginn erhielt. MDDP bestand aus Glycin (100mg/kgKG), Pentoxifyllin (50mg/kgKG), Deferoxamin (30mg/kgKG), Simvastatin (5mg/kgKG), N-Acetylcystein (150mg/kgKG), Melatonin (10mg/kgKG) und Erythropoietin (1000 I.E.), welche intravasal, intragastral oder intraperitoneal appliziert wurden. Nach in situ-Perfusion mit 4°C kalter Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK-Lösung) und Leberexplantation folgte eine 24h kalte Ischämie-/Konservierungsphase in HTK-Lösung (4°C) und anschließend eine 60-minütige Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit-Pufferlösung. 1 Minute nach Beginn der Reperfusion, sowie nach 30 und 60 Minuten wurde das Effluat zur laborchemischen Analyse verschiedener Leberenzyme, Elektrolyte, Zytokine und Malondialdehyd gesammelt. Nach Abschluss der Reperfusion wurde das Lebergewebe zur histologischen Untersuchung und zur Proteinanalyse konserviert.

Ergebnisse: Die Präkonditionierung von Fettlebern mit MDDP verbesserte nach 60 Minuten Reperfusion signifikant die zelluläre und mitochondriale Integrität gemessen anhand der Leberenzyme ASAT, ALAT, LDH und GLDH sowie des Totalproteins im Vergleich zur FL-Kontrollgruppe ($p<0,05$). Nach 60-minütiger Reperfusion war die inflammatorische Reaktion gemessen anhand der Ausschüttung von IL-1 in der FL-MDDP Gruppe gegenüber der FL-Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Auch die Invasion neutrophiler Granulozyten war bei den mit MDDP vorbehandelten Lebern im Vergleich zur steatotischen Kontrolle signifikant geringer. Fettlebern zeigten eine

deutlich höhere Apoptoserate gegenüber gesunden Lebern. Diese konnte durch die MDDP Präkonditionierung signifikant reduziert werden.

Diskussion: Steatotisch veränderte Rattenlebern zeigen nach 24 Stunden kalter Konservierung und anschließender 60-minütiger warmer Reperfusion relevant höhere zelluläre und mitochondriale Schäden mit signifikant erhöhter inflammatorischer Reaktion und apoptotischem Zelltod. Durch eine Präkonditionierung der Fettlebern nach dem MDDP-Schema, welches durch Gabe bei bestehender Herzkreislauffähigkeit des Organspenders eine hohe Bioverfügbarkeit der applizierten Substanzen in das Lebergewebe gewährleistet, konnte die Organqualität verbessert werden. MDDP ist ein zur chirurgischen Organexplantation zeitnahes Verfahren, welches effektiv zur Verbesserung marginaler Fettlebern eingesetzt werden könnte.

1 Einleitung

Die Lebertransplantation stellt derzeit die einzige kurative Therapie bei terminaler Leberinsuffizienz dar. Problematisch ist hierbei jedoch die Diskrepanz zwischen der Verfügbarkeit benötigter Spenderlebern und der Zahl der Organangebote und letztendlich durchgeführten Transplantationen [Chu et al., 2015; Yang et al., 2014; Routh et al., 2013; Saidi, 2013]. In Deutschland warteten 2002 622 Menschen auf eine Spenderleber [Forsythe, 2005]. Am Ende des Jahres betrug diese Zahl noch immer 359 und 131 weitere Patienten verstarben während der Wartezeit [Forsythe, 2005]. Hinzu kommt, dass weitaus mehr Patienten mit Leberinsuffizienz eines Spenderorgans bedürfen, aber aufgrund der Spenderorganknappheit und denen sich daraus ergebenden strikten Allokationskriterien nicht als aktiv registrierter Patient auf der Warteliste stehen. Rozga berichtet in einer Übersichtsarbeit, dass letztendlich weniger als 30% der Patienten auf der Warteliste ein Spenderorgan erhalten [Rozga, 2006]. In Ermangelung suffizienter Leberersatzverfahren und des persistierenden Spenderdefizits werden daher immer mehr grenzwertige, sogenannte marginale Organe transplantiert [Liu et al., 2013; Yang et al. 2014; Routh et al., 2013]. Diese schließen neben Lebern, welche einer verlängerten Periode (warmer) Ischämie ausgesetzt waren oder solche von Patienten mit Infektionskrankheiten steatotische Lebern ein. Diese Organe zeichnen sich durch eine signifikant höhere Rate an Organdysfunktion nach Transplantation bzw. Transplantatversagen aus [Chu et al., 2015]. Im Falle von transplantierten Steatoselebern beträgt der Transplantatverlust im Jahr 45 % [Verran et al., 2003].

Zur Reduktion der Rate an Organdysfunktion nach Transplantation ist daher das Bestreben neue Methoden zur Organprotektion und Verbesserung des Ischämie-/Reperfusionsschadens zu etablieren. Diese schließen zunehmend auch Präkonditionierungsstrategien des Organspenders, insbesondere im Fall von marginalen Organen ein [Liu et al., 2013; Zhang et al., 2006; Cicco et al. 2005; Richter et al., 2000].

1.1 Steatose

Perez-Daga et al. berichten in einer retrospektiven Studie von einer 13 bis 28-prozentigen Prävalenz von Lebersteatosis in Organspendern [Perez-Daga et al., 2006].

Lebersteatose hat verschiedene Ursachen, wie übermäßigen Alkoholkonsum, Diabetes mellitus Typ II und Adipositas. In Anbetracht der weltweiten Zunahme übergewichtiger Menschen ist zu erwarten, dass auch die Zahl von Organspendern mit Fettlebern zunehmen wird [Burke et al., 2004]. In den USA betrug die Rate übergewichtiger Menschen im Jahre 2002 35%, die adipöser Staatsbürger 30% [Flegal et al., 2002]. Die 2008 in der BRD durchgeführte Nationale Verzehrstudie hat ergeben, dass in Deutschland 2/3 der männlichen und die Hälfte der weiblichen Bevölkerung übergewichtig oder adipös sind [www.adipositas-gesellschaft.de]. In Abhängigkeit von Steatosegrad und Morphologie der Fettvakuolen wird in der Literatur von einer signifikant höheren Rate an Transplantatdysfunktionen und Transplantatversagen berichtet [Gabrielli et al., 2012; Yang et al., 2014; Verran et al., 2003; Ploeg et al., 1993; Marsman et al., 1996; Gastaca et al., 2009]. Verran et al. konnten in einer retrospektiven Studie, die 23 Patienten einschloss, zeigen, dass bei schwerer Steatose im ersten Jahr nach Transplantation der Transplantatverlust 45% betrug (Verran et al., 2003). Hierfür werden vor allem die niedrigere Ischämietoleranz und der erhöhte Ischämie-Reperfusionsschaden dieser Organe verantwortlich gemacht [Verran et al., 2003; Ploeg et al., 1993; Marsman et al., 1996; Gastaca et al., 2009].

Im Falle von steatotisch veränderten Lebern finden sich in der Literatur kontroverse Angaben zum Therapieerfolg der transplantierten Organe. Im Wesentlichen existieren die Meinungen, dass die geringgradige bzw. mikrovesikuläre Steatose [Han et al., 2014; Fishbein et al., 1997; Urena et al., 1998] keinen Einfluss auf die Organqualität und das Ergebnis der Lebertransplantation hat, wohingegen von anderen berichtet wird, dass die Transplantation von Fettlebern mit makrovesikulärer Steatose mit einem erhöhten Risiko für Organdysfunktion bzw. Organversagen einhergeht [Nemes et al., 2016; Chu et al., 2015; Gabrielli et al., 2012; Kumar, 2013; Verran et al., 2003; Ploeg et al. 1993; Marsman et al. 1996]. Bewiesen ist, dass der Schweregrad der Steatose mit der Inzidenz primärer Nichtfunktion (PNF), primärer Dysfunktion (PDF) und Patientenmortalität korreliert [Verran et al., 2003; Ploeg et al. 1993; Marsman et al. 1996; D'Alessandro et al. 1991]. Hierfür werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht. Zum einen ist bekannt, dass Fettlebern empfindlicher auf Ischämie und Reperfusion (I/R) reagieren und in diesen Organen signifikant mehr Radikale sowie entzündungsfördernde Botenstoffe produziert werden. Des Weiteren spielen eine reduzierte mitochondriale Funktion, sowie eine

geänderte Funktion von Kupfferzellen eine Rolle [Muriel, 2009; Diehl, 2002; Selzner et al., 2006; Berthiaume et al., 2009].

Qualitativ unterscheidet man zwischen mikro- und makrovesikulärer Steatose. Von makrovesikulärer Steatose spricht man, wenn wenigstens 10% der Leberparenchymzellen Fetttropfen enthalten, welche den Kern in Richtung Zellmembran verlagern. Mikrovesikuläre Steatose liegt vor, wenn mindestens 90% der Leberzellen kleine Fetteinschlüsse haben, welche die Lage des Zellkerns nicht beeinträchtigen [Gastaca, 2009].

Um den Ausprägungsgrad der Steatose zu beschreiben unterscheidet man klinisch in der Regel zwischen geringgradig (<30%), mittelgradig (30-60%) und schwer (>60%) ausgeprägter Steatose [D'Alessandro et al., 1991]. Anzumerken ist jedoch, dass es derzeit keine einheitliche histomorphologische Einteilung gibt. Eine Spenderleber gilt laut Deutscher Bundesärztekammer als marginal, wenn das Organ eine 40-prozentige makrovesikuläre Steatose aufweist [Mehrabi et al., 2008].

1.2 Verwendung protektiver Konservierungslösungen

Im klinischen Alltag werden zurzeit als Konservierungs- und Perfusionslösungen University of Wisconsin- (UW) und Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) verwendet.

Die kalte Konservierung mittels University of Wisconsin-Lösung (UW-Lösung) gilt derzeit als Goldstandard in der Lebertransplantationschirurgie [Routh et al., 2013; Feng et al., 2007; Nardo et al., 2004; Lopez-Andujar et al., 2009; Cavallari et al., 2003]. Wohingegen früher lediglich Elektrolytlösungen zur Perfusion dienten, enthält UW-Lösung eine Reihe von Substanzen, welche die Organqualität verbessern sollen. Allopurinol dient als kompetitiver Hemmstoff des Enzyms Xanthinoxidase und verhindert die Entstehung von Sauerstoffradikalen. Es wurde beobachtet, dass die hepatozelluläre Mikroarchitektur mittels Allopurinol-haltigen Konservierungslösungen signifikant besser erhalten werden konnte als mit HTK-Lösung, welche keinen Xanthinoxidasehemmstoff enthält [Corps et al., 2009].

Der Zusatz von Adenosin soll dazu führen, dass nach Wiederherstellung der Perfusion ATP als energiereiches Substrat schneller aufgebaut wird. Corps et al. zeigten jedoch beim Vergleich von UW- mit HTK- und Leeds-Lösung in einem Perfusionsversuch zu keiner Zeit höhere ATP-Spiegel in den mit UW-Lösung konservierten Lebern. Auch beim Zusatz von Adenosin zu der von der

Forschungsgruppe entwickelten Leeds-Lösung ließen sich keine höhere Konzentrationen von ATP nachweisen [Corps et al., 2009]. Die mit UW-Lösung konservierten Organe zeigten lediglich in den ersten 4 Stunden einen höheren Gehalt an Adenosin. In Fällen kurzzeitiger kalter Ischämie könnte ein Vorteil bestehen. Auch andere Arbeitsgruppen sind der Ansicht, dass der Zusatz von Substanzen nur bei kurzer kalter Ischämie sinnvoll ist, da die Aufnahmefähigkeit der kaltkonservierten Organe mit Dauer der Ischämie abnimmt [Zaouali et al., 2010].

Lactobionat und Raffinose sind weitere, hyperosmolare Bestandteile, welche aufgrund dieser Eigenschaft die Zellschwellung vermindern bzw. vollständig unterdrücken sollen [Feng et al., 2006; Southard und Belzer, 1995].

UW-Lösung ist durch eine hohe Viskosität charakterisiert. In einigen Studien wurde diese Eigenschaft für eine gestörte Mikrozirkulation insbesondere im Bereich der die kleinen intrahepatischen Gallengänge versorgenden Endarterien gemacht, was z.B. zur Ausbildung von biliären Komplikationen wie ischemic-type biliary lesions (ITBL) führen kann [Feng et al., 2007]. Bekannt ist auch, dass UW-Lösung unter Transportbedingungen relativ leicht Temperaturen unter 0°C erreicht, was dazu führen kann, dass das zugesetzte Adenosin auskristallisiert und dadurch Gefäßobstruktionen verursacht [Feng et al., 2007].

HTK-Lösung wird auf Grund ihrer geringeren Viskosität eine bessere Organperfusion, einhergehend mit einer geringeren Schädigung biliärer Endothelien und ein schnelleres „Cooling“ des Transplantats zugeschrieben [De Rougement et al., 2009; Cavallari et al., 2003]. Sie enthält im Gegensatz zur UW-Lösung keine Stoffe, welche auskristallisieren können. Des Weiteren weist HTK-Lösung eine geringere Kaliumkonzentration auf und hat damit den Vorteil, dass das transplantierte Organ nach Konservierung nicht zusätzlich gespült werden muss um Reste der Konservierungslösung zu entfernen. Dadurch verkürzt sich die warme Ischämiezeit [Feng et al., 2007; Mangus et al., 2008].

Feng et al. haben in einer Übersichtsarbeit, welche sowohl randomisierte Kontrollstudien als auch Kohortenstudien miteinschloss, die beiden Lösungen miteinander verglichen [Feng et al., 2007]. Obgleich einige Studien von häufigeren biliären Komplikationen bei Verwendung von UW-Lösung und eine höhere Galleproduktion bei den mit HTK-konservierten Lebern berichteten [Mangus et al., 2008] konnte keine Studie signifikante Unterschiede in Patienten- bzw. Transplantatüberleben, der Rate von primärer Nichtfunktion (PNF), primärer

Dysfunktion (PDF), verzögerter Transplantatfunktion (delayed graft function, DGF), akuter Abstoßung und des Transaminasenspiegels zeigen. Zu demselben Ergebnis kamen auch andere Arbeitsgruppen [Routh et al., 2013; Feng et al., 2007; Lopez-Andujar et al., 2009; Cavallari et al., 2003].

Durch den Zusatz von Substanzen wie energiereicher Phosphate, antioxidativer oder antiinflammatorischer Substrate soll die Protektionskapazität dieser Lösungen erhöht werden. Durch die Kaltlagerung der Organe, einer fehlenden O₂-Zufuhr und der damit einhergehenden limitierten Stoffwechselsituation ist jedoch die hepatozelluläre Aufnahmefähigkeit relevant eingeschränkt [Tian et al., 1998]. Zaouli et al. konnten zeigen, dass die Aufnahmefähigkeit von Leberzellen mit der Dauer der kalten Ischämie abnimmt [Zaouli et al., 2010].

