

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung am Walter-Brendel-Zentrum für  
Experimentelle Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

---

**EINFLUSS VERSCHIEDENER ZELLPOPULATIONEN AUF DIE  
BILDUNG FREIER-RADIKAL-SPEZIES WÄHREND DER  
HYPERAKUTEN ABSTOSSUNG DER XENOPERFUNDIERTEN  
RATTENLEBER**

DISSERTATION

Zum Erwerb des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Ngô Bá Thanh-Trúc

aus Gia Dinh

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Georg Enders  
Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Stefan Holdenrieder  
Prof. Dr. med. Martin Kreis  
Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. vet. Eckart Thein  
Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR  
Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2009

Meinen Eltern gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

## 1 Einleitung 6-22

---

### 1.1 Freie Radikale und oxidativer Stress

1.1.1 Definition und Charakteristika Freier Radikale

1.1.2 Herkunft und Metabolismus Freier Radikale

### 1.2 Charakteristika ausgewählter ROS und RNS

1.2.1 Superoxidanion ( $\cdot\text{O}_2^-$ )

1.2.2 Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ )

1.2.3 Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ )

1.2.4 Peroxynitrit ( $\cdot\text{OHOO}^-$ )

### 1.3 Antioxidantien und antioxidative Systeme

1.3.1 Antioxidantien und nicht-enzymatische Scavenger

1.3.2 Antioxidative Enzyme

### 1.4. Pathomechanismus der ROS/RNS-Schädigung

1.4.1 Lipidperoxidation

1.4.2 Oxidation von Protein

1.4.3 DNA-Schäden

1.4.4 Sonderrolle des NOs

### 1.5 Theoretische Grundlagen der FR-Messung

### 1.6 Rolle der Freien Radikale in der Organtransplantation

### 1.7 Fragestellung

## 2 Material und Methoden 23-40

---

### 2.1 Verzeichnis der Abkürzungen

### 2.2 Herstellernachweis der Reagenzien

### 2.3 Verbrauchsmaterialien

### 2.4 Gerätenachweis

### 2.5 Herstellernachweis der Antikörper

### 2.6 Verwendete Tiere

### 2.7 Versuchsgruppen

2.7.1 Isogene Kontrollgruppe

- 2.7.2 Erythrozytengruppe (Serum/Erythrozyten)
- 2.7.3 Thrombozytengruppe (Serum/Erythrozyten/Thrombozyten)
- 2.7.4 Kupfferzellgruppe (Kupfferzelldepletion durch Gadolinium-Chlorid)
- 2.7.5 Xenogene Vollblutgruppe

## **2.8 Modell der isoliert-perfundierten Rattenleber**

- 2.8.1 Chirurgische Prozedur
- 2.8.2 Perfusionsmodell und Perfusionsvorgang

## **2.9 Versuchsprotokoll**

### **2.10 Labor-Assays**

- 2.10.1 Leberfunktion-Assays
- 2.10.2 FR-Assays
  - 2.10.2.1 endogene Stickoxid-Freisetzung (Griess-Reaktion)
  - 2.10.2.2 Lipidperoxidation (MDA/TBA-Assay)
  - 2.10.2.3 Peroxynitrit (Nitrotyrosin-Assay)
  - 2.10.2.4 Antioxidativer Status (GSH/GSSG)

### **2.11 Histologische Untersuchungen**

### **2.12 Statistik**

## **3 Ergebnisse** \_\_\_\_\_ **41-61**

### **3.1 Präparation der Perfusate und Kupfferzelldepletion**

### **3.2 Leberfunktion**

- 3.2.1 Galleproduktion
- 3.2.2 Leberenzyme
- 3.2.3 Makrohämodynamik (Portalvenendruck)

### **3.3 ROS-Assays**

- 3.3.1 LPO (MDA/TBA-Assay)
- 3.3.2 NO-Freisetzung (Griess-Reagenz)
- 3.3.3 Peroxynitrit (Nitrotyrosin-Assay)
- 3.3.4 Antioxidativer Status (GSH/GSSG)

### **3.4. Histologie der akuten Abstossung**

- 3.4.1 Leberschaden und Abstossungsreaktion (Rejection Activity Index)
- 3.4.2 Komplementaktivierung (C3c, C5-b)

## **4 Diskussion** \_\_\_\_\_ **62-72**

### **4.1 Aspekte der Xenotransplantation und der hyperakuten Abstossung**

## **4.2 Diskussion der Methodik**

4.2.1 Perfusionssystem

4.2.2 Perfusionsdauer

4.2.3 Herstellung der Perfusate

4.2.4 Assays zur Bestimmung freier Radikale

## **4.3 Diskussion und Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Versuchgruppen**

4.3.1 Isogene versus xenogene Reperfusion (isogene Kontrollgruppe)

4.3.2 Xenogene Versuchsgruppen

4.3.2.1 Erythrozytengruppe

4.3.2.2 Thrombozytengruppe

4.3.2.3 Kupferzellgruppe

4.3.2.4 Xenogene Vollblutgruppe

## **4.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

**5 Zusammenfassung** \_\_\_\_\_ **73-74**

**6 Literaturverzeichnis** \_\_\_\_\_ **75-82**

**7 Lebenslauf** \_\_\_\_\_ **83**

**8 Danksagung** \_\_\_\_\_ **84**

# 1 Einleitung

## 1.1 Freie Radikale und oxidativer Stress

Bereits 1954 haben Gershman und Gilbert postuliert, dass die meisten toxischen Effekte des Sauerstoffs auf die Bildung Freier Radikale (FR) zurückzuführen sind (Gershman und Gilbert et al. 1954). In den frühen 60er Jahren glaubten die meisten Biochemiker und Biologen noch, dass freie Radikale zu kurzlebig und unkontrollierbar wären, um eine physiologische Rolle zu besitzen (Gutteridge und Halliwell 2000). Diese Meinungen wurden abrupt geändert, als 1968 Joe McCord und Irwin Fridovich von den Eigenschaften der Superoxid-Dismutase (SOD) berichteten (McCord und Fridovich 1969). Sie entwickelten Techniken, mit welchen FR in vivo nachgewiesen werden konnten und zeigten, dass freie Radikale essentiell für aerobe Lebewesen sind (McCord und Fridovich 1970). Diesen Entdeckungen folgten in den 80er Jahren Berichte über die Bedeutung dieser Moleküle im Metabolismus der Zelle und ihre toxischen und modifizierenden Wirkungen auf Proteine und DNA (Halliwell und Gutteridge 1999). 1985 wurde die erste Fachzeitschrift zum Thema Freie Radikale und ihrer biologischen Rolle veröffentlicht: *The Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*.