Daraus lässt sich ableiten, dass sich durch den alleinigen Zusatz von protektiven Substraten zur Konservierungslösung keine signifikante Verbesserung der Spenderorganqualität erreichen lässt. Darüber hinaus wird angenommen, dass durch den Zusatz von Protektantien und der damit verbundenen zumindest partiellen Aufnahme in die Leberzelle die ohnehin begrenzten energiereichen Phosphate durch den Aufnahmeprozess verbraucht werden, was zu einer weiteren Verschlechterung der Organqualität führt [Ainscow et al., 1999].

1.3 Strategien zur Organkonservierung

Zur Verringerung des I/R-Schadens bei Lebern von nicht-herzschlagenden Organspendern (sog. non-heart-beating organ donors) wurden verschiedene Ansätze entwickelt. In der Klinik haben sie keine Relevanz, da in Deutschland keine Organe von herztoten Spendern verwendet werden. Sie sollen dennoch an dieser Stelle kurz vorgestellt werden, da sie potentielle Verfahren zur Verringerung des I/R-Schadens sind und theoretisch Alternativen zur statischen Organkonservierung bieten würden [Schön et al., 2001].

Normotherme Organperfusion

Nach dem Herztod wird dem Spender über eine Herz-Lungenmaschine (HLM) oxygeniertes Blut zugeführt, um die ATP-Synthese aufrechtzuerhalten. Nach einer Periode erfolgter Blutzirkulation wird der Körper des Organspenders über die HLM gekühlt und die Organe in üblicher Weise entnommen und kalt konserviert. Reddy et al. berichten in einer Übersichtsarbeit, dass in Versuchen mit Schweinen gezeigt werden konnte, dass das Transplantatüberleben von der Dauer der warmen

Ischämie abhängig ist und dass es durch den Einsatz der normothermen Organperfusion gesteigert werden konnte [Reddy et al., 2004].

Normotherme Organkonservierung

Nach Explantation erfolgt eine kontinuierliche Organperfusion außerhalb des Körpers. Hierzu wird ein modifizierter kardiopulmonaler Bypass verwendet. Der Vorteil dieser Methode ist ein erhaltener Leberstoffwechsel, welcher erwiesenermaßen mit einem geringeren zellulären Schaden einhergeht [Schön et al., 2001]. Zudem können Parameter wie Galleproduktion und Leberenzyme kontinuierlich erfasst werden. Schön et al. berichten, dass durch den Einsatz dieser Methode Schweinelebern, welche einer einstündigen Periode warmer Ischämie ausgesetzt waren, nach vier Stunden normothermer extrakorporaler Perfusion transplantiert werden konnten ohne dass es zu einem vorzeitigen Ableben der Empfängertiere kam. Die Schweine der Kontrollgruppe, welche Lebern, die einer einstündigen warmen Ischämie ausgesetzt waren und nicht mittels dieser Methode konditioniert wurden, starben innerhalb der ersten 24 Stunden postoperativ [Schön et al., 2001].

Kalte Organperfusion

Hier erfolgt nach Explantation ebenfalls eine kontinuierliche, wenn auch hypotherme Organperfusion. Reddy et al. berichten in einer Übersichtsarbeit, dass in Rattenversuchen gezeigt werden konnte, dass durch eine hypotherme Leberperfusion die Organfunktion und Mikrozirkulation verbessert und der zelluläre Schaden gesenkt werden konnte [Reddy et al., 2004].

1.4 Multidrug donor preconditioning

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Organqualität bei Spenderlebern ist die medikamentöse Vorbehandlung des Organspenders. Verschiedene Studien wie jene von Che et al. oder Massip-Salcedo et al. sind schwierig in den klinischen Alltag zu übertragen, da eine länger dauernde Vorbehandlung, welche sich oft über einen oder mehrere Tage erstreckt bei den hirntoten Organspendern in der Regel nicht möglich ist [Che et al., 2010; Massip-Salcedo et al., 2008]. Im Gegensatz dazu bieten kurzfristig anwendbare Präkonditionierungsmodelle einen interessanten Ansatz zur Verbesserung der Spenderorganqualität. Zahlreiche Versuche mit kurzzeitig applizierbaren Wirkstoffen vor Organexplantation beschreiben eine Verminderung

des hepatischen Ischämie-/Reperfusionsschadens [El-Ghoneimi et al., 2007; Zhang et al., 2005; Lai et al., 2008; Nagasaki et al., 1998; Smymiotis et al., 2005; Zhang et al., 2006; Arkadopoulos et al., 2010].

Ein kombinierter Einsatz verschieden wirksamer Substanzen ist ein neuer Ansatz zur Verbesserung der Leberorganqualität nach Transplantation. Dies erscheint sinnvoll, da verschiedene Pathomechanismen an der Manifestation des Ischämie-/Reperfusionsschadens beteiligt sind [Schindler et al., 2009].

Die von uns verwendeten protektiven Substanzen wurden von unserer Arbeitsgruppe bereits in Vorversuchen getestet [Moussavian et al., 2010]. Im Rattenmodell konnten wir zeigen, dass sich mittels der Präkonditionierung gemäß dem MDDP-Schema von nicht-steatotischen Lebern eine signifikante Verbesserung der Organqualität nach 24 Stunden Kallagerung in HTK-Lösung und anschließender einstündiger ex-situ Reperfusion mit Krebs-Henseleit Pufferlösung erzielen lässt. Die einzelnen Komponenten unseres Präkonditionierungsmodells wählten wir nach Recherche verschiedener experimenteller Arbeiten aus, in welchen die Substanzen bereits erfolgreich zur Leberprotektion bzw. zur Verminderung des Ischämie-/Reperfusionsschadens verschiedener Organe eingesetzt wurden.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es zu zeigen, dass die kombinierte Gabe von Pentoxifyllin, Glycin, Deferoxamin, Simvastatin, N-Acetylcystein, Erythropoietin und Melatonin im Sinne einer multimodalen medikamentösen Spenderpräkonditionierung (MDDP, multidrug donor preconditioning) vor Leberexplantation und kalter Konservierung die Organqualität steatotischer Lebern effektiv verbessern und den Ischämie-/Reperfusionsschaden signifikant senken kann. Gleichzeitig soll das Verfahren unkompliziert in der Anwendung und ohne aufwendige Vorbereitung kurzfristig applizierbar sein, sodass ein Transfer in den klinischen Alltag möglich ist.

2 Material und Methoden

2.1 Tiermodell und Fettleberinduktion

Die Versuche wurden nach Genehmigung der zuständigen Tierschutzbehörde entsprechend internationaler Vorgaben für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren durchgeführt (NIH publication 86-23, revised 1985).

Als Versuchstiere wurden Sprague Dawley-Ratten beider Geschlechter mit einem Gewicht zwischen 250 und 300 Gramm verwendet. Die Steatoseleber wurde mittels des Diätprotokolls von Delzenne et al. induziert [Delzenne et al., 1997]. Die Tiere fasteten hierzu über einen Zeitraum von zwei Tagen mit freiem Zugang zu Wasser und erhielten anschließend eine kohlenhydratreiche, fettfreie Diät (Altromin C1000, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) über drei Tage. Dies resultierte in einer Störung der hepatischen Lipidhomöostase und Akkumulation von Fett in den Hepatozyten. Mittels dieser Vorbehandlung konnte eine 50-prozentige makrovesikuläre Steatose induziert werden.

2.2 Narkose, Operation und Konservierung

Die Tiere wurden zunächst mit CO₂ vorsediert, anschließend erfolgte die intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (50mg/kg KG i.p. (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland)). Nach Ausfallen des Zwischenzehenreflexes wurden die Ratten an der Körpervorderseite rasiert und auf dem Operationstisch fixiert. Hier erfolgte eine nochmalige Überprüfung der Schmerzreflexe.

Zunächst wurde zur Erleichterung der Spontanatmung eine Tracheotomie durchgeführt. Danach erfolgte das Aufsuchen und die Präparation der rechten A. carotis communis. Die A. carotis communis diente als zentraler Zugang, um die entsprechenden MDDP-Substanzen bzw. NaCl 0,9% und Heparin intravasal applizieren zu können. Das Gefäß wurde hierzu distal ligiert und proximal mit einer Minibulldogklemme temporär verschlossen. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Gefäßes und die Katheterisierung. Nach Entfernung der Bulldogklemme wurde der Katheter bis zur Aorta vorgeschoben und mittels Ligatur fixiert. Über diesen Zugang erfolgte nun die systemische Antikoagulation mit 500 I.E. Heparin. Bei den nicht-steatotischen Kontrolltieren schloss sich direkt eine mediane Laparotomie an. Mittels Wundhaken wurde das Abdomen offen gehalten; die Blutstillung erfolgte mit einem Bipolarkoagulator bzw. Umstechung der epigastrischen Gefäße (PDS 6.0).

Anschließend erfolgte das Aufsuchen des Ductus choledochus und dessen Kanülierung, um Galleflüssigkeit während der Operation und später während der Reperfusion sammeln zu können. Anhand der Menge der sezernierten Galleflüssigkeit erhielten wir ein Maß für die exkretorische Leberfunktion. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde dann Galleflüssigkeit aufgefangen und nach Leberexplantation gewogen. Nach Auffinden der A. hepatica propria wurde um das Gefäß eine Ligatur vorgelegt (PDS 6.0), um das Gefäß am Ende der Operation einfacher verschließen zu können. Dies war notwendig, um einen ausschließlich über die V. cava inferior stattfindenden Abfluss der Perfusionslösung und damit bei Zufluss über die Pfortader eine vollständige Leberperfusion zu erreichen. Anschließend wurden Aorta abdominalis und die untere Hohlvene vorsichtig freipräpariert und umstochen. Die Aorta wurde knapp oberhalb der iliacalen Bifurkation ligiert und unterhalb des Abganges der oberen Mesenterialarterie geklemmt. Dann erfolgte die Katheterisierung mittels einer Venenverweilkanüle (Durchmesser 1,3mm) und deren Fixierung mittels zweier Haltenähte. Anschließend wurde der Thorax eröffnet, die thorakale Aorta geklemmt und unmittelbar darauf die Perfusion mit HTK-Lösung über den aortalen Katheter (Custodiol®, Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) gestartet. Zur isolierten Leberperfusion wurden zügig die obere und untere V. cava eröffnet und die Leber mit 100ml 4°C kalter HTK-Lösung perfundiert.

Nach Beendigung des Leberflushings wurde die A. hepatica propria ligiert, die Pfortader und die inferiore infrahepatische V. cava mittels Venenverweilkanülen katheterisiert (Durchmesser jeweils 2,2 mm) und die inferiore suprahepatische V. cava mittels Ligatur verschlossen. Die Leber wurde nun vorsichtig von ihren ligamentären Strukturen gelöst, entnommen, gewogen und in 100ml 4°C kalter HTK-Lösung 24h lang konserviert.

Bei den steatotischen Tieren (FL-MDDP, FL-Kontrolle) erfolgte nach Heparinapplikation zur systemischen Antikoagulation via Karotiskatheter die Gabe der Substanzen bzw. die Gabe isovolumetrischer Mengen an NaCl 0,9%. Hierbei erfolgte die MDDP-Applikation in gleichbleibender Reihenfolge bei allen Versuchstieren intraarteriell von Pentoxifyllin, Glycin und Desferoxamin, intragastral von Simvastatin sowie intraperitoneal von N-Acetylcystein, Erythropoietin und Melatonin. Zur intragastralen und intraperitonealen MDDP-Gabe wurde eine kleine Oberbauchinzision zur Substanzenapplikation durchgeführt. Nach einer Einwirkdauer

von 30 Minuten schlossen sich die oben beschriebene Laparotomie und Leberexplantation an.

2.3 Die isolierte Leberperfusion

Nach 24h kalter Konservierung wurden die Lebern über einen Zeitraum von 60 Minuten über die Pfortader in einem nicht rezirkulierenden System reperfundiert [Moussavian et al., 2009]. Als Perfusionsmedium wurde Krebs-Henseleit Bikarbonat Puffer (KHB) verwendet, eine Lösung, deren Elektrolytzusammensetzung im Wesentlichen der des Blutes entspricht.

Um den Einwaagefehler möglichst gering zu halten, wurde vor jeder Reperfusion ein Volumen von 5l Krebs-Henseleit Bikarbonat Pufferlösung angesetzt. Hierzu wurden die entsprechenden Chemikalien in 5l destilliertem Wasser gelöst, mittels einer Heizplatte erwärmt (60-70°C) und über einen Zeitraum von 25 Minuten mittels Magnetstift gerührt. Die Lösung enthielt im Einzelnen NaCl (34,5g), KCl (1,8g), KH_2PO_4 (0,815g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,48g), CaCl_2 (1,105g) und NaHCO_3 (10,5g). Es ergaben sich als Molaritäten 118mmol NaCl, 4,8mmol KCl, 1,2mmol KH_2PO_4 , 1,2mmol $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5mmol CaCl_2 und 25mmol NaHCO_3 .

Die Perfusionslösung wurde mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2) begast. Um die Reperfusion einer normalen Herz-Kreislauffähigkeit nachzuempfinden, erfolgte diese mittels einer pulsatilen Perfusionspumpe (Beta/4, ProMinent, Heidelberg, Deutschland), deren Flussrate 2ml/min*g Lebergewebe betrug. Während der gesamten Reperusionszeit wurde der portalvenöse Druck gemessen.

Nach 1 Minute, 30 Minuten und 60 Minuten Perfusion erfolgte eine Probeentnahme des Effluates aus dem V. cava Katheter.

2.4 Proben

Intraoperativ wurde über einen Zeitraum von 10 Minuten die in-situ Galleproduktion gemessen. Während der Reperfusion wurde die von der Leber ex-situ produzierte Galleflüssigkeit kontinuierlich gesammelt und nach jeweils 30 und 60 Minuten gewogen. Das Volumen der Galleflüssigkeit wurde auf das Gramm Lebergewebe umgerechnet [$\mu\text{l}/\text{min} \cdot \text{g}$ Lebergewebe].

Nach erfolgter Leberexplantation wurde das Organgewicht bestimmt. Dies erfolgte zudem nach 24h kalter Konservierung und nach erfolgter ex-situ Reperfusion.

Zu Beginn der Reperfusion sowie nach 30 und 60 Minuten erfolgte die Bestimmung von Kalium, pH-Wert, Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck und Sauerstoffsättigung in In- und Effluat mittels Blutgasanalysegerät (Rapidlab 855, Bayer Health Care, Fernwald, Deutschland).

Die Konzentrationen der im Effluat vorhandenen Zytokine Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α wurden nach 1 Minute, 30 und 60 Minuten der Reperfusion mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Die Bestimmung erfolgte gemäß der Angaben des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden Nordenstadt, Deutschland). Zu denselben Zeitpunkten erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung von Malondialdehyd nach Angaben des Herstellers (MDA; DigiScan, Asys Hitech, Deelux Labortechnik, Gödendorf, Deutschland).

Ebenfalls im Effluat bestimmt wurden die Konzentrationen der Enzyme Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Lactat-Dehydrogenase (LDH) sowie als Cholestaseparameter die Konzentrationen an totalem Bilirubin (TBIL), alkalischer Phosphatase (ALP), γ -Glutamyl-Transferase (GGT) und die Menge des freigesetzten Totalproteins (TP). Dies erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums Homburg/Saar mittels der Methode der spektrophotometrischen Technik.

2.5 Histologie und Immunhistochemie

Es wurden verschiedene Histologien und Immunhistochemien ausgewertet, um eine Aussage über die zelluläre Stressreaktion, den apoptotischen Zelltod, die hepatozelluläre Vakuolisierung und die Leukozyteninvasion zu gewinnen. Hierzu wurde das Lebergewebe nach Reperfusion 2-3 Tage lang in 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 5 μ m dicke Schnitte gefertigt und gefärbt. Pro Objektträger und Färbung wurden jeweils 20 High-Power Felder ausgezählt.

Zur Beurteilung der Leukozyteninvasion in das Lebergewebe erfolgte die Anfärbung neutrophiler Granulozyten mit der Naphthol-AS-D-Chloroacetatesterase (CAE) Technik. Die Neutrophilen konnten danach durch ein leuchtend-rotes Farbsignal identifiziert werden. Es wurden 20 High-Power Felder unter dem Lichtmikroskop (40 x Objektiv, 0,65 numerische Apertur) ausgewertet und die CAE-positiven Zellen in Prozent zu der Gesamtzellzahl angegeben.

Zur Untersuchung des apoptotischen Zelltods wurde eine TUNEL (terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) Färbung durchgeführt. Hierzu wurden 5µm dicke Schnitte aus den paraffinierten Gewebestücken gefertigt und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen und gemäß Anleitung des Herstellers (ApopTag, Chemicon International Inc., CA, USA) angefärbt. Die apoptotischen Zellen stellten sich orange-rot dar und wurden in 20 High-Power Feldern (40 x Objektiv, 0,65 numerische Apertur) ausgezählt und deren prozentualer Anteil in Verhältnis zur Gesamtheptozytenzahl angegeben. Darüber hinaus erfolgte eine zweite immunhistochemische Untersuchung zur Erfassung des apoptotischen Zelltods mittels der cleaved Caspase-3 Bestimmung. Hierbei wurde die Aktivierung der cleaved Caspase-3 unter Anwendung von indirekten Immunperoxidasetechniken sichtbar gemacht. Zunächst wurden die entparaffinierten Schnitte mit 3% H₂O₂ und 2% Ziegen Serum inkubiert, um die endogenen Peroxidasen und die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Als Primärantikörper diente ein polyklonaler anti-cleaved Caspase-3 Antikörper vom Kaninchen (1:100, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland). Als Sekundärantikörper wurde ein mit Peroxidase markierter Ziegen anti-Kaninchen IgG Antikörper verwendet. Als Chromogen diente 3,3'-Diaminobenzidin (DakoCytomation, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Schnitte mit Hemalaun gegengefärbt. Die cleaved Caspase-3 exprimierenden Zellen konnten anschließend an einem gelben Farbsignal identifiziert werden und wurden in 20 High-Power Feldern (40 x Objektiv, 0,65 numerische Apertur) ausgezählt und ihr prozentualer Anteil zur Gesamtheptozytenzahl angegeben. Zur Sichtbarmachung der steatotischen Leberzellen erfolgte eine Fettfärbung mittels Sudan Rot 7b (Janssen Chimica, Belgien). Hierzu wurde natives Lebergewebe direkt nach Reperfusion in flüssigem Stickstoff fixiert und in einer Dicke von 6µm (Schneidegerät: Microm HM 560) geschnitten. Es zeigte sich in den Fettlebergruppen eine makrovesikuläre Steatose, welche histologisch dadurch gekennzeichnet ist, dass durch die im Zytoplasma gelegenen Fettvakuolen der Kern in die Zellperipherie verlagert wird. Der Grad der makrovesikulären Steatose wurde durch die Sudan Rot-positiven Zellen in Relation zur Gesamtheptozytenzahl ermittelt.

2.6 Western Blot Analyse

Nach Reperfusion wurde natives Lebergewebe entnommen und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Die Lagerung des Gewebes erfolgte bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C. Anschließend wurde das Gewebe in Lysepuffer, welcher zuvor mit einem Proteaseinhibitor Cocktail (1:100 v/v, Sigma Altrich, Taufkirchen, Deutschland) versehen wurde, mechanisch homogenisiert. Der Lysepuffer setzte sich wie folgt zusammen: 10mM Tris, 10mM NaCl, 0,1mM Ethylendiamintetraessigsäure, 0,5% Triton-X 100, 0,02% NaN₃, 0,2mM Phenylmethylsulfonylfluorid. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten auf Eis inkubiert und für weitere 30 Minuten bei 16000xg und bei 4°C zentrifugiert (Biofuge fresco, Kendro, Hanau, Deutschland). Anschließend wurden die Überstände abpipettiert und Aliquots bis zur weiteren Proteinbestimmung bei -20°C kryokonserviert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit Hilfe der Lowry Methode mit Rinderserumalbumin als Standard ermittelt. Im weiteren Verlauf erfolgte die Proteindenaturierung. Hierzu wurden zunächst die Proteinextrakte mit Aqua dest. verdünnt, sodass die Proteinkonzentration bei 2µg Protein/µl Lösung lag. Danach wurden die Extrakte mit 2x 'Sample Buffer' nach Laemmli (4% SDS, 20% Glycerin, 10% β-Mercaptoethanol, 0,004% Bromphenolblau, 0,125M TRIS-HCl pH=6,8; Sigma Altrich) versetzt und 5min im kochenden Wasserbad erhitzt. Hiernach erfolgte entweder die Kryokonservierung bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung oder die sofortige Verarbeitung.

Die Western Blot Analyse erfolgte als eindimensionale SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und es wurden pro Gruppe jeweils 4 Proben analysiert. Diese wurden mit einer Konzentration von jeweils 30µg Protein in die Geltaschen des 10% Natriumdodecyl-sulfatpolyacrylamidgels aufgetragen und diskontinuierlich in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini-Protean II, BioRad, München, Deutschland) in einem TRIS/Glycinpuffer (0,125M Tris Base, 0,96M Glycin, 0,5% SDS, Roth, Karlsruhe, Deutschland) entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Dies geschah mit einer Niederspannung von zunächst 100V für 15min und anschließend 140V für 60min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entnommen und für das sich anschließende Membranblotting in einem Transpufferbad (12mM TRIS Base, 96mM Glycin; Roth) äquilibriert. Danach erfolgte der Transfer auf eine Polyvinylendifluoridmembran (BioRad). Die Membranen wurden nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 3 Stunden

bei Raumtemperatur mit Kaninchen-anti-Ratte-NF κ B(p65) Antikörper (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) als primärer Antikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper diente im Anschluss ein HRP-konjugierter Esel-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (1:5000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland), mit welchem die Membranen 90min lang inkubiert wurden. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels der Chemilumineszenz-Methode auf einem Blaulicht-sensitiven Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) sichtbar gemacht. Danach wurden die Signale densitometrisch bestimmt und zur Korrektur auf gleiche β -Aktin-Konzentrationen (1:5000 monoklonaler Maus Anti- β -Aktin Antikörper, Sigma Altrich) normiert. Im Anschluss wurden die Röntgenfilme mit dem Gel-Dokumentationssystem (Gel Doc) und dem Quantifizierungsprogramm 'Quantity One- Geldoc' (BioRad) ausgewertet.

2.7 Lipidperoxidation

Als Maß für den oxidativen Stress wurde die Bildung von Malondialdehyd (MDA) bestimmt. MDA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Hierzu wurde das Perfusat zum Zeitpunkt 1 Minute, 30 und 60 Minuten der Reperfusion entnommen, in flüssigem Stickstoff fixiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Anschließend wurde das Probenmaterial mit 10-prozentiger Trichloroacetatsäure im Verhältnis 1:3 auf Eis inkubiert, um die Eiweiße zu denaturieren. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 2200xg an. Der dabei entstandene Überstand wurde im Verhältnis 1:2 mit 0,67-prozentiger Thiobarbituratsäure vermischt und im kochenden Wasserbad 10 Minuten lang erhitzt. Nach dem Abkühlen der Proben erfolgte die Messung des Absorptionsvermögen in einem Bereich von 550nm mittels eines Elisareaders (DigiScan, Asys Hitech, Deelux Labortechnik, Gödendorf, Deutschland). Zur Etablierung der Standardkurve wurde die Thiobarbituratsäure-Reaktion in Konzentrationen zwischen 0 und 100 μ mol gemessen.

2.8 Experimentelles Protokoll

Es wurden drei Gruppen zu jeweils acht Tieren miteinander verglichen. Im Einzelnen waren dies eine nicht mittels MDDP präkonditionierte Gruppe von Ratten, welche nicht-steatotisch veränderte Lebern hatte (Kontrolle), sowie zwei Gruppen von Ratten mit steatotischen Lebern, von denen eine nicht mittels MDDP (FL-Kontrolle) und eine mittels MDDP präkonditioniert wurde (FL-MDDP). Die Steatose wurde nutritiv 5 Tage

vor Versuchsbeginn induziert. Dieser Schritt entfiel bei der nicht-steatotischen Kontrollgruppe. Die OP erfolgte am nüchternen Tier am 6. Tag nach Beginn der nutritiven Fettleberinduktion der Gruppen FL-Kontrolle und FL-MDDP. Die Tiere der Kontrollgruppe waren ebenfalls seit dem Vorabend nüchtern. Nach Narkotisieren der Tiere erfolgte die Operation, beginnend mit dem Legen eines intraarteriellen Zugangs in die A. carotis communis zur Heparinapplikation bei allen drei Gruppen und zur intraarteriellen Gabe von 50mg/kgKG Pentoxifyllin (PTX, Trental®, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland) in 0,67 ml NaCl 0,9%, 100mg/kgKG Glycin und 30mg/kgKG Deferoxamin (Desferal®, Novartis, Basel, Schweiz) in 1,0ml Aqua dest. bei der Gruppe FL-MDDP sowie der isovolumetrischen Gabe von NaCl 0,9% bei der FL-Kontrollgruppe. Bei der Kontrollgruppe schloss sich nach Heparinapplikation direkt die Leberexplantation an. Bei den Gruppen FL-MDDP und FL-Kontrolle erfolgte über eine kleine Inzision im Oberbauch die Injektion von 5mg/kgKG Simvastatin (Simva HEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) in 0,67ml 100% Ethanol bzw. die isovolumetrische Menge an NaCl 0,9% in den Magen. Darüber hinaus erfolgte die intraperitoneale Gabe von 150mg/kgKG N-Acetylcystein (Fluimucil®, Pierre Fabre Pharma, Freiburg, Deutschland) in 0,67ml NaCl 0,9%, 1000I.E. Erythropoietin (Epoetin alfa HEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland) und 10mg/kgKG Melatonin (Sigma Aldrich Chemie Holding GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in 0,67ml 20% Ethanol in der FL-MDDP Gruppe bzw. die isovolumetrischen Mengen an NaCl 0,9% in der Gruppe FL-Kontrolle (Tabelle 1). Die Substanzen wirkten über einen Zeitraum von 30 Minuten ein, dann erfolgte die Leberexplantation. Nach Abschluss der Operation wurden die explantierten Lebern aller drei Gruppen über einen Zeitraum von 24h in 4°C kalter HTK-Lösung konserviert. Danach erfolgte die ex-situ Reperfusion mit Krebs-Henseleit Puffer über einen einstündigen Zeitraum. 1 Minute nach Beginn der Reperfusion sowie nach 30 und 60 Minuten wurden Proben des Leberperfusates gesammelt, um oben genannte Analysen durchzuführen. Anschließend erfolgte die Konservierung des Lebergewebes zur Histologie in Formalin sowie zur Western Blot Analyse in flüssigem Stickstoff.

Tabelle 1

Substanz	Applikationsart	Dosierung	Wirkung
Glycin	intraarteriell, in 0,33ml NaCl 0,9%	100mg/kgKG	antiapoptotisch, Senkung der Freisetzung von TNF- α
Pentoxifyllin (PTX, Trental®, Sanofi-Aventis, Frankfurt, Deutschland)	intraarteriell, in 0,67ml NaCl 0,9%	50mg/kgKG	Inhibition der Kupfferzellaktivität, Senkung der Freisetzung von TNF- α
Deferoxamin (Desferal®, Novartis, Basel, Schweiz)	intraarteriell, in 1,0ml Aqua dest	30mg/kgKG	antioxidativ, Hemmung der Fenton- Reaktion
Simvastatin (SimvaHEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland)	intragastral, in 0,67 ml Ethanol 100%	5mg/kgKG	antiinflammatorisch, antioxidativ
N-Acetylcystein (Fluimucil®, Pierre Fabre Pharma, Freiburg, Deutschland)	intraperitoneal, in 0,67ml NaCl 0,9%	150mg/kgKG	antiinflammatorisch, Supplementierung v. Cystein → Glutathion
Melatonin (Sigma Aldrich Chemie Holding GmbH, Deutschland)	intraperitoneal, in 0,67ml Ethanol 20%	10mg/kgKG	antioxidativ
Erythropoietin (EpoetinalfaHEXAL®, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland)	intraperitoneal	1000 I.E.	antioxidativ, antiapoptotisch, Senkung der Freisetzung von TNF- α

Tabelle 1. Übersicht über die Substanzen des multidrug donor preconditioning-Schemas (MDDP), einschließlich Applikationsart, Dosierung und Wirkung.

2.9 Statistik

Die erfassten Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. Nach Überprüfung von Normalverteilung und Homogenität der Gruppen wurde eine

Varianzanalyse (ANOVA) sowie ein Dunnett post-hoc Test durchgeführt. Dieser beinhaltete eine Korrektur des α -Fehlers entsprechend Bonferroni, um für multiple Vergleiche zu kompensieren. Als Software wurde SigmaStat (Jandel Scientific, CA, USA) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert $<0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Galleproduktion

Die in-situ Gallemessung erfolgte über einen Zeitraum von 20 Minuten und wurde in $\mu\text{L/g Lebergewebe} \cdot \text{min}$ angegeben. Es zeigte sich, dass bei Fettlebertieren durch die Gabe der MDDP-Substanzen eine gegenüber den Fettleberkontrollen signifikante Erhöhung der Gallesekretion erzielt werden konnte (Tabelle 2). Während der Reperfusion wurde die Galleproduktion in den Zeiträumen von 0 bis 30 und von 30 bis 60 Minuten gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Gallesekretion beider steatotischer Gruppen gegenüber der gesunden Kontrolle verringert war. Dennoch wies die Fettlebergruppe, die mit MDDP vorbehandelt wurde, eine um etwa 50% höhere Gallesekretion im Vergleich zur unbehandelten Fettlebergruppe auf, auch wenn das Ergebnis nicht signifikant war (Abbildung 1, Tabelle 2).