Oxidativer Stress bezeichnet das zeitweilige „Überwiegen“ von FR durch deren zunehmende Generierung oder durch eine verringerte antioxidative Kapazität des Organismus. In den letzten Jahrzehnten wurde von der pathophysiologischen Wirkung des oxidativen Stress für verschiedene Erkrankungen berichtet (Bertlett und Stadtman 1997, Liu et al. 1998), wie zum Beispiel im Alterungsprozess, bei Autoimmunerkrankungen, Medikamenten induzierten Reaktionen und Tumorerkrankungen. Neben diesen Erkrankungen spielen FR eine wichtige Rolle beim Ischämie-Reperfusionsschaden, wie insbesondere in der allogenen Transplantation beschrieben (Halliwell 1989, Connor et al. 1992, Forde et al. 1997).

Die allogene Lebertransplantation ist gegenwärtig die einzig verfügbare Therapie in fortgeschrittenen Stadien des akuten und chronischen Leberversagens. Der Einsatz ist allerdings durch den kontinuierlich steigenden Bedarf an Spenderorganen limitiert und Alternativen zur allogenen Lebertransplantation sind dringend notwendig geworden. Eine Möglichkeit wäre die xenogene Transplantation von nicht humanen Organen (Deschamps 2005, Cozzi et al. 2006). Nach gegenwärtigen Erkenntnissen stehen einer erfolgreichen Xenotransplantation drei Barrieren im Weg: Unverträglichkeiten in der Physiologie von Mensch und Tier, Infektionsrisiken durch Erreger, die zusammen mit dem Transplantat auf den Empfänger übertragen werden und die Abstoßung des transplantierten Organs durch den Körper des Empfängers (Cozzi et al. 2006). Man unterscheidet dabei vier Arten der

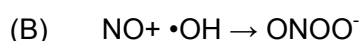
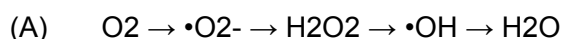
immunologischen Abstoßungsreaktion: die hyperakute Abstoßung, die akute vaskuläre Abstoßung, die akute T-Zellvermittelte Abstoßung und die chronische Transplantatabstoßung. Hierbei ist die hyperakute Abstoßung das unmittelbarste Problem. Sie findet in der frühesten Phase der Transplantation statt und ist durch interstitielle Hämorrhagien, Zerstörung des Gefäßendothels, Gewebsödem und Thrombenbildung charakterisiert. Die hyperakute Abstoßung wird durch präformierte xenogene Antikörper des Empfängers induziert, welche an das Spenderendothel binden und konsekutiv das Komplementsystem des Empfängers aktivieren (Saadi 2002, Cozzi et al. 2006). Durch die nachfolgenden Schädigungen des Endothels und Thrombenbildung kommt es zu einem kapillären Austritt von Flüssigkeit und Blut. Durch die Bildung von Thromben können Gefäße verlegt werden, womit eine ausreichende Sauerstoffversorgung des umliegenden Gewebes nicht mehr gewährleistet wird. Das Resultat ist letztendlich der Verlust der Funktion des Spenderorgans und das Organversagen innerhalb weniger Stunden.

Bisher liegen keine Daten zur Rolle freier Radikale während der hyperakuten Abstoßung vor, weshalb deren Bedeutung in diesem immunologischen Geschehen in vorliegender Arbeit untersucht werden soll.

### 1.1.1 Definition und Charakteristika von Freien Radikalen

FR sind Moleküle, welche auf ihrem äußersten Orbital ein ungepaartes Elektron besitzen. In vivo werden primär Superoxidradikale und Stickstoffradikale gebildet. Biologisch reaktiv sind nicht nur diese primär gebildeten FR, sondern auch ihre Metabolite, welche per se nicht immer Radikale sind, aber in der Literatur unter Radikalspezies bzw. bioreaktiven Formen geführt werden (Abuja 2001).

Prinzipiell entstehen FR durch die Elektronenaufnahme eines Nichtradikals, bei Elektronenabgabe durch ein Nichtradikal oder die homolytische Aufspaltung einer kovalenten Bindung (Halliwell und Gutteridge 1999). Produkt dieser univalenten (1-Elektronen-Übergang) Reaktionen sind die vier Reduktionsstufen des O<sub>2</sub> bis hin zum Wasser (A). Die dabei entstehenden Superoxidanionen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), das Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und das Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ) werden unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies (ROS)“ zusammengefasst. NO reagiert in Anwesenheit von Hydroxylradikalen zu einem Peroxynitritanion (B), das mit Stickstoffmonoxid zusammen als „reaktive Stickstoffspezies“ (RNS) bezeichnet wird.





Auf Grund ihres ungünstigen energetischen Zustandes sind die ROS und RNS bestrebt, durch Elektronenaufnahme oder -abgabe eine stabile Elektronenkonfiguration zu erreichen. Dies macht FR äußerst instabil und hochreaktiv und deshalb auch sehr kurzlebig (Abb.1) (Yu 1994). Die kürzeste Lebensdauer hat das Hydroxylradikal, NO dagegen kann je nach Literaturangabe bis zu 20 sec existieren. Die Halbwertszeit beeinflusst die Eindringtiefe in das Gewebe, die so genannte Diffusionskonstante. Diese ist bei Hydroxylradikalen wie erwartet am geringsten und beträgt bei anderen Radikalen zwischen 1 und 75  $\mu\text{m}$ . Hochreaktive FR haben somit die kürzesten Halbwertszeiten und Diffusionskonstanten, wogegen nicht so reaktive FR eine größere Reichweite haben. Neben der kurzen Reichweite und Halbwertszeit der FR ist die Lokalisation des Entstehungsortes wichtig für den oxidativen Schaden, den sie verursachen. Deshalb kann aus Aktivität und möglichen Schaden durch Radikale keine lineare Beziehung abgeleitet werden (Yu 1994).

Radikal	Halbwertszeit in s	Diffusionskonstante
Stickoxid $\text{NO}^\bullet$	1-20	75 $\mu\text{m}$
Peroxynitrit $\text{ONOO}^-$	$1 \times 10^{-2}$	7 $\mu\text{m}$
Superoxidradikal $\text{O}_2^-$		
•extrazellulär	$1 \times 10^{-6}$	10 $\mu\text{m}$
•intrazellulär		1-2 $\mu\text{m}$
Hydroxylradikal $\text{OH}^\bullet$	$1 \times 10^{-9}$	1-2 x Durchmesser des Wassermoleküls

Abb. 1.1 Halbwertszeiten und Diffusionskonstanten der primären ROS und RNS (Yu 1994)

Die verschiedenen ROS sind nicht nur durch ihre zelltoxische Wirkung bekannt, sondern haben essentielle biologische/physiologische Aufgaben im Organismus. So wird Superoxid bei Entzündungsreaktionen der unspezifischen Abwehr, wie dem "respiratory burst" in phagozytierenden Zellen wie Monozyten (Babior 1984), Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten zur Bekämpfung von Bakterien freigesetzt. Es entstehen ROS bei der Signaltransduktion verschiedener Regulationsvorgänge (Lander et al. 1997). Sie fungieren selbst als second messenger, stellen chemotaktische Faktoren bei entzündlichen Prozessen dar und sind an der vasomotorischen Regulation beteiligt (Hensley 2000, Thannickal et al. 2000).

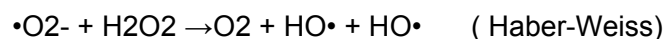
### 1.1.2 Herkunft und Metabolismus von FR

Die Entstehungsquellen von ROS sind vielfältig. So entstehen ROS z.B. im Stoffwechsel von Xenobiotika und bei vielen enzymkatalysierten Reaktionen. Hauptsächlich werden FR über den enzymatischen Weg gebildet, wie z.B. durch Enzyme, welche Oxidationen oder Reduktionen katalysieren (Halliwell und Gutteridge 1999).

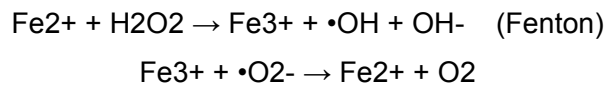
Ein Beispiel ist die Xanthinoxidase, welche auch im I/R-Schaden eine wichtige Rolle spielt (Abb. 1.2) (Arthur 1988, Jaeschke et al. 1989). Sauerstoffmangel führt in allen Geweben zum Abbau energiereicher Phosphate, d.h. von ATP über AMP zu Adenosin und letztlich zu Hypoxanthin. Somit nimmt die zelluläre ATP-Konzentration während Ischämie ab. Ein weiterer Umbau des Hypoxanthins zur Harnsäure, katalysiert durch die Xanthinoxidase, ist nicht möglich, weil dem Enzym unter hypoxischen Umständen der Sauerstoff als Elektronenakzeptor fehlt. Die Xanthinoxidase ist in vivo eine NAD abhängige Dehydrogenase, welche den Umbau von Hypoxanthin zur Harnsäure katalysiert, aber per se unfähig ist ROS zu bilden. Die hypoxisch bedingte Umwandlung der Xanthindehydrogenase in ihre Oxidaseform ist abhängig von der Dauer der Ischämie. Als Folge der Reoxygenierung kommt es über die Schwefelhydroxyoxidation, Ca<sup>2+</sup>-Influx und Proteolyse, zur Aktivierung der Xanthinoxidase. Die Xanthinoxidase metabolisiert während der Reperfusion Hypoxanthin, welches sich während der Ischämie aus ATP gebildet hatte, zu Urat mit den Nebenprodukten O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jaeschke et al. 1989).

Ein weiteres wichtiges Enzym ist die NADPH-Oxidase, welche eine wichtige Rolle im oxidativen Burst spielt. Dieses Enzym befindet sich in der Zellmembran von WBC (white blood cells = Leukozyten). Nach Aktivierung von WBC, werden über die NADPH-Oxidase O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freigesetzt. Eine hohe Aktivität findet sich besonders in der Leber und den Verdauungsorganen (Abb. 1.2) (Babior 1984).

Historisch wurde zunächst eine direkte Reaktion zwischen •O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> postuliert, die zur Bildung von hochtoxischem •OH führen sollte. Nach ihren Entdeckern wurde sie HABER WEISS Reaktion genannt (Haber und Weiss 1943).



Für die •OH-Bildung ist die Katalyse durch Übergangsmetallionen notwendig. In biologischen Systemen spielt neben anderen Übergangsmetallen, wie z.B. Kupfer, das Eisen (Fe) die wichtigste Rolle. Diese Reaktion wurde nach FENTON benannt (Fenton 1894). Für die Reduktion des Fe<sup>3+</sup> sind in vivo vor allem •O<sub>2</sub><sup>-</sup> verantwortlich:



Bei Zuständen mit Eisenüberladung wie z.B. bei hereditärer Hämochromatose oder nach Massivtransfusionen kann so mit einer verstärkten  $\cdot\text{OH}$ -Generierung gerechnet werden (Gutteridge et al. 1985).

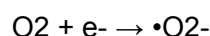
FR treten als Nebenprodukt des mitochondrialen Elektronentransportes auf (McCord und Fridovich 1970, Halliwell und Gutteridge 1999). So werden ca. 2 % des aufgenommenen Sauerstoffs im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien in ROS umgewandelt. Dieser Anteil erhöht sich proportional zur Sauerstoffspannung und macht einen wesentlichen Teil der Sauerstofftoxizität aus. Die Elektronentransportkette befindet sich auf der inneren mitochondrialen Membran. Es gibt zwei Orte in der Atmungskette, bei welchen Elektronen einzeln transferiert werden und nicht im Paar (Abb. 1.2). Circa 2% aller Elektronen werden direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen. Als Produkt entstehen dann Superoxidanionen. Mitochondrien besitzen eine MnSOD (Mn-Superoxiddismutase), die den Hauptteil der Superoxidradikale, die während der Elektronentransportkette gebildet wurden, über Ubiquinon abfangen kann. Durch das Fehlen der MnSOD z.B. während des IR-Schadens kommt es zum vermehrten Anfall von Superoxidradikalen. Wenn Mitochondrien zerstört werden, führt dies zu einer vermehrten Freisetzung von Superoxidradikalen infolge eines stärkeren Elektronen-Austritts (Lenaz 2001).

## 1.2 Charakteristika von ausgewählten ROS und RNS

Im Folgenden werden die Bildung und Charakteristika der primären ROS und RNS aufgeführt und beschrieben.