Abbildung 1

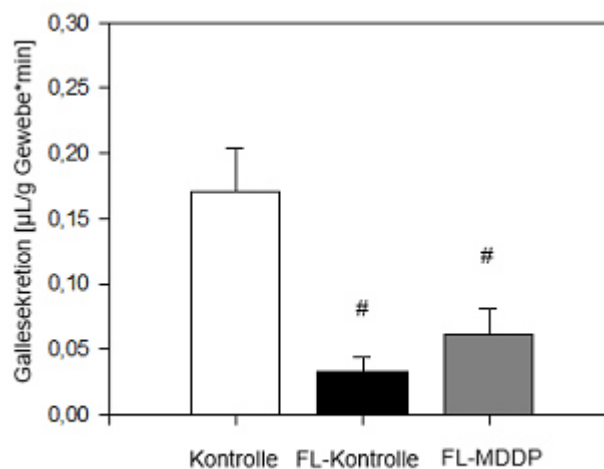


Abbildung 1. Ex-situ Galleproduktion nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor für 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumetrische Mengen NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). Mittelwert $\pm$ SEM (n=8 in jeder Gruppe). # $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Tabelle 2

Galleproduktion in situ ($\mu\text{l/gLG/min}$)	20min	Galleproduktion ex-situ ($\mu\text{l/gLG/min}$)	30min	60min
Kontrolle	0,97 $\pm$ 0,09	Kontrolle	0,10 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,03
FL-Kontrolle	0,77 $\pm$ 0,06	FL-Kontrolle	0,03 $\pm$ 0,01 [#]	0,03 $\pm$ 0,01 [#]
FL-MDDP	1,22 $\pm$ 0,09 [*]	FL-MDDP	0,05 $\pm$ 0,02 [#]	0,06 $\pm$ 0,02 [#]

Tabelle 2. Galleproduktion der Lebern der Kontrollgruppe, FL-Kontrolle und FL-MDDP in-situ nach 20 Minuten, sowie Galleproduktion ex-situ nach 30 und 60 Minuten Reperfusion. Mittelwert $\pm$ SEM (n=8 in jeder Gruppe). [#] p<0,05 vs. Kontrolle, ^{*} p<0,05 vs. FL-Kontrolle

3.2 Malondialdehyd

Die Messung des im Effluats enthaltenen Malondialdehyds (MDA) als Marker der Lipidperoxidation der Zellmembran erfolgte zum Zeitpunkt 1 Minute, sowie nach 30 und 60 Minuten Reperfusion. Die Konzentration wurde hierbei in $\mu\text{mol/l}$ angegeben. Zu Beginn der Reperfusion zeigte sich in der Fettleberkontrollgruppe (FL-Kontrolle) gegenüber der nicht-marginalen Kontrollgruppe (Kontrolle) eine signifikant höhere Konzentration von MDA. Das Effluat der FL-MDDP Gruppe hingegen wies eine signifikant geringere MDA-Konzentration auf als die Fettleberkontrollgruppe. Im Vergleich mit der nicht-steatotischen Kontrollgruppe zeigte sie keinen Unterschied. Dasselbe Ergebnis ergab sich auch nach 30 Minuten Reperfusion (Tabelle 3).

Nach 60 Minuten war die MDA-Formation in der Fettleberkontrollgruppe noch immer gegenüber der Kontrolle erhöht, jedoch bestand kein statistisch signifikanter Unterschied mehr. In der FL-MDDP Gruppe zeigte sich auch nach dieser Zeit eine signifikante Reduktion der MDA-Konzentration verglichen mit der Fettleberkontrollgruppe (Abbildung 2, Tabelle 3).

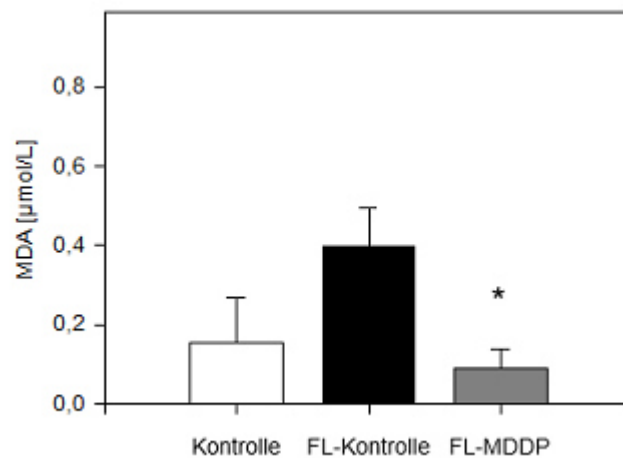
Abbildung 2

Abbildung 2. MDA-Bildung nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumetrische Mengen NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). Mittelwert $\pm$ SEM (n=8 in jeder Gruppe). * $p < 0,05$ vs. FL-Kontrolle

Tabelle 3

MDA (μmol/l)	1min	30min	60min
Kontrolle	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,11
FL-Kontrolle	0,40 $\pm$ 0,11 [#]	0,33 $\pm$ 0,08 [#]	0,40 $\pm$ 0,10
FL-MDDP	0,07 $\pm$ 0,05*	0,07 $\pm$ 0,04*	0,09 $\pm$ 0,05*

Tabelle 3. MDA-Bildung der Lebern der Kontrollgruppe, FL-Kontrolle und FL-MDDP nach 1 Minute, 30 und 60 Minuten Reperfusion. Mittelwert $\pm$ SEM (n=8 in jeder Gruppe). [#] $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. FL-Kontrolle

3.3 Zytokine

Als Parameter der Entzündungsreaktion erfolgte die Messung der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α . Ein ELISA des Effluats wurde nach 1 Minute sowie nach 30 und 60 Minuten Reperfusion durchgeführt und die jeweilige Konzentration des gemessenen Zytokins in pg/mg Protein angegeben.

Zu allen drei Zeitpunkten der Reperfusion imponierte in der Gruppe FL-Kontrolle eine gegenüber der Kontrolle signifikant höhere Konzentration von IL-1 im Effluat, in der FL-MDDP Gruppe hingegen war kein relevanter Unterschied zu den gesunden Lebern erkennbar. Es zeigte sich, dass durch die Präkonditionierung mittels MDDP eine signifikante Reduktion der IL-1-Freisetzung in der FL-MDDP Gruppe zu jedem der analysierten Zeitpunkte erzielt werden konnte (Abbildung 3, Tabelle 4).

MDDP reduzierte zu allen Zeitpunkten die Freisetzung von IL-6 und TNF- α gegenüber der FL-Kontrolle, allerdings waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (Tabelle 4).

Abbildung 3

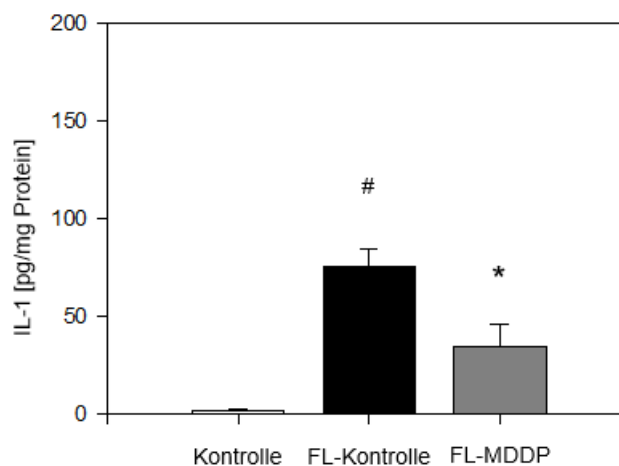


Abbildung 3. IL-1-Freisetzung nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumetrische Mengen NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). Mittelwert $\pm$ SEM ($n=8$ in jeder Gruppe). # $p<0,05$ vs. Kontrolle, * $p<0,05$ vs. FL-Kontrolle

Tabelle 4

	1min	30min	60min
IL-1 (pg/mg Protein)			
Kontrolle	9,7±4,7	4,1±2,5	1,7±1,0
FL-Kontrolle	122,2±21,6 [#]	91,7±16,1 [#]	74,9±9,7 [#]
FL-MDDP	65,4±18,8 [*]	48,5±13,2 [*]	34,3±11,3 [*]
IL-6 (pg/mg Protein)			
Kontrolle	399,0±99,5	337,9±153,0	481,7±189,5
FL-Kontrolle	764,3±206,2	625,5±155,3	531,4±117,6
FL-MDDP	329,4±61,6	296,0±72,7	194,4±47,1
TNF-α (pg/mg Protein)			
Kontrolle	180,5±70,6	118,0±75,2	179,2±79,6
FL-Kontrolle	135,4±118,8	175,3±90,2	144,9±45,5
FL-MDDP	62,0±34,9	88,9±28,9	63,9±36,2

Tabelle 4. Freisetzung der Zytokine IL-1, IL-6 und TNF-α nach 1 Minute, 30 und 60 Minuten Reperfusion. Mittelwert ± SEM (n=8 in jeder Gruppe). [#] p<0,05 vs. Kontrolle, ^{*} p<0,05 vs. FL-Kontrolle

3.4 Enzymanalyse

Die Konzentrationen der Enzyme ALAT, ASAT, GLDH und LDH wurden im Effluat zu den Zeitpunkten 1 Minute, 30 und 60 Minuten bestimmt.

3.4.1 ALAT/ ASAT

Zu Beginn der Reperfusion waren ASAT und ALAT in Fettlebern und präkonditionierten Fettlebern gegenüber der nicht-marginalen Kontrollgruppe leicht, aber nicht signifikant erhöht. Nach 30 Minuten Reperfusion wiesen beide Steatosegruppen eine gegenüber der nicht steatotischen Kontrolle signifikant erhöhte Freisetzung von ASAT und ALAT auf. Nach 60 Minuten Reperfusion zeigte die präkonditionierte Fettlebergruppe gegenüber der steatotischen Kontrolle eine signifikante Reduktion der ASAT- bzw. ALAT-Freisetzung, wohingegen die nicht-

präkonditionierten Steatoselebern eine unverändert hohe Freisetzung beider Transaminasen aufwiesen (Abbildung 4, Tabelle 5).

Abbildung 4

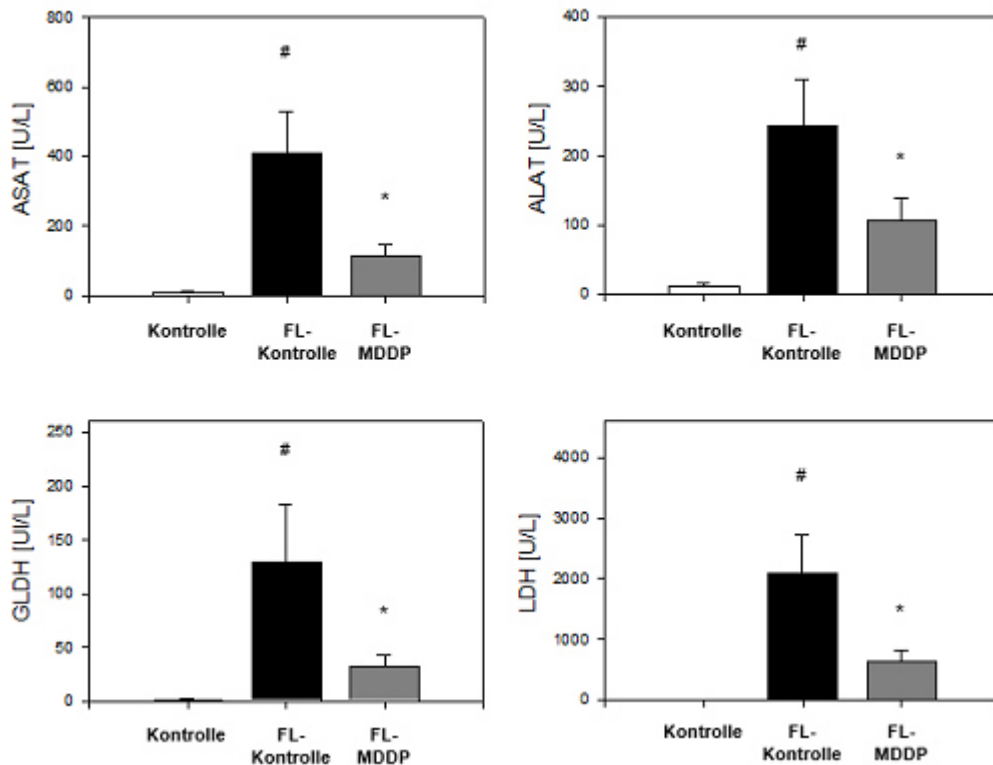


Abbildung 4. Freisetzung von ASAT, ALAT, GLDH und LDH nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumetrische Mengen NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). Mittelwert $\pm$ SEM (n=8 in jeder Gruppe). # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. FL-Kontrolle

3.4.2 LDH

Die LDH-Freisetzung war zu Beginn der Reperfusion beider Steatosegruppen gegenüber der Kontrolle erhöht, wobei das Ergebnis nicht signifikant war. Nach 30 Minuten Reperfusion war die LDH-Freisetzung in beiden Fettlebergruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Nach 60 Minuten war die freigesetzte Menge an LDH der Fettleberkontrollgruppe gegenüber der nicht-steatotischen Kontrollgruppe noch immer signifikant erhöht. Die präkonditionierten Fettlebern zeigten jedoch nach dieser Zeit verglichen mit den Organen der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied in der LDH-Freisetzung mehr.

Gegenüber den steatotischen Kontrolllebern konnte in der präkonditionierten Gruppe eine signifikante Reduktion der Enzymfreisetzung erreicht werden (Abbildung 4, Tabelle 5).

3.4.3 GLDH

Zum Zeitpunkt 1 Minute konnte zwischen den beiden Fettlebergruppen und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der GLDH-Konzentrationen des Effluates festgestellt werden. Nach 30 Minuten wies die FL-Kontrollgruppe eine gegenüber der nicht-steatotischen Kontrolle signifikant höhere Freisetzung von GLDH auf.

Auch nach 60 Minuten Reperfusion blieb die Enzymfreisetzung in der nicht-präkonditionierten Steatosegruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die FL-MDDP Gruppe zeigte nach 60 Minuten eine signifikante Reduktion der LDH-Ausschüttung verglichen mit der Fettleberkontrollgruppe. Verglichen mit der nicht-marginalen Kontrollgruppe zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildung 4, Tabelle 5).