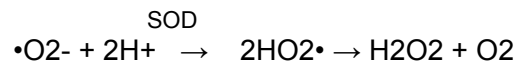
### 1.2.1 Superoxidanion ( $\cdot\text{O}_2^-$ )

Superoxidanionen entstehen durch die univalente Reduktion von molekularem Sauerstoff:



Alleine ist das Superoxidradikal schwachreaktiv, denn auf Grund ihrer geringen Halbwertszeit und ihrer Polarität sind Superoxidradikale nicht in der Lage, intrazellulär größere Strecken zurückzulegen bzw. Membranen zu durchdringen (Fridovich 1983). Ihre wichtige Rolle ist

dadurch geprägt, dass sie über die FENTON-Reaktion, insbesondere bei saurem pH-Wert, zu zwei hochreaktive Oxidantien - Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal- weiterreagieren.  $\cdot\text{O}_2^-$  reagiert in einer konstanten Rate von  $8 \times 10^4$  mol/L/sec mit sich selbst, es entsteht dabei das Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) gelangt das  $\cdot\text{O}_2^-$  über eine kurzlebige Zwischenverbindung, dem Hydroperoxyradikal ( $\text{HO}_2\cdot$ ), ebenfalls zum  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



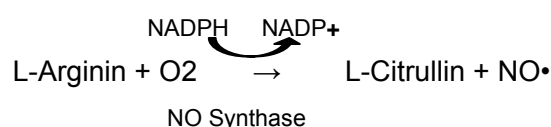
Der Hauptbildungsort des  $\cdot\text{O}_2^-$  ist die Elektronentransportkette in Mitochondrien oder weißen Blutzellen während der Phagozytose von Mikroorganismen. Außerdem sind sie Produkt vieler enzymkatalysierter Reaktionen (NO-Synthase, Xanthin- und NADPH-Oxidase). Neben ihrer Funktion als second messenger nehmen  $\cdot\text{O}_2^-$  Radikale eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion bei verschiedenen Regulationsmechanismen wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen, z.B. EGF, TNF-, TGF- oder Vasoregulation ein (Thannickal et al. 2000). In das extrazelluläre Milieu abgegebene Superoxidanionen fungieren darüber hinaus als Teil von chemotaktischen Faktoren für andere Entzündungszellen.

### 1.2.2 Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ )

Das  $\cdot\text{OH}$  zählt zu den aggressivsten Sauerstoffradikalen (Yu 1994). Durch sein stark positives Redoxpotential ist es eines der stärksten Oxidationsmittel. Als Hauptquelle für die Entstehung von  $\cdot\text{OH}$  in biologischen Systemen gilt die bereits besprochene Eisen(II)-vermittelte FENTON Reaktion. Durch seine extreme Kurzlebigkeit kann es jedoch nur Stoffe in unmittelbarer Nähe seines Entstehungsortes angreifen. Solange nicht jedes entstehende  $\cdot\text{OH}$  durch einen Scavenger direkt entgiftet werden kann, ist eine Generierung praktisch immer mit Schäden verbunden. Das  $\cdot\text{OH}$  ist der Hauptinitiator für die Lipidperoxidation (LPO) (Halliwell und Gutteridge 1999).

### 1.2.3 Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}\cdot$ )

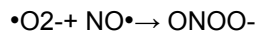
NO hat sowohl protektive also auch schädigende Effekte (Hon et al. 2002, Pacher et al. 2007). NO wird durch drei NO-Synthasen bei der Metabolisierung von L-Arginin zu L-Citrullin in Anwesenheit von  $\text{O}_2$  und NADPH gebildet:



NO kann selbst zytotoxisch sein, besonders wenn es in supraphysiologischen Konzentrationen vorhanden ist (Beckmann et al. 1996, Bloodswort et al. 2000, Diao et al. 2002). Es greift in die mitochondriale Atmungskette ein, kann die MnSOD inaktivieren und Antioxidantien wie GSH und Ascorbat verbrauchen. Der protektive Effekt ist von der zellulären Balance der NO und Superoxid Produktion abhängig (Beckmann et al. 1996). NO kann durch reaktive Sauerstoffverbindungen, wie z.B. Superoxidanionen und Hydroxylradikale zu weiteren toxischen Metaboliten weiter reagieren (Miles et al. 1996). Die Eliminierung dieser Radikale könnte die Halbwertszeit, Verfügbarkeit und Wirkung von NO verlängern. Letztlich erfolgt aber immer, wenn auch zu einem späteren Zeitpunkt, die Oxidation zu Nitrit/Nitrat (Beckmann et al. 1994).

#### **1.2.4 Peroxynitritanion (ONOO<sup>-</sup>)**

Peroxynitrit wird aus NO und Superoxid gebildet und ist hauptsächlich für die toxischen Effekte von NO verantwortlich (Miles et al. 1996, Radi et al. 1998).



Peroxynitrit ist hochreaktiv und reagiert mit Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren, initiiert DNA-Strangbrüche und kann die mitochondriale Atmungskette inhibieren (Radi 2004). Es hat eine mit dem Hydroxylradikal vergleichbare Reaktivität (Yu 1994). Peroxynitrit nitriert und inaktiviert die PGI<sub>2</sub>-Synthase zum unmetabolisierten Prostaglandin H<sub>2</sub>, welches Vasospasmen, Plättchenaggregation und Thrombusformation über die Stimulation von Thromboxan, initiieren kann.