Tabelle 5

Parameter (U/l)	1min	30min	60min
ALAT (U/l)			
Kontrolle	130,4±27,9	6,9±4,3	10,8±6,5
FL-Kontrolle	218,5±45,6	188,5±36,7 [#]	243,1±66,4 [#]
FL-MDDP	159,4±58,7	206,1±59,0 [#]	106,7±31,1 [*]
ASAT (U/l)			
Kontrolle	159,6±33,5	11,2±3,7	9,9±4,7
FL-Kontrolle	301,0±75,0	286,3±76,2 [#]	409,3±120,3 [#]
FL-MDDP	139,5±47,2	261,2±82,9 [#]	117,2±29,7 [*]
LDH (U/l)			
Kontrolle	1092,9±144,4	20,2±13,8	3,4±1,2
FL-Kontrolle	1850,9±445,1	1587,5±411,8 [#]	2099,0±626,5 [#]
FL-MDDP	1231,1±389,6	1229,2±404,5 [#]	635,6±181,3 [*]
GLDH (U/l)			
Kontrolle	20,6±3,2	2,0±0,5	1,6±0,5
FL-Kontrolle	31,4±11,5	97,0±44,2 [#]	129,6±53,9 [#]
FL-MDDP	9,1±2,4	47,7±15,0	32,0±11,2 [*]

Tabelle 5. Freisetzung der Enzyme ALAT, ASAT, LDH und GLDH nach 1 Minute, 30 und 60 Minuten Reperfusion. Mittelwert ± SEM (n=8 in jeder Gruppe). [#] p<0,05 vs. Kontrolle, ^{*} p<0,05 vs. FL-Kontrolle

3.5 Steatose

Um die Homogenität innerhalb der Fettleberggruppen zu verifizieren wurde eine Fettfärbung mit Sudan-Rot durchgeführt. Sowohl die Lebern der FL-Kontrolle, als auch die der FL-MDDP Gruppe zeigten einen Anteil makrovesikulärer Steatose von rund 50% (Abbildung 5). Die Lebern der Kontrolltiere wiesen keinerlei sichtbare Fettvakuolen auf.

Abbildung 5

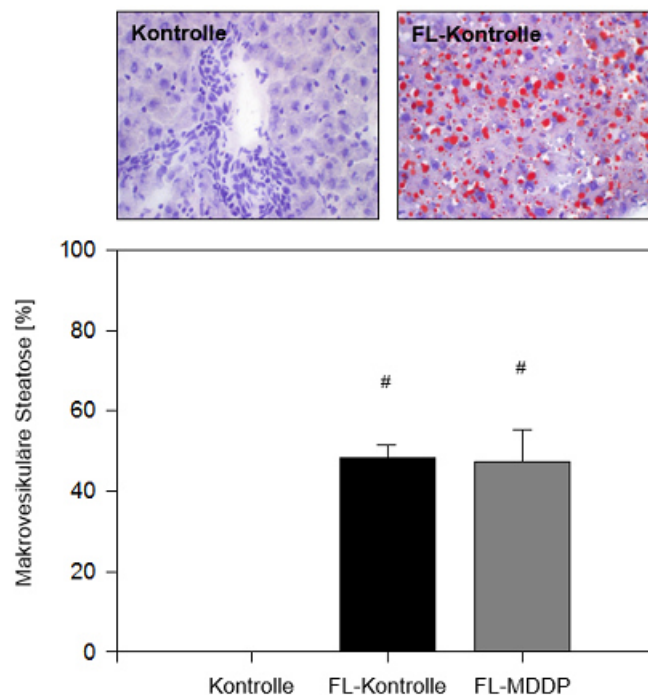


Abbildung 5. Sudan-Rot-Färbung (Fettnachweis) zur quantitativen Analyse der Steatoseinduktion; links: Histologie einer nicht-steatotischen Leber der Kontrollgruppe, rechts: Histologie einer Fettleber der Gruppe FL-MDDP (exemplarisch). Mittelwert $\pm$ SEM ($n=8$ in jeder Gruppe). [#] $p<0,05$ vs. Kontrolle

3.6 Apoptose

Die Apoptoserate wurde über eine immunhistochemische cleaved Caspase-3- sowie über eine TUNEL-Färbung ermittelt. Die Angabe der damit detektierten apoptotischen Hepatozyten erfolgte in % bezogen auf die Gesamtzellzahl der Hepatozyten.

3.6.1 Cleaved Caspase-3

Es zeigte sich, dass beide Fettlebergruppen eine gegenüber der Kontrolle signifikant höhere Anzahl an apoptotischen Zellen aufwiesen. Bei weniger als 1% in der Kontrollgruppe betrug die Rate apoptotischer Zellen in der FL-Kontrolle 6,9% und in der FL-MDDP Gruppe 3,7%. Durch die Gabe von MDDP ließ sich eine signifikante Senkung der Apoptoserate erzielen (Abbildung 6).

3.6.2 TUNEL-Test

Die im TUNEL-Test detektierten apoptotischen Zellen betrugen in der Kontrollgruppe 4,3% der Gesamtzellzahl. In der FL-Kontrollgruppe waren sie mit 35,8% gegenüber

der nicht-steatotischen Kontrolle signifikant erhöht. Mittels MDDP-Präkonditionierung konnte die Rate apoptotischer Zellen auf 11,4% gesenkt werden, was eine signifikante Reduktion gegenüber der steatotischen Kontrollgruppe darstellte. Hinsichtlich der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abbildung 7).

Abbildung 6

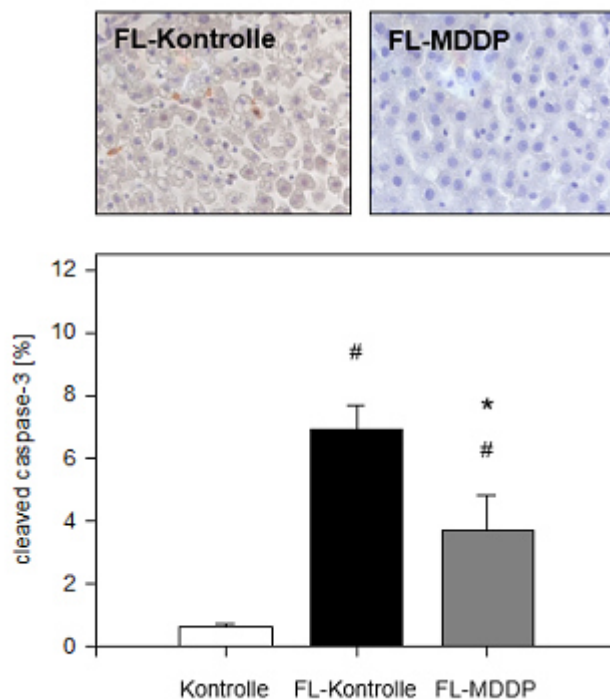


Abbildung 6. Analyse der cleaved Caspase-3-positiven Zellen nach 60-minütiger Reperfusion der Lebern mit 37°C warmer Krebs-Henseleit Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumetrische Mengen NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). Mittelwert $\pm$ SEM ($n=8$ in jeder Gruppe). # $p<0,05$ vs. Kontrolle, * $p<0,05$ vs. FL-Kontrolle

Abbildung 7

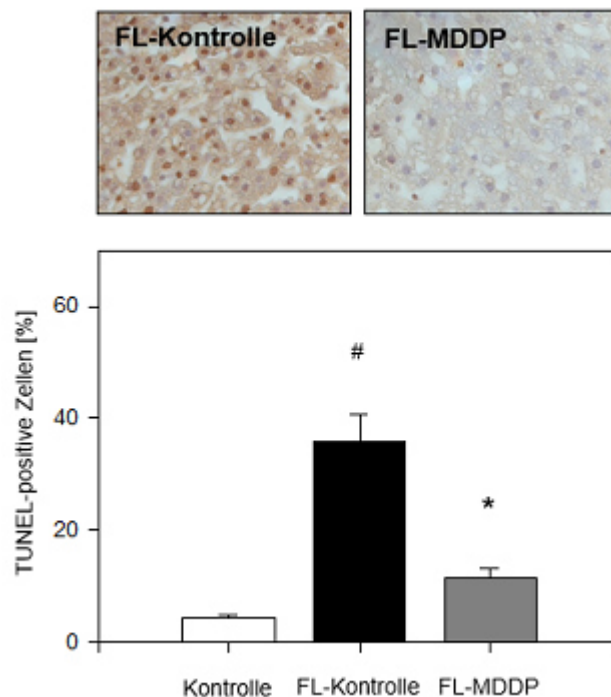


Abbildung 7. Analyse der TUNEL-positiven Zellen nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumetrische Mengen NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). Mittelwert $\pm$ SEM (n=8 in jeder Gruppe). # $p < 0,05$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. FL-Kontrolle

3.7 Neutrophileninfiltration

Die Infiltration neutrophiler Granulozyten als Marker der Entzündungsreaktion wurde mittels CAE-Färbung nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die Neutrophileninfiltration in der FL-Kontrollgruppe verglichen mit der nicht marginalen Kontrollgruppe signifikant erhöht war, wohingegen die FL-MDDP Gruppe im Vergleich mit der Kontrolle keinen Unterschied zeigte (Abbildung 8).

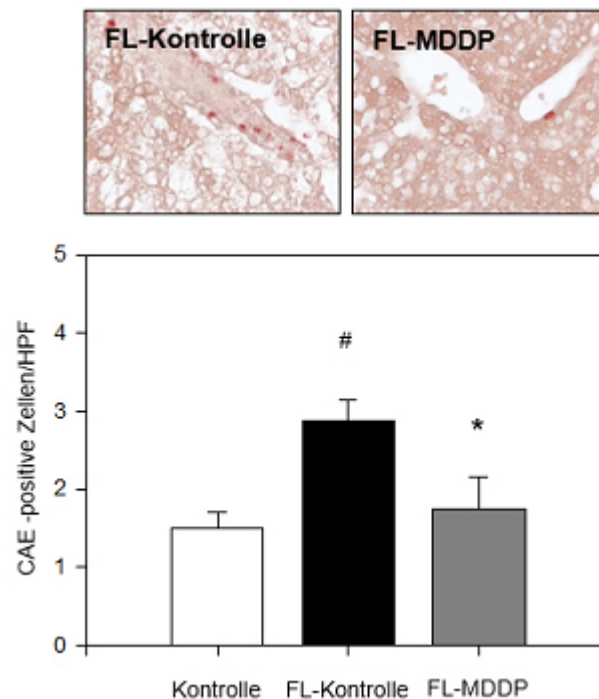
Abbildung 8

Abbildung 8. Analyse der CAE-positiven Zellen nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumetrische Mengen NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). Mittelwert ± SEM (n=8 in jeder Gruppe). # p<0,05 vs. Kontrolle, * p<0,05 vs. FL-Kontrolle

3.8 NFκB

Dem Transkriptionsfaktor NFκB wird in vielen Prozessen, wie Immunantwort, Zellproliferation und Zelltod eine zentrale Rolle zugeschrieben. In den meisten Zelltypen, so auch in Hepatozyten, liegt NFκB inaktiv, gebunden an Inhibitorproteine im Zytoplasma vor. Um seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor erfüllen und in den Zellkern wandern zu können, muss NFκB zunächst aktiviert werden bzw. es müssen sich intrazelluläre Signalwege dahingehend ändern, dass eine Inhibition der hemmenden Proteine erfolgt. Die Aktivierung von NFκB kann über die unterschiedlichsten Stimuli, wie etwa Zytokine (TNF-α, IL-1), UV- Strahlung oder freie Radikale von statten gehen [Llacuna et al., 2009].

Die Bestimmung dieses Transkriptionsfaktors erfolgte ebenfalls mittels Proteinanalyse im Western Blot und wurde in $OD \cdot mm^2$ angegeben. Hierbei zeigte sich eine erhöhte NF κ B-Konzentration in der FL-Kontrolle im Vergleich zu den anderen Gruppen. Das Signifikanzniveau konnte allerdings nicht erreicht werden (Abbildung 9).

Abbildung 9

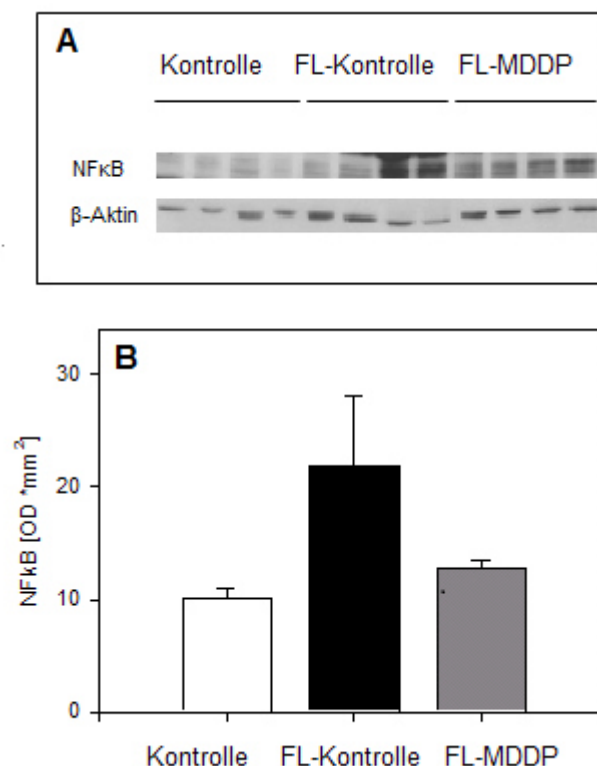


Abbildung 9. Analyse der NF κ B-Expression des Lebergewebes nach 60-minütiger Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit-Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumentrische Mengen NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). A: Scan der Proteinbanden von NF κ B (oben) und des Kontrollproteins β -Aktin (unten), B: NF κ B-Konzentration der einzelnen Gruppen im Schaubild. Mittelwert $\pm$ SEM (n=4 in jeder Gruppe).

3.9 Freisetzung von Total Protein

Ein weiterer Parameter der Membranintegrität ist die Freisetzung von intrazellulärem Protein. Die im Perfusat gemessene Menge an Gesamtprotein (g/l) korreliert mit dem hepatozellulären Schaden.

Im ersten Effluat zeigte erstaunlicherweise die gesunde Kontrolle eine signifikant höhere Konzentration an Totalprotein als die beiden Steatosegruppen, welche keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse zeigten. Nach 30 Minuten Reperfusion sank die Proteinfreisetzung in der Kontrolle stark, wohingegen nun in beiden Steatosegruppe eine signifikant höhere Freisetzung an intrazellulärem Protein zu beobachten war.

Nach 60 Minuten Reperfusion hatte sich in der FL-MDDP Gruppe die Zellintegrität dahingehend verbessert, dass sich kein Unterschied zur gesunden Kontrolle, aber eine signifikant niedrigere Proteinkonzentration im Perfusat verglichen mit der FL-Kontrolle nachweisen ließ (Tabelle 6).

Tabelle 6

Protein-Freisetzung (g/l)	1min	30min	60min
Kontrolle	4,54±0,65	0,11±0,03	0,12±0,03
FL-Kontrolle	0,97±0,22 [#]	0,46±0,14 [#]	0,55±0,17 [#]
FL-MDDP	1,42±0,24 [#]	0,49±0,12 [#]	0,25±0,06 [*]

Tabelle 6. Analyse der zellulären Proteinfreisetzung zu den Zeitpunkten 1 Minute, 30 und 60 Minuten der Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit Pufferlösung. Die Lebern wurden zuvor 24h in HTK-Lösung (4°C) konserviert. Nicht mittels dem multidrug donor preconditioning (MDDP) vorbehandelte, nicht steatotische Rattenlebern dienten als Kontrollgruppe (Kontrolle). Steatotische Rattenlebern wurden mit MDDP vorbehandelt (FL-MDDP) oder erhielten isovolumetrische Mengen an NaCl 0,9% (FL-Kontrolle). Mittelwert ± SEM (n=8 in jeder Gruppe). [#] p<0,05 vs. Kontrolle, ^{*} p<0,05 vs. FL-Kontrolle

4 Diskussion

Die vorliegende Studie zeigt, dass Rattenlebern mit makrovesikulärer Steatose nach 24 Stunden kalter Ischämie und einstündiger warmer Reperfusion einen deutlich höheren Ischämie-/Reperfusionsschaden aufweisen als nicht-steatotische Organe. Der höhere Schaden zeigt sich zum einen in einer verringerten Lebersyntheseleistung gemessen anhand der Galleproduktion, zum anderen in einem deutlich erhöhten parenchymatösen Schaden mit erniedrigter Membran- und mitochondrialer Integrität, einer signifikant höheren Entzündungsreaktion und einer gesteigerten Apoptoserate. Wir betrachten demnach das von uns gewählte Modell als geeignet den kalten Ischämie-/Reperfusionsschaden der steatotischen Transplantatleber zu simulieren und die protektive Wirkung von MDDP zu untersuchen.

Durch die Vorbehandlung der Versuchstiere mittels des multidrug donor preconditioning (MDDP)-Schemas konnte eine signifikante Zunahme der Galleproduktion in-situ erreicht werden. Die Galleproduktion nach Reperfusion war gesteigert, verglichen mit jener der unbehandelten steatotischen Lebern, wobei dieses Ergebnis nicht signifikant war. Zu Beginn der ex-situ Reperfusion, sowie nach 30 und 60 Minuten sammelten wir das Leberperfusat, in welchem wir die Konzentrationen der Enzyme LDH und GLDH, sowie die der Transaminasen ASAT und ALAT bestimmten. Bei Perfusionsbeginn zeigten sich in den einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von ASAT, ALAT, LDH und GLDH. Nach 30 Minuten waren sowohl in der Fettleberkontroll-, als auch in der mit MDDP präkonditionierten Fettlebergruppe die Freisetzung von ASAT, ALAT und LDH gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Nach weiteren 30 Minuten stiegen die Konzentrationen der Enzyme in der Gruppe FL-Kontrolle weiter an, wohingegen die der FL-MDDP Gruppe signifikant sanken. Die Konzentration von GLDH war in der steatotischen Kontrollgruppe gegenüber der nicht-marginalen Kontrolle nach 30 Minuten signifikant erhöht und stieg bis zum Ende der Reperfusion weiter an. Die FL-MDDP Gruppe zeigte nach 30 Minuten gegenüber der nicht-steatotischen Kontrolle keine signifikante Mehrfreisetzung von GLDH. Nach 60 Minuten erfolgter Reperfusion konnte durch die MDDP-Gabe eine signifikante Senkung der GLDH-Freisetzung von steatotischen Rattenlebern erzielt werden. GLDH ist ein ausschließlich in den Mitochondrien vorkommendes Enzym und wird erst nach

schwerer Leberzellschädigung freigesetzt, sodass durch die erhöhte Konzentration in der Fettleberkontrollgruppe gegenüber der Kontrolle und der Gruppe FL-MDDP nach 30 und 60 Minuten von einem gravierenden hepatozellulären Schaden ausgegangen werden kann. Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Studie zeigen, dass sich durch die MDDP-Präkonditionierung steatotischer Rattenlebern der Ischämie-/Reperfusionsschaden nach 24 Stunden kalter Konservierung mit anschließender einstündiger ex-situ Reperfusion signifikant senken lässt.

Pathogenese des Ischämie-/Reperfusionsschaden

Als relevanter Gesichtspunkt für die erhöhte Empfindlichkeit von Fettlebern auf Ischämie und Reperfusion wird die durch die Steatose bedingte negative Beeinträchtigung der Leberperfusion angenommen. Studien zeigten, dass zwischen dem Steatosegrad und dem hepatischem Blutfluss bzw. der hepatischen Mikrozirkulation eine inverse Korrelation besteht [Veteläinen et al., 2007]. Diese erklärt sich dadurch, dass durch die in den Hepatozyten enthaltenen Fettvakuolen das Lumen der Sinusnoide eingeengt wird. Im Rattenexperiment konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass nicht nur der hepatische Blutfluss und das Blutvolumen, sondern auch der Anteil des mit Sauerstoff gesättigten Hämoglobins von Tieren mit Lebersteatose gegenüber Tieren mit nicht-steatotischen Lebern signifikant reduziert ist [Sato et al., 1986]. Des Weiteren neigen die durch die Fettvakuolen verengten, teils irregulären Sinusnoide zu Blutzelladhäsionen, was eine Widerstandserhöhung der hepatischen Gefäße bedingt und eine konsekutiv schlechtere Leberperfusion bedeutet [Teramoto et al., 1993]. Durch reaktive Sauerstoffmoleküle aktivierte Kupfferzellen und neutrophile Granulozyten triggern eine weitere Adhäsion von Thrombozyten [Pak et al., 2010], was zu einer Verstärkung des Perfusionsschadens führt. Die Studie von Seifalian et al. hat gezeigt, dass zwischen der Dauer der kalten Ischämie und der Transplantatperfusion ein negativer Zusammenhang besteht [Seifalian et al., 1997]. Die Perfusionsverschlechterung hat neben der verminderten Versorgung des Lebergewebes mit oxygeniertem Blut die Konsequenz, dass die während der Explantation verwendete Perfusionslösung das Organ weniger gut perfundiert. Dadurch wird zum einen das im Transplantat enthaltene Blut unvollständig ausgespült und zum anderen werden minderperfundierte Leberareale verzögert gekühlt [Feng et al., 2007].

Neben der schlechteren Perfusion steatotischer Transplantatlebern spielt in der

Pathogenese des Ischämie-/Reperfusionsschadens die vermehrte Radikalbildung in den Leberzellen eine Rolle. Die in den Hepatozyten akkumulierenden Fettsäuren führen zu einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Enzyme, durch welche es zu einer erhöhten Lipidperoxidation sowie zur Entstehung freier Radikale kommt [Veteläinen et al., 2007]. Dadurch werden zelleigene Antioxidantien wie Gluthathion verbraucht, wodurch das Leberparenchym bei Wiedereinsetzen der Durchblutung nach Transplantation und der damit verbundenen physiologischen Einschwemmung extrahepatisch produzierter Sauerstoffradikale über keinen ausreichenden Vorrat an protektiven, antioxidativen Substanzen verfügt [Veteläinen et al., 2007]. In der Leber gelten Kupfferzellen als die Hauptproduzenten von Sauerstoffradikalen [Muriel, 2009]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Mitochondrien in steatotischen Hepatozyten exzessiv reaktive Sauerstoffradikale produzieren. Neben den oben genannten Konsequenzen des oxidativen Stresses konnte zudem im Tiermodell gezeigt werden, dass es zu einer durch die Sauerstoffradikale bedingten Hochregulation des Enzyms UCP-2 (uncoupling protein-2, lokalisiert in der inneren Mitochondrienmembran) kommt, wodurch die mitochondriale ATP- Synthese vermindert wird [Reiniers et al., 2014; Rashid et al., 1999]. Studien haben ergeben, dass mit steigendem BMI, welcher seinerseits eng mit dem Ausmaß der Steatose korreliert, die Erholung der Leber mit Wiederherstellung der ATP-Speicher invers zusammenhängt [Veteläinen et al., 2007; Cortez-Pinto et al., 1999]. ATP-konsumierende Prozesse wie die Aufrechterhaltung der Zellintegrität werden dadurch negativ beeinträchtigt und tragen damit zu einem erhöhten Leberzellschaden bei. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhöhte Vulnerabilität von Steatoselebern auf Ischämie und Reperfusion in der Kombination von Perfusionsstörungen, gesteigerter Radikalproduktion bei gleichzeitig verminderter Konzentration protektiver Substanzen sowie in einer gestörten ATP-Homöostase begründet liegt [Zeng et al., 2010; Veteläinen et al., 2007; Vollmar et al., 1994; Rashid et al., 1999].

Wirkung der MDDP-Substanzen auf den kalten Ischämie-/Reperfusionsschaden der steatotischen Rattenleber

Die Pathogenese des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei steatotischen und nicht-steatotischen Lebern ist sehr komplex und umfasst verschiedene Schädigungsmechanismen (z.B. Perfusionsverschlechterung, Radikalbildung, Entzündung und Verbrauch protektiver Substrate). Unsere Hypothese war daher, dass mittels verschiedener Substanzen, welche an unterschiedlichen Punkten des

Pathomechanismus I/R angreifen eine größere Protektion des steatotischen Tranplantats erreicht werden kann als mit der alleinigen Gabe einer Substanz. Die einzelnen Komponenten unseres Präkonditionierungsmodells wählten wir nach Recherche verschiedener experimenteller Arbeiten aus, welche die Substanzen bereits erfolgreich zur Leberprotektion bzw. zur Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschadens eingesetzt haben. Ein Großteil der von uns verwendeten protektiven Substanzen wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits in Vorversuchen getestet. Mittels dem multimodalen Präkonditionierungsschema ließ sich eine signifikant verbesserte Organqualität von nicht-steatotischen Rattenlebern nach 24 stündiger kalter Konservierung und einstündiger ex-situ Reperfusion im Vergleich zur nicht vorbehandelten Kontrollgruppe erzielen [Moussavian et al., 2010].

TNF- α wird eine relevante Rolle in der Schädigung von Hepatozyten und Sinuszellen zugeschrieben [El-Ghoneimi et al., 2007]. Die Studie von Rüdiger und Clavien zeigt, dass TNF- α die Apoptose von Leberzellen nach I/R im Nagermodell vermittelt [Rüdiger und Clavien, 2002]. Pentoxifyllin ist bekannt, die Bildung von TNF- α durch Suppression von Kupfferzellen während hepatischer I/R zu senken [Zeng et al., 2010; El-Ghoneimi et al., 2007]. Zudem inhibiert PTX die Expression leuko-endothelialer Adhäsionsmoleküle, welche die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe fördern und damit eine Entzündungsreaktion initiieren [Müller et al., 1997]. Wir konnten beobachten, dass die TNF- α Konzentration im Effluat der mit MDDP präkonditionierten Steatosegruppe im Vergleich zur steatotischen Kontrollgruppe verringert war. Auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant war lässt sich doch auf eine mögliche Suppression proinflammatorischer Chemokine durch PTX schließen. PTX ist ein potenter Vasodilatator. Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die Gabe von PTX die Mikrozirkulation in steatotischen Rattenlebern mit mikrovesikulärer Steatose signifikant verbessern lässt [Arnault et al., 2003]. Es ist daher anzunehmen, dass PTX sich auch in unserem Versuch positiv auf die Mikrozirkulation ausgewirkt und zur Verringerung des I/R-Schadens beigetragen hat.

Für Glycin wurde ebenfalls im Tiermodell eine Modulation der Kupfferzellfunktion nach hepatischer I/R beschrieben, welche in einer verminderten Bildung von TNF- α resultiert [Duenschede et al., 2006]. Auch wirkt es antiapoptotisch auf Sinusendothelien nach erfolgter Ischämie und Reperfusion [Zhang et al., 2005; Jacob et al., 2003]. Auf diese Weise könnte Glycin zur signifikant verringerten

Apoptoserate und zur reduzierten Entzündungsreaktion nach I/R der präkonditionierten Fettlebern beigetragen haben.

Statine zeigen potente antiinflammatorische [Lefer et al., 2002] und antioxidative Eigenschaften [Lefer, 2002] und steigern die hepatische Mikrozirkulation [Tokunaga et al., 2008; Dold et al., 2009]. Für Simvastatin wurde bereits beschrieben, dass es im Rattenmodell den I/R-Schaden senken konnte [Lai et al., 2008]. Wir können daher annehmen, dass Simvastatin durch seine pleiotropen Wirkungen zur Reduktion des kalten I/R-Schadens der steatotischen Leber beigetragen hat.

Für EPO wurde ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die postischämische Leukozyteninfiltration beschrieben [Donnahoo et al., 1999]. Diese erklärt man sich über eine Herunterregulation von TNF- α und der vermehrten Expression von eNOS [Lindenblatt et al., 2007]. Zudem verfügt EPO über antioxidative und antiapoptotische Eigenschaften [Sepodes et al., 2006]. Diese protektiven Eigenschaften könnten Grund für den durch MDDP signifikant verringerten I/R-Schaden der Steatoseleber gewesen sein.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass durch die Substitution von N-Acetylcystein (NAC) der I/R-Schaden von Lebern verringert werden kann [Nagasaki et al., 1998; Smyrniotis et al., 2005]. Dies wird zum einen seiner Wirkung als direkter Radikalfänger [Nagasaki et al., 1998], als auch durch die Wiederauffüllung der Gluthathionspeicher, welche sich durch die exzessive Radikalbildung bei Ischämie und Reperfusion leeren, zugeschrieben [Demir und Inal-Erden, 1998]. Wir konnten zeigen, dass die MDA-Formation als Marker für die Membranoxidation in der mit MDDP präkonditionierten Fettlebergruppe im Vergleich zur Fettleberkontrollgruppe signifikant verringert war. Die antioxidative Wirkung von NAC könnte dafür ursächlich sein.

Ebenfalls antioxidativ wirksam ist Melatonin, welches über eine Aktivitätserhöhung der Superoxiddismutase und der Gluthathionperoxidase zu einer verminderten MDA-Konzentration im hepatischen Gewebe führt [Korkmaz et al., 2008]. Zudem verbessert es die Mitochondrienfunktion und verringert den I/R-Schaden der Leber durch Ausgleichen der Imbalance zwischen NO und Endothelin [Zhang et al., 2006]. Es könnte somit an der protektiven Wirkung von MDDP durch seine antioxidative Wirkung beteiligt gewesen sein und damit relevant zur Senkung des I/R-Schadens der steatotischen Rattenleber beigetragen haben.

Deferoxamin (DFO) hemmt die Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [Polat et al., 2006] und die hepatische Freisetzung von TNF- α . TNF- α wird in der Leber nicht nur hauptsächlich von Kupfferzellen synthetisiert sondern aktiviert selbst Kupfferzellen, welche als die Hauptproduzenten von ROS in der Leber gelten [Colletti et al., 1994]. Arkadopoulos et al. beschreiben darüber hinaus antiapoptotische und antiinflammatorische Wirkungen von DFO bei hepatischer Ischämie und Reperfusion und anschließender Leberresektion [Arkadopoulos et al., 2010]. DFO könnte über diese Eigenschaften zur Verminderung des I/R-Schadens der Steatoseleber beigetragen haben.