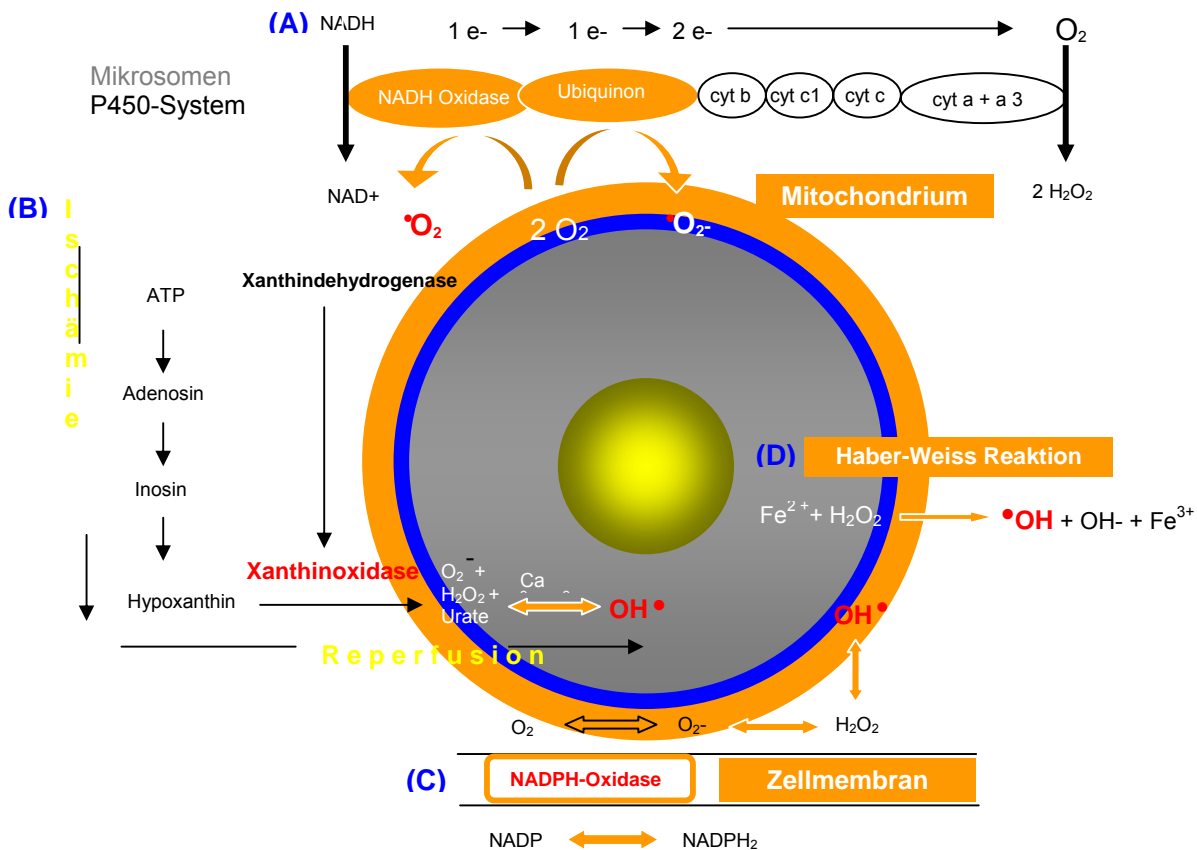


Abb. 1.2 Mechanismen der ROS-Entstehung (A) oxidative Phosphorylierung in der mitochondrialen Elektronentransportkette, (B) FR-Bildung über die Xanthinoxidase während der Ischämie und Reperfusion, (C) NADPH-Oxidase während des „oxidativen burst“ (D) Haber-Weiss Reaktion.

### 1.3 Antioxidantien/antioxidative Systeme

Da der aerobe Organismus auch unter nicht pathologischen Bedingungen mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies konfrontiert wird, aber es dennoch nicht zu unkontrollierten oxidativen Schäden kommen darf, sind Systeme notwendig, welche diese FR abfangen und detoxifizieren. Oxidativer Stress entsteht also immer dann, wenn die ROS-Generierung die antioxidative Kapazität vorübergehend übersteigt.

Die Antioxidantien sind im weitesten Sinne Verbindungen, welche in der Lage sind, die Bildung von ROS einzuschränken bzw. die toxischen Wirkungen von ROS zu mindern. Sie beinhalten im engeren Sinn Substanzen, die mit freien Radikalen reagieren und diese abfangen (Abfänger = scavenger). Sie schützen die Zellen, indem sie ein Elektron an das Radikal abgeben und es dadurch „neutralisieren“ (Halliwell 1996).

### 1.3.1 Antioxidantien und natürliche nicht-enzymatische Scavenger

Das Glutathion (GSH) zählt auf Grund seiner hohen intrazellulären Konzentration von ca. 0,5-10mmol/L zu den wichtigsten Vertretern der zellulären Antioxidantien (Halliwell 1996). Glutathion ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin (Glu-Cys-Gly). Als Redox-Puffer ist die für die Funktion des Glutathions als Radikalfänger wichtigste Gruppe die freie SH-Gruppe des Cysteins. Nach Oxidation werden zwei Tripeptide über eine Disulfid-Brücke verbunden.

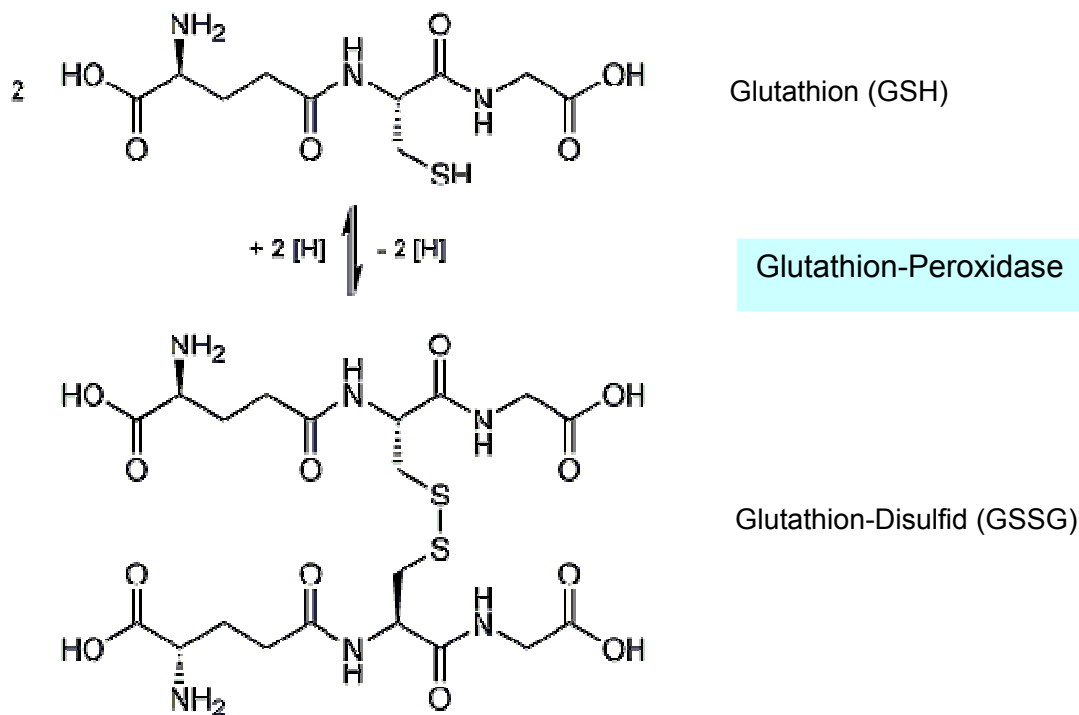


Abb. 1.4 Glutathion als Substrat der Glutathionperoxidase entgiftet H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Halliwell 1996)