Die in MDDP enthaltenen Substanzen zeigen antioxidative, antiinflammatorische oder antiapoptotische Effekte. Für alle Einzelsubstanzen wurden in vorhergehenden Studien protektive Effekte für die hepatische Ischämie und Reperfusion beschrieben. In der von uns durchgeführten Studie konnten wir zeigen, dass nach 24 Stunden kalter Ischämie und einstündiger warmer Reperfusion von steatotischen Rattenlebern der I/R-Schaden der mittels MDDP vorbehandelten Lebern gegenüber der nicht präkonditionierten Kontrollgruppe signifikant reduziert werden konnte. Unklar ist jedoch, ob eine Einzelsubstanz oder die Kombination verschiedener Substanzen zu diesem Ergebnis geführt haben. Ebenso wenig können wir eine Aussage darüber treffen, inwieweit eine einzelne Substanz in Wirkungskombination zur Leberprotektion beigetragen hat oder ob eine synergistische Wirkung der Substanzen für das Ergebnis ausschlaggebend war.

Präkonditionierung von Steatoselebern

Serafin et al. konnten im Rattenmodell zeigen, dass durch eine ischämische Präkonditionierung von Steatoselebern eine geringere Leberzellschädigung und eine höhere Überlebensrate der Versuchstiere erzielt werden konnte. Hierzu wurden über einen Zeitraum von 60 Minuten selektiv 70% Lebergewebe von der Perfusion ausgeklemmt und damit einer warmen Ischämie ausgesetzt [Serafin et al., 2004].

Ye et al. entwickelten ein Transplantationsmodell in welchem zunächst die Spenderratten mit Fettlebern repetitive Gaben von reduzierten Gluthathion (GSH), beginnend 48 Stunden vor Explantation erhielten [Ye et al., 2010]. Nach Explantation der Steatoseleber und mit Beginn der sechsstündigen kalten Ischämie erfolgte eine die gesamte Phase der kalten Konservierung andauernde kontinuierliche

Administration von GSH und die venöse Persufflation von Sauerstoff. Anschließend erfolgte die Transplantation der so vorbehandelten Lebern in gesunde Empfängertiere, welche ebenfalls GSH erhielten. Mittels dieser Applikation von protektiven Substanzen konnte eine signifikante Verringerung des Ischämieschadens und eine verbesserte Überlebensrate erreicht werden [Ye et al., 2010].

Die Gruppe um Massip-Salcedo konnte in einem weiteren Rattenmodell zeigen, dass sich der durch die Vorbehandlung mit Adiponektin small interfering RNA (siRNA) sowie mit Agonisten des Transkriptionsfaktors PPAR- α eine signifikante Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens bei Steatoselebern erzielen lässt. Die Substanzen wurden simultan mit ischämischer Präkonditionierung oder singulär verabreicht. Dies geschah eine Stunde präoperativ (PPAR- α Agonist), sowie 48 und 24 (siRNA) Stunden vor Explantation [Massip-Salcedo et al., 2008]. Die Gruppe um Casillas-Ramirez zeigten in ihrem Versuch, dass sich durch die Gabe von rekombinantem Retinol-bindendem Protein 4 (RBP4) vor Explantation von steatotischen Rattenlebern und nachfolgender kalter Konservierung in UW-Lösung (6 Stunden) und Transplantation in ein Empfängertier eine signifikant bessere Organqualität der steatotischen Transplantatleber erzielen lässt. Derselbe Effekt ließ sich durch eine ischämische Präkonditionierung der Steatoseleber vor Explantation erzielen, was ebenfalls in einer Erhöhung von RBP 4 im Lebergewebe resultierte. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe um Casillas-Ramirez zeigen, dass im Gegensatz zu einer früheren Studie derselben Arbeitsgruppe, welche einen protektiven Effekt des Transkriptionsfaktors PPAR- γ auf die Leberqualität bei warmer Ischämie beschrieb eine Heraufregulation von PPAR- γ im Setting kalte Ischämie und Reperfusion eine konsekutiv schlechtere Organqualität der Transplantatleber bedeutet. Dieser Effekt konnte durch die Gabe eines PPAR- γ -Antagonisten kupiert werden [Casillas-Ramirez et al., 2011].

Jimenez-Castro et al. konnten nachweisen, dass bei Ratten mit Fettlebern eine im Vergleich zu nicht-steatotischen Lebern erhöhte Konzentration von cAMP im Lebergewebe besteht. Durch Präkonditionierung dieser Lebern mittels dem Adenylatcyclaseinhibitor 9-(tetrahydro-2-Furanyl)-9H-Purin-6-amine (SQ22536) und der damit verbundenen verminderten Synthese von cAMP konnte ein reduzierter Transplantatschaden und ein verlängertes Überleben der Empfängertiere nach kalter

Ischämie (6 Stunden) und Transplantation der Steatoseleber erreicht werden [Jimenez-Castro et al., 2011].

Saidi et al. führten eine medikamentöse Präkonditionierung mit Methylprednisolon sowohl bei steatotischen als auch bei nicht-steatotischen Rattenlebern durch. Über einen Zeitraum von 75 Minuten wurden 70% des Lebergewebes einer warmen Ischämie ausgesetzt und anschließend drei Stunden reperfundiert. Es zeigte sich, dass sich durch die präoperative Gabe des Medikaments bei nicht-steatotischen Lebern eine signifikante Verbesserung des Ischämie-/Reperfusionsschaden erzielen ließ. Der I/R-Schaden von Fettlebern blieb unbeeinträchtigt [Saidi et al., 2007]. Die Gruppe um Fondevila präkonditionierten steatotische Rattenlebern, bevor diese in nicht-steatotische Empfängertiere transplantiert wurden mit cyclischen RGD Peptiden. Die Präkonditionierung erfolgte direkt nach Explantation vor Kaltkonservierung der Spenderleber ex-vivo und ein weiteres Mal nach Transplantation unmittelbar vor Wiedereinsetzen der Reperfusion des Empfängertieres. Darüber hinaus erhielten die Empfängertiere nach Transplantation der Steatoselebern über ein mehrtägiges Intervall RGD Peptide. RGD Peptide binden mit hoher Affinität den $\alpha 5 \beta 1$ Fibronectin Integrin Rezeptor. Die Expression dieses Rezeptors spielt eine kausale Rolle für den hepatischen I/R-Schaden. Fondevila et al. konnten zeigen, dass durch diese Art der Präkonditionierung der I/R-Schaden der steatotischen Rattenleber signifikant vermindert werden konnte [Fondevila et al., 2009].

Vergleich von MDDP mit anderen Präkonditionierungsmodellen zur Verminderung des I/R-Schadens bei Lebersteatosis

Die Arbeiten von Saidi et al. und Serafin et al. unterscheiden sich von unserer Studie zum einen dadurch, dass die Auswirkungen einer Präkonditionierung von steatotischen Rattenlebern auf den warmen Ischämie-/Reperfusionsschaden, nicht jedoch auf den kalten Konservierungsschaden untersucht wurden. Serafin et al. führten eine ischämische Präkonditionierung vor Beginn der 60 Minuten dauernden warmen Ischämie durch. Die Rattenleber wurde nicht ex-situ bzw. in-situ eines Empfängertieres perfundiert, weswegen sich das Modell nicht auf eine Transplantationssituation übertragen lässt. Saidi et al. führten eine medikamentöse Präkonditionierung mit Methylprednisolon durch, allerdings auch zur Untersuchung des warmen Ischämie-Reperfusionsschadens. Ye et al. konnten mit ihrer Arbeit

zeigen, dass sich durch die repetitiven Gaben von Gluthathion (GSH) vor Explantation im Spendertier, während der kalten Konservierungsphase, sowie nach Explantation durch Behandlung des Empfängertieres eine signifikante Verbesserung der Organqualität erzielen lässt. Ihr Versuch beinhaltete eine sechsmalige Gabe von GSH, erstmalig 48 Stunden vor Beginn der Organexplantation. Dies macht eine Übertragung in den klinischen Alltag schwierig, da nach Feststellen des Hirntods des Organspenders eine Vorlaufzeit von zwei Tagen in der Regel entfällt. Gleiches gilt für die Arbeit von Massip-Salcedo et al., welche durch die Gabe von Adiponektin small interfering RNA ebenfalls ein mehrtägiges Intervall zur Biosynthese der zur Protektion wirksamen Proteine im Spendertier brauchten. Mit dem von Fondevila et al. entwickelten Modell ist es nötig, die zur Präkonditionierung bzw. zur adjuvanten Therapie des Empfängertiers eingesetzten cyclischen RGD Peptide zu drei verschiedenen Zeitpunkten zu verabreichen. Das von uns gewählte Präkonditionierungsmodell MDDP zeichnet sich durch eine einmalige Gabe aller Substanzen vor Explantation aus und sieht keine notwendige weitere Therapie des Transplantatempfängers vor. Casillas-Ramirez et al. und Jimenez-Castro et al. konnten durch die Gabe einzelner Substanzen teils in Kombination mit ischämischer Präkonditionierung eine signifikant verbesserte Organqualität der steatotischen Spenderleber erzielen. Unsere Arbeitshypothese war jedoch, dass sich durch die kombinierte Gabe verschiedener Substanzen mit unterschiedlichen, teils synergistischen Wirkungen und unterschiedlichen Wirkmechanismen eine bestmögliche Präkonditionierung der Steatoseleber vor Explantation, kalter Ischämie und warmer Reperfusion erreichen lässt. Ein vergleichbares multimodales medikamentöses Präkonditionierungsmodell wurde bislang noch nicht am Tier getestet.

Schlussfolgerung

MDDP ist dadurch charakterisiert, dass es kurzfristig und unkompliziert anzuwenden ist, im Gegensatz zu anderen Methoden zur Verminderung des I/R-Schadens, wie z.B. aufwendige ex-situ Perfusionsverfahren. Ein Transfer in die Klinik wäre von diesem Gesichtspunkt aus theoretisch denkbar. Ein weiterer Vorteil von MDDP ist, dass es bei noch erhaltener Herz-Kreislauffähigkeit des Spenders appliziert wird, sodass eine hohe Bioverfügbarkeit der Substanzen besteht. Dies konnte bisher nur bedingt durch Beimischung verschiedener Substrate zu Konservierungslösungen erreicht werden. In Anbetracht des persistierenden Spenderdefizits und in

Ermangelung suffizienter Leberersatzverfahren wäre die Verbesserung der Organqualität steatotischer Lebern ein sinnvoller Schritt, um den Spenderpool zu erweitern. Die Weiterentwicklung von MDDP könnte dazu ein relevanter Schritt sein.

5 Literatur

1. Abt PL, Desai NM, Crawford MD, Forman LM, Markmann JW, Olthoff KM, Markmann JF. Survival following liver transplantation from non-heartbeating donors. *Ann Surg* 2004; 239: 87-92.
2. Arnault I, Bao YM, Sebah M, Anjo A, Dimicoli JL, Lemoine A, Delvart V, Adam R. Beneficial effect of pentoxifylline on microvesicular steatotic livers submitted to a prolonged cold ischemia. *Transplantation* 2003; 76: 77-83.
3. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, Hafez GR, Lorentzen D, Belzer FO. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic livertransplantation. *Transplantation* 1991; 51: 157-163.
4. Arkadopoulos N, Nastos C, Kalimeris K, Economou E, Theodoraki K, Kouskouni E, Pafiti A, Kostopanagiotou G, Smyrniotis V. Iron chelation for amelioration of liver-reperfusion injury. *Hemoglobin* 2010; 34: 265-277.
5. Berthiaume F, Barbe L, Mokuno Y, MacDonald AD, Jindal R, Yarmush ML. Steatosis reversibly increases hepatocyte sensitivity to hypoxia-reoxygenation injury. *J Surg Res* 2009; 152: 54-60.
6. Casillas-Ramírez A, Alfany-Fernández I, Massip-Salcedo M, Juan ME, Planas JM, Serafín A, Pallàs M, Rimola A, Rodés J, Peralta C. Retinol-binding protein 4 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ in steatotic liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 338: 143-153.
7. Cavallari A, Cillo U, Nardo B, Filipponi F, Gringeri E, Montalti R, Vistoli F, D'amico F, Faenza A, Mosca F, Vitale A, D'amico D. A multicenter pilot prospective study comparing Celsior and University of Wisconsin preserving solutions for use in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003; 9: 814-821.
8. Chu MJ, Dare AJ, Phillips AR, Bartlett AS. Donor Hepatic Steatosis and Outcome After Liver Transplantation: a Systematic Review. *J Gastrointest Surg* 2015; 19: 1713-1724.

9. Colletti LM, Remick DG, Campbell DA. Desferal attenuates TNF release following hepatic ischemia/reperfusion. *Journal of Surgical Research* 1994; 57: 447-453.
10. Corps CL, Shires M, Crellin D, Smolenski R, Potts D, Pratt J, Lodge JP. Influence on energy kinetics and histology of different preservation solutions seen during cold ischemia in the liver. *Transplant Proc.* 2009; 41: 4088-4093.
11. Corps CL, Smolenski R, Potts D, Pratt J, Lodge JP. Addition of adenosine to University of Wisconsin solution: does it help? *Transplant Proc.* 2009; 41: 1491-1492.
12. Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis. *JAMA* 1999; 282: 17.
13. Demir S, Inal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta* 1998; 275: 127-135.
14. Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G1-G5.
15. Dold S, Laschke MW, Lavasani S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 466-474.
16. Donnhoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1999; 277: 922-929.
17. Feng L, Zhao N, Yao X, Sun X, Du L, Diao X, Li S, Li Y. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review. *Liver Transpl.* 2007; 13: 1125-1136.
18. Feng XN, Xu X, Zheng SS. Current status and perspective of liver preservation solutions. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2006; 5: 490-494.

19. Fishbein TM, Fiel ML, Emre S, Cubukcu O, Guy SR, Schwartz ME, Miller CM, Sheiner PA. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation* 1997; 64: 248-251.
20. Flegal KM, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999–2000. *JAMA* 2002; 288: 1723–1727.
21. John L.R. Forsythe. *Transplantation: A Companion to Specialist Surgical Practice*. Third Edition, 2005: pp 22-33.
22. Freitas I, Bertone V, Guarnaschelli C, Ferrigno A, Boncompagni E, Rizzo V, Reiter RJ, Barni S, Vairetti M. In situ demonstration of improvement of liver mitochondria function by melatonin after cold ischemia. *In Vivo* 2006; 20: 229-237.
23. Gabrielli M, Moisan F, Vidal M, Duarte I, Jiménez M, Izquierdo G, Domínguez P, Méndez J, Soza A, Benitez C, Pérez R, Arrese M, Guerra J, Jarufe N, Martínez J. Steatotic livers. Can we use them in OLTx? Outcome data from a prospective baseline liver biopsy study. *Ann Hepatol* 2012; 11: 891-898.
24. Gastaca M. Extended criteria donors in liver transplantation: adapting donor quality and recipient. *Transplant Proc* 2009; 41: 975-979.
25. Han S, Kim G, Lee SK, Kwon CH, Gwak M, Lee S, Ha S, Park CK, Ko JS, Joh J. Comparison of the tolerance of hepatic ischemia/reperfusion injury in living donors: macrosteatosis versus microsteatosis. *Liver Transpl* 2014; 20: 775-783.
26. von Heesen M, Seibert K, Hülser M, Scheuer C, Wagner M, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR. Multidrug donor preconditioning protects steatotic liver grafts against ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2012; 203: 168-176.
27. Inman SR, Davis NA, Olson KM, Lukaszek VA. Simvastatin attenuates renal ischemia/reperfusion injury in rats administered cyclosporine A. *Am J Med Sci* 2003; 326: 117-121.