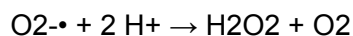
Als weiterer wichtiger Vertreter dieser Substanzgruppen ist die Harnsäure zu nennen, welche im Blutplasma in Konzentrationen von bis zu 450  $\mu$ M vorkommt und damit zu den wichtigen extrazellulären Radikalfängern gehört. Hydroxylradikale und Superoxid werden neutralisiert, indem sie mit der Harnsäure zu Allantoin oxidieren (Kaur et al. 1990). Auch Proteine, welche freies Eisen (z.B. Transferrin) oder Kupfer (Coeruloplasmin) binden und somit die Bildung von Hydroxyl-Radikalen minimieren können, werden zu den Antioxidantien gezählt. Sie fungieren meist als Kofaktoren für direkte Antioxidantien wie die Glutathionperoxidase, die Superoxiddismutase oder Katalase. Antioxidative Aktivität in biologischen Membranen oder Lipoproteinen hat  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E). Das Vitamin E ist das bedeutendste lipidlösliche Antioxidans. Es kann sich in Membranen einlagern und dort zur Termination von

Lipidperoxidationen führen. Als Regenerator für das Vitamin E fungiert Vitamin C, welches in der wässrigen Phase neben dem GSH ein wichtiger Scavenger (Halliwell 1996) ist.

### 1.3.2 Antioxidative Enzyme

Zu den antioxidativ wirkenden Substanzen gehören Enzyme, wie die Glutathion- Peroxidase (GPX), welche zur Entgiftung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Verbrauch von reduziertem Glutathion (GSH) führt (Abb. 1.4). GSH wird zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert und steht nicht mehr als Antioxidans zur Verfügung. Die Rückführung der oxidierten in die reduzierte Form unter Verbrauch von NADPH erfolgt durch die Glutathionreduktase. Die GPX befindet sich hauptsächlich im Zytosol und in der Mitochondrienmatrix und hat mit ihrer geringen Substratspezifität als antioxidatives Enzym einen hohen Stellenwert (Halliwell 1996).

Die Superoxid Dismutase (SOD) kontrolliert den Spiegel des Superoxids und baut es zu dem weniger reaktiven Wasserstoffperoxid ab (Fridovich 1974).



Das Vorkommen von Superoxiddismutasen ist ubiquitär. Sie sind in vielen Spezies nachgewiesen, wobei die Konzentrationen organspezifisch schwanken. Hohe Konzentrationen finden sich vor allem in den stoffwechselaktiven Organen wie der Leber und der Niere. In eukaryontischen Zellen findet sich die SOD vorrangig im Zytosol, ist aber auch in Lysosomen, Peroxysomen, im Kern und in der äußeren mitochondrialen Membran zu finden. Je nach Spezies und Gewebe gibt es verschiedene Isoenzyme, welche die Dismutation von Superoxidanionen katalysieren. Sie werden nach dem zentralen Metallanteil in Mangan- (Mn-SOD), Eisen- (Fe-SOD), und Kupfer/Zink-Superoxiddismutasen (Cu/Zn-SOD) unterteilt. Die Disproportionierungsreaktion, d.h. Superoxid ist hier Reduktionsmittel und Oxidationsmittel, läuft sehr schnell ab, so dass intrazellulär gebildete Superoxidanionen gleich am Ort des Entstehens abgefangen werden können. In diesem Prozess wechselt das Metall im aktiven Zentrum des Enzyms seinen Oxidationszustand.

Ein weiteres Enzym der antioxidativen Abwehr ist die Katalase (Wasserstoffperoxid-Oxidoreduktase) im Zellplasma und in den Peroxysomen (Halliwell und Gutteridge 1999). Besonders häufig kommen Katalasen in Hepatozyten und in Erythrozyten vor. Die Katalase fungiert als Hämenzym bei der Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser. Dabei dient Wasserstoffperoxid selbst als Elektronendonator.





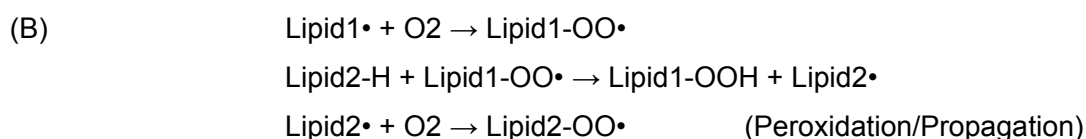
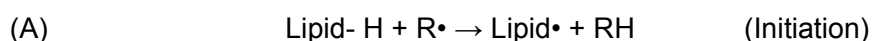
Unter normalen Umständen wirken SOD und Katalase stets zusammen, so dass Superoxid zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden kann. Zusammen mit der Glutathion-Peroxidase schützt sie Hämoglobin und andere Proteine, die SH-Gruppen tragen, vor dem oxidativen Schaden.

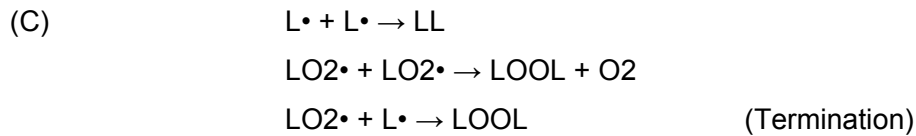
#### 1.4 Pathomechanismus der ROS-Schädigung

Der oxidative Stress ist durch ein Ungleichgewicht zwischen anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies und den Schutzmechanismen gekennzeichnet. Zellen, die oxidativem Stress ausgesetzt sind, können ihren Zustand temporär oder dauerhaft ändern, man spricht hierbei von Adaption, wie z.B. durch die Induktion von antioxidativen Verteidigungsmechanismen, „heat-shock“-Proteinen oder Cytochrom P450. Ist eine solche Adaption aufgrund der Stärke oder der Art des oxidativen Stresses nicht möglich und kommt es zur Erschöpfung der antioxidativen Schutzsysteme und in deren Folge zu FR-induzierten Zellschäden (Abb. 1.5). Wegen ihrer hohen Reaktivität können FR praktisch mit allen molekularen Strukturen der Zellen reagieren, was je nach Lebensdauer des Radikals, Bildungsort und Reaktionspartner zu strukturellen und funktionellen Störungen bis hin zum Zelltod führen kann. Dabei können alle Biomolekülhauptklassen von FR angegriffen werden (Gutteridge und Halliwell 2000).

##### 1.4.1 Lipidperoxidation

Besonders anfällig sind mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Gutteridge 1982). Die Folge davon ist die oxidative Aufspaltung der Fettsäure. Dieser als Lipidperoxidation beschriebene Vorgang kann zur völligen Zerstörung von Zellmembranen führen, da die Zellmembran, mit ihrem hohen Gehalt von mehrfach-ungesättigten Fettsäuren und Membranphospholipiden, gegenüber oxidativen Prozessen besonders empfindlich ist. Oxidantien reagieren dabei mit Fettsäuren und können über Zwischenstufen das Peroxyradikal generieren. Initiiert wird die Lipidperoxidation durch Abspaltung eines H• von einer ungesättigten Fettsäure (Lipid-H) durch ein FR (R•). Mit Sauerstoff kann das Lipidradikal (Lipid•, L•) reagieren und eine Kettenreaktion, bestehend aus Initiation, Peroxidation und Termination in Gang setzen (Abuja et al. 2001).





Im Rahmen der Lipidperoxidation entstehen Aldehyde, welche weitere reaktive Eigenschaften besitzen und die Molekülstruktur von Proteinen, Enzymen, RNA und DNA schädigen können. Ein Hauptabbauprodukt der Oxidation von Membranlipiden ist Malondialdehyd (OHC-CH<sub>2</sub>-CHO, MDA). MDA hat eine unterschiedliche Reaktivität (abhängig vom pH) und reagiert mit Proteinen, Aminosäuren und DNA-Basen (Halliwell und Gutteridge 1999).

#### 1.4.2 Oxidation von Proteinen

FR oxidieren Proteine abhängig vom Aminosäure-Typ (Bertlett und Stadtman 1997). Eine der grundlegendsten Reaktionen ist dabei die Oxidation von SH-Gruppen, Cystein und Methionin, welche in Folge zu Disulfiden oder Sulfoxiden oxidiert werden. Arginin und Lysin reagieren unter Anwesenheit von ROS zu Aldehyden weiter. Neben der direkten Schädigung durch FR können Proteine von den Produkten der Lipidperoxidation modifiziert werden. Oxidierte Proteine und Enzyme werden physiologisch über die Proteolyse in den Proteasomen entfernt. Werden Proteasomen unter erhöhtem oxidativen Stress in ihrer Funktion gestört, kann es zu einer Akkumulation oxidierter Proteine und Enzyme kommen, welche die zelluläre Integrität beeinträchtigen können und zur Apoptose oder Nekrose führen (Halliwell und Gutteridge 1999, Hensley et al. 2002).

#### 1.4.3 DNA- Schäden

Gleichzeitig können FR als Signalmoleküle auch die Signaltransduktion und DNA modifizieren. ROS agieren als Signalmoleküle in verschiedenen Zelltypen und beteiligen sich damit an der Modifikation von physiologischen Reaktionen, welche mit Rezeptor-Liganden Bindungen und Transkriptionsaktivierung verbunden sind. Somit spielen sie eine Rolle in der Kontrolle von Apoptose und Nekrose. Insbesondere in der DNA kann es durch oxidative Veränderungen an den Nucleotid-Basen zu Fehlpaarungen und in der Folge zu Punktmutationen, Strang- und Chromosomenbrüchen kommen (Halliwell und Gutteridge 1999, Hensley et al. 2000).

#### 1.4.4 Sonderrolle des NO

•NO kann aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften ungehindert Membranen überwinden und direkt ins Gewebe diffundieren (Radi et al. 1998). Luminal freigesetztes NO inhibiert die Leukozytenadhäsion an der Gefäßwand und hemmt die Thrombozytenaktivierung und Aggregation (Radomski et al.1992). In der unspezifischen Immunabwehr werden Bakterien und

Parasiten von Makrophagen durch Bildung von NO (durch Induktion der iNOS) und Superoxidanionen abgetötet (Pacher 2007).

NO kann aber auch toxisch gegen körpereigene Zellen, Proteine und Enzyme wirken (Pacher et al. 2007). So kommt es beim „oxidative burst“ durch die Zellen der unspezifischen Immunabwehr zur Bildung von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid-Radikalen. Die infolge der Reaktion mit Sauerstoff- und Hydroxylradikalen ausgelösten Peroxynitritbildung hat eine besonders zytotoxische Wirkung wie z.B. auf Endothel. Bei hohen Konzentrationen, kann die Apoptose aber auch durch NO selbst aktiviert werden z.B. direkt über eine Reaktion mit der DNA (Inoue und Kawanishi 1995).