28. Jimenez-Castro MB, Casillas-Ramirez A, Massip-Salcedo M, Elias-Miro M, Serafin A, Rimola A, Rodes J, Peralta C. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in rat steatotic liver transplantation. *Liver Transpl* 2011; 17: 1099-1110.
29. Koeppel TA, Lehmann TG, Thies JC, Gehrcke R, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S. Impact of N-acetylcysteine on the hepatic microcirculation after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1996; 61: 1397-1402.
30. Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan DX. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 2009; 15: 43-50.
31. Kumar R. Hard clinical outcomes in patients with NAFLD. *Hepatol Int* 2013; 7: 790-799.
32. Lai IR, Chang KJ, Tsai HW, Chen CF. Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction. *Transplantation* 2008; 85: 732-738.
33. Lefer DJ. Statins as potent antiinflammatory drugs. *Circulation* 2002; 106: 2041-2042.
34. Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, Vollmar B. Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through platelet and endothelial cell deactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1191-1198.
35. Liu Q, Izamis M, Xu H, Berendsen T, Yarmush M, Uygun K. Strategies to rescue steatotic livers before transplantation in clinical and experimental studies. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 4638-4650.
36. Llacuna L, Marí M, Lluís JM, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Morales A. Reactive oxygen species mediate liver injury through parenchymal nuclear factor-kappaB inactivation in prolonged ischemia/reperfusion. *Am J Pathol* 2009; 174: 1776-1785.

37. Lopez-Andujar R, Deusa S, Montalvá E, San Juan F, Moya A, Pareja E, DeJuan M, Berenguer M, Prieto M, Mir J. Comparative prospective study of two liver graft preservation solutions: University of Wisconsin and Celsior. *Liver Transpl* 2009; 15: 1709-1717.
38. Mangus RS, Fridell JA, Vianna RM, Milgrom MA, Chestovich P, Chihara RK, Tector AJ. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution in extended criteria liver donors. *Liver Transpl* 2008; 14: 365-373.
39. Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L, Batts KP, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, Krom RA. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation* 1996; 62: 1246-1251.
40. Massip-Salcedo M, Zaouali MA, Padriisa-Altés S, Casillas-Ramirez A, Rodés J, Rosselló-Catafau J, Peralta C. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha inhibits the injurious effects of adiponectin in rat steatotic liver undergoing ischemia-reperfusion. *Hepatology* 2008; 47: 461-472.
41. Mehrabi A, Fonouni H, Müller SA, Schmidt J. Current concepts in transplant surgery: liver transplantation today. *Langenbecks Arch Surg* 2008; 393: 245-260.
42. Moussavian MR, Scheuer C, Schmidt M, Kollmar O, Wagner M, von Heesen M, Schilling MK, Menger MD. Multidrug donor preconditioning prevents cold liver preservation and reperfusion injury. *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396: 231-241.
43. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int* 2009; 3: 526-536.
44. Müller JM, Vollmar B, Menger MD. Pentoxifylline reduces venular leukocyte adherence ("reflow paradox") but not microvascular "no reflow" in hepatic ischemia/reperfusion. *J Surg Res* 1997; 71:1-6.
45. Nagasaki H, Nakano H, Boudjema K, Jaeck D, Alexandre E, Baek Y, Kitamura N, Yamaguchi M, Kumada K. Efficacy of preconditioning with N-acetylcysteine

- against reperfusion injury after prolonged cold ischaemia in rats liver in which glutathione had been reduced by buthionine sulfoximine. *Eur J Surg* 1998; 164: 139-146.
46. Nardo B, Beltempo P, Bertelli R, Montalti R, Vivarelli M, Urbani L, Masetti M, Di Naro A, Filipponi F, Mosca F, Pinna A, Cavallari A. Comparison of Celsior and University of Wisconsin solutions in cold preservation of liver from octogenarian donors. *Transplant Proc* 2004; 36: 523-524.
47. Nemes B, Gámán G, Polak WG, Gelley F, Hara T, Ono S, Baimakhanov Z, Piros L, Eguchi S. Extended-criteria donors in liver transplantation Part II: reviewing the impact of extended-criteria donors on the complications and outcomes of liver transplantation. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 10: 841-859.
48. Pak S, Kondo T, Nakano Y, Murata S, Fukunaga K, Oda T, Sasaki R, Ohkohchi N. Platelet adhesion in the sinusoid caused hepatic injury by neutrophils after hepatic ischemia reperfusion. *Platelets* 2010; 21: 282-288.
49. Pérez-Ruixo JJ, Krzyzanski W, Hing J. Pharmacodynamic analysis of recombinant human erythropoietin effect on reticulocyte production rate and age distribution in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47: 399-415.
50. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55: 807-813.
51. Polat C, Tokyol C, Kahraman A, Sabuncuoglu B, Yilmaz S. The effects of desferrioxamine and quercetin on hepatic ischemia-reperfusion induced renal disturbance. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2006; 74: 379-383.
52. Rashid A, Wu TC, Huang CC, Chen CH, Lin HZ, Yang SQ, Lee FY, Diehl AM. Mitochondrial proteins that regulate apoptosis and necrosis are induced in mouse fatty liver. *Hepatology* 1999; 29: 1131-1138.

- 53.Reddy S, Zilvetti M, Brockmann J, McLaren A, Friend P. Liver Transplantation From Non-Heart-Beating Donors: Current Status and Future Prospects. *Liver Transplantation* 2004; 10: 1223-1232.
- 54.Reiniers MJ, van Golen RF, van Gulik TM, Heger M. Reactive oxygen and nitrogen species in steatotic hepatocytes: a molecular perspective on the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury in the fatty liver. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21: 1119-1142.
- 55.Richter S, Yamauchi J, Minor T, Menger MD, Vollmar B. Heparin and phentolamine combined, rather than heparin alone, improves heparic microvascular procurement in a non-heart-beating donor rat model. *Transpl Int* 2000; 13: 225-229.
- 56.de Rougemont O, Lehmann K, Clavien PA. Preconditioning, organ preservation, and postconditioning to prevent ischemia-reperfusion injury to the liver. *Liver Transpl* 2009; 15: 1172-1182.
- 57.Routh D, Naidu S, Sharma S, Ranjan P, Godara R. Changing pattern of donor selection criteria in deceased donor liver transplant: a review of literature. *J Clin Exp Hepatol* 2013; 3: 337-346.
- 58.Rozga J. Liver support technology- an update. *Xenotransplantation* 2006; 13: 380-389.
- 59.Rüdiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002; 122: 202-210.
- 60.Saidi RF. Utilization of expanded criteria donors in liver transplantation. *Int J Organ Transplant Med* 2013; 4: 46-59.
- 61.Saidi RF, Chang J, Verb S, Brooks S, Nalbantoglu I, Adsay V, Jacobs MJ. The effect of methylprednisolone on warm ischemia-reperfusion injury in the liver. *Am J Surg* 2007; 193: 345-347
- 62.Santoro A, Mancini E, Ferramosca E, Faenza S. Liver support systems. *Contrib Nephrol* 2007; 156: 396-404.

63. Sato N, Eguchi H, Inoue A, Matsumura T, Kawano S, Kamada T. Hepatic microcirculation in Zucker fatty rats. *Adv Exp Med Biol* 1986; 200: 477-483.
64. Schön MR, Kollmar O, Wolf S, Schrem H, Matthes M, Akkoc N, Schnoy NC, Neuhaus P. Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion. *Ann Surg* 2001; 233: 114-123.
65. Seifalian AM, Mallet SV, Rolles K, Davidson BR. Hepatic microcirculation during human orthotopic liver transplantation. *Br J Surg* 1997; 84: 1391-1395.
66. Selzner N, Selzner M, Jochum W, Amann-Vesti B, Graf R, Clavien PA. Mouse livers with macrosteatosis are more susceptible to normothermic ischemic injury than those with microsteatosis. *Hepatology* 2006; 44: 694-701.
67. Sepodes B, Maio R, Pinto R, Sharples E, Oliveira P, McDonald M, Yaqoob M, Thiernemann C, Mota-Filipe H. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Transpl Int* 2006; 19: 919-926.
68. Serafín A, Fernández-Zabalegui L, Prats N, Wu ZY, Roselló-Catafau J, Peralta C. Ischemic preconditioning: tolerance to hepatic ischemia-reperfusion injury. *Histol Histopathol* 2004; 19: 281-289.
69. Southard JH, Belzer FO. Organ preservation. *Annu Rev Med* 1995; 46: 235-247.
70. Sun CK, Zhang XY, Zimmermann A, Davis G, Wheatley AM. Effect of ischemia-reperfusion injury on the microcirculation of the steatotic liver of the Zucker rat. *Transplantation* 2001; 72: 1625-1631.
71. Teramoto K, Bowers JL, Kruskal JB, Clouse ME. Hepatic microcirculatory changes after reperfusion in fatty and normal liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1993; 56: 1076-1082.
72. Tian Y, Fukuda C, Schilling MK. Interstitial accumulation of Na⁺ and K⁺ during flush-out and cold storage of rat livers: implications for graft survival. *Hepatology* 1998; 28: 1327-1331.

73. Tokunaga T, Ikegami T, Yoshizumi T, Imura S, Morine Y, Shinohara H, Shimada M. Beneficial effects of fluvastatin on liver microcirculation and regeneration after massive hepatectomy in rats. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2989-2994.
74. Urena MA, Riuz-Delgado FC, González EM, Segurola CL, Romero CJ, Garcia IG, González-Pinto I, Gómez Sanz R. Assessing risk of the use of livers with macro and microsteatosis in a liver transplant program. *Transplant Proc* 1998; 30: 3288.
75. Verran D, Kusyk T, Painter D, Fisher J, Koorey D, Strasser S, Stewart G, McCaughan G. Clinical experience gained from the use of 120 steatotic donor livers for orthotopic liver transplantation. *Liver Transplant* 2003; 9: 500-505.
76. Veteläinen R, van Vliet A, Gouma DJ, van Gulik TM. Steatosis as a risk factor in liver surgery. *Ann Surg* 2007; 245: 20-30.
77. Yang HT, Chen KF, Lu Q, Wei YG, Li B, Qin Y, Huang WQ. Ultrasonic integrated backscatter in assessing liver steatosis before and after liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2014; 13: 402-408.
78. Ye S, Dong J, Han B. Protective effect of reduced glutathione and venous systemic oxygen persufflation on rat steatotic graft following liver transplantation. *J Surg Res* 2010; 158: 138-146.
79. Yeung AC, Tsao P. Statin therapy: beyond cholesterol lowering and antiinflammatory effects. *Circulation* 2002; 105: 2937-2938.
80. Zaouali MA, Ben Abdennebi H, Padrissa-Altés S, Mahfoudh-Boussaid A, Roselló-Catafau J. Pharmacological strategies against cold ischemia reperfusion injury. *Expert Opin Pharmacother* 2010; 11: 537-555.
81. Zeng Z, Huang HF, Chen MQ, Song F, Zhang YJ. Heme oxygenase-1 protects donor livers from ischemia/reperfusion injury: the role of Kupffer cells. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1285-1292.

82. Zhang SJ, Shi JH, Tang Z, Wu Y, Chen S. Protective effects of glycine pretreatment on brain-death donor liver. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 37-40.

83. www.adipositas-gesellschaft.de

6 Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALP	Alkalische Phosphatase
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bioartificial liver
BMI	Body Mass Index
DFO	Deferoxamin
DGF	Delayed graft function
EDC	Extended donor criteria
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
EPO	Erythropoietin
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GSH	Gluthathion
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HDV	Hepatitis D-Virus
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HPF	High-power field
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
HU	High-urgency
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
I.E.	Internationale Einheiten
i.g	Intragastral
IL	Interleukin
i.p	Intraperitoneal
I/R	Ischämie-Reperfusion
ITBL	Ischemic-type biliary lesions
i.v	Intravenös
KHB	Krebs-Henseleit Buffer
LDH	Laktatdehydrogenase
LTX	Lebertransplantation
MDA	Malondialdehyd

MDDP	Multi-drug donor preconditioning
NAC	N-Acetylcystein
NHBD	Non–heartbeating donor
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PD	Pretreated donor
PDF	Primary dysfunction
PNF	Primary nonfunction
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTX	Pentoxifyllin
RCT	Randomized controlled trial
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SL	Steatotic liver
TBIL	Totales Bilirubin
TP	Total Protein
TNF	Tumornekrosefaktor
TX	Transplantation
UTP	uncoupling protein
UW	University of Wisconsin

7 Publikationen

1. Von Heesen M, Seibert K, Hülser M, Scheuer C, Wagner M, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR. Multidrug donor preconditioning protects steatotic liver grafts against ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 2012; 203: 168-176.
2. Von Heesen M, Hülser M, Seibert K, Scheuer C, Dold S, Kollmar O, Wagner M, Menger MD, Schilling MK, Moussavian MR. Split-liver procedure and inflammatory response: improvement by pharmacological preconditioning. *J Surg Res* 168 (1), 2011, 125-135.
3. Seibert K, von Heesen M, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD. Multi-drug-donor Preconditioning; Ein neues Verfahren zur Protektion marginaler Leberorgane vor Ischämie/ Reperfusionsschäden. *Chirurgisches Forum und DGAV Forum* 2010, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie Volume 39, 2010, 171-172.

8 Danksagung

Ich möchte im Folgenden all denjenigen herzlich danken, die zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger für die Möglichkeit am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes tätig sein zu dürfen. Durch seine fortwährende Unterstützung, Geduld und seine konstruktive Kritik hat er entscheidend zum Vorliegen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso gebührt mein Dank Herrn PD Dr. med. Mohammed Reza Moussavian, der mich bei der Durchführung der Versuche und der statistischen Auswertung unterstützte und maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Maximilian von Heesen für die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Durch sein Engagement hat er in entscheidendem Maße zum Vorliegen dieser Arbeit mitgewirkt.

Darüberhinaus danke ich Frau Dr. rer. med. Claudia Scheuer für die Erstellung des Western Blots und der Laboranalysen sowie Frau Janine Becker für die Anfertigung der histologischen Präparate.

Weiterhin danke ich Frau Elisabeth Gluding, die in technischen Fragen stets hilfreich zur Seite stand.

Besonders danke ich meiner Familie, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg stets unterstützt hat.