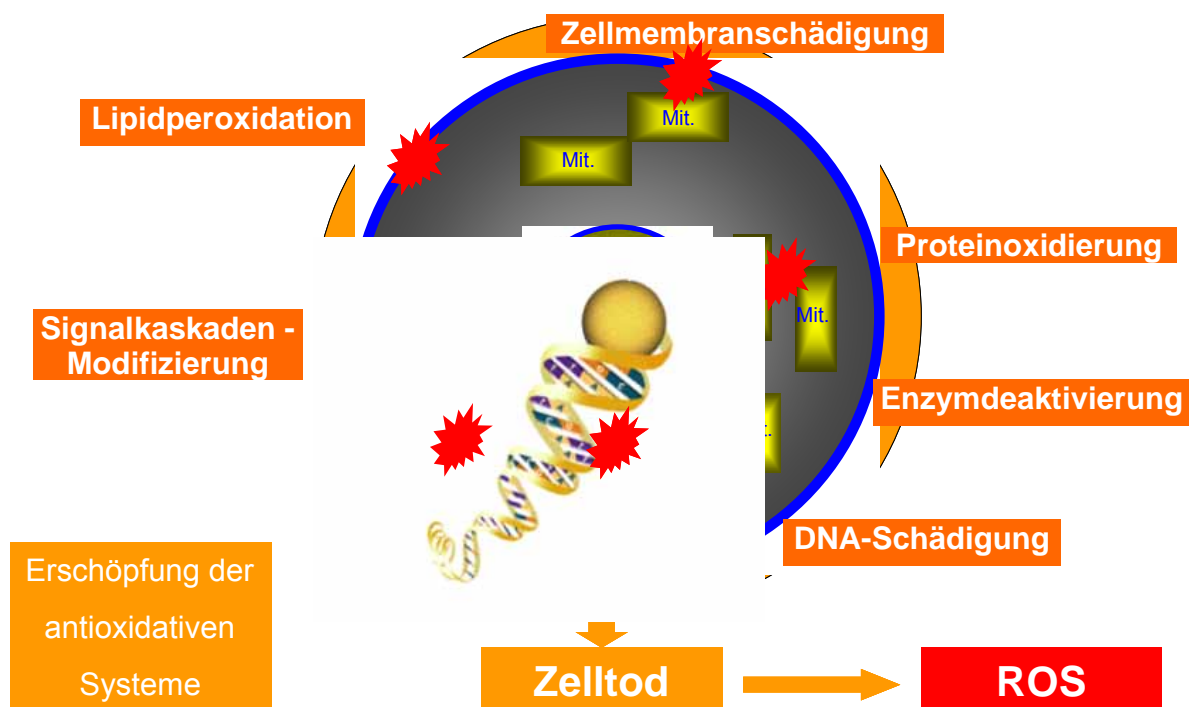



Abb. 1.5 *Mechanismen der Schädigung durch FR*  
 Mit.=Mitochondrium,  = Schädigung durch FR

## **1.5 Theoretische Grundlagen der FR-Messung**

Die Bestimmung von FR ist aufgrund der enormen Reaktionsfreudigkeit und deren extrem kurzer Halbwertszeit problematisch. Hinzukommend können endogene antioxidative Systeme die Messung erschweren (Abuja et al. 2001, Halliwell et al. 2004). Die Bestimmung des oxidativen Status erfolgt deshalb entweder direkt oder indirekt über stabile Endprodukte.

### **Direkte Spintrap Methoden**

Instabile, kurzlebige Radikale wie z.B.  $\bullet\text{O}_2$ - und  $\bullet\text{OH}$  können mit sog. Spin Traps stabilere, für das jeweilige Radikal spezifische Addukte bilden und sind somit der Detektion zugänglich gemacht werden. Gebräuchliche Spin Traps sind z.B. Verbindungen wie 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO) und 5-Diethoxy-Phosphoryl-5-Methyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DEPMPO). Der Nachteil der Spin Trap Methode ist, dass FR nur in vitro und nicht in vivo gemessen werden können. Trotzdem sollen die Spin Trap-Methoden der Vollständigkeit halber nachfolgend kurz beschrieben werden

### **ESR-Spektroskopie**

Die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) ist eine Methode zum Nachweis paramagnetischer Spezies und eine der sensitivsten Möglichkeiten zum Nachweis von Radikalen (Connor et al. 1992, Halliwell et al. 2004). Diese sind durch ihre ungepaarten Außenelektronen paramagnetisch, d.h. sie besitzen ein magnetisches Moment. Das Messprinzip beruht auf der Absorption von Mikrowellenenergie aus einem hochfrequenten elektromagnetischen Feld. Bei Erfüllung bestimmter Resonanzbestimmungen erfolgen Übergänge der ungepaarten Elektronen zwischen den Energieniveaus. Praktisch wird die zu untersuchende Probe mit einer konstanten Mikrowellenfrequenz bestrahlt und die angelegte magnetische Feldstärke verändert. Bei Resonanz entsteht ein Absorptionssignal der Mikrowellen.

### **HLPC (High Performance Liquid Chromatographie)**

Die High Performance Liquid Chromatographie wird bei Verbindungen angewendet, die nur in Lösung mit einem spezifischen Reagenz detektierbar sind. Die Lösungen werden in eine Chromatographie-Säule injiziert und aufgetrennt. Am Ende der Säule erfolgt die Detektion über verschiedene physikalische Eigenschaften wie z.B. UV-Absorption, Fluoreszenz und der Differenz zwischen dem Refraktionsindex des Analysats und der mobilen Phase.

### **Indirekte Nachweismethoden**

Sind direkte Messungen nicht möglich, kann die Bestimmung der Endprodukte der Reaktionen der FR mit Spintraps spektrophotometrisch erfolgen. Diese Methoden sind gut validiert, aber unspezifischer als die direkten Methoden, da die Reagenzien nicht nur durch FR reduzierbar und äußerst sensibel gegenüber pH-Schwankungen sind (Halliwell und Whiteman al. 2004).

Ein Beispiel für die indirekten Bestimmungen ist die Messung verschiedener Folgeprodukte der Lipidperoxidation (Malondialdehyd, Dienkonjugate) beziehungsweise Lipidperoxidationsbedingte Gewebsveränderungen.

### **Messmethoden zum Nachweis von NO**

Proben menschlichen Blutes bedürfen aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO einer schnellen Aufarbeitung. Die Lebensdauer von NO ist abhängig vom pO<sub>2</sub>, vom pH, der Anwesenheit von Hydroxylradikalen, eisenhaltigen Molekülen und der Aktivität verschiedener Enzyme. Dies führt insbesondere in proteinhaltigen, biologischen Proben zu einer zusätzlich verkürzten Halbwertszeit (Halliwell et al. 2004).

Zur Analytik des Stickstoffmonoxids werden sowohl indirekte als auch direkte Messmethoden verwendet, welche sich z.T. unmittelbar aus dem NO-Stoffwechsel (Abbildung 2.4) ableiten (Tarpey et al. 2001).

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten des indirekten Nachweises von NO über seine Reaktionsprodukte im biologischen System, wie z.B. des cyclischen Guanosinmonophosphats (Murad et al. 1994) oder über die Aktivität der NO-Synthase. Des Weiteren kann die indirekte NO-Bestimmung über die Nitrat/Nitrit-Bildung erfolgen, da die Summe von Nitrat und Nitrit stöchiometrisch wie NO gebildet wird. Die Griess-Reaktion beruht auf der Umsetzung von Griess-Reagenz (Sulfanilsäure/N-(1-naphthyl)ethylendiamin) mit Nitrit zu einem Diazofarbstoff, dessen Absorption im sichtbaren Bereich bei 548 nm bestimmt wird, da die Absorption bei dieser Wellenlänge proportional zur Nitrit-Konzentration ist. Das Detektionslimit für Nitrit liegt in Abhängigkeit von der Sensitivität des Photometers und des molaren Extinktionskoeffizienten bei einer Konzentration von 0,1 µmol/l (Tarpey et al. 2001). Ein Vorteil dieser Methode ist auch die Erfassung geringer Bildungsraten über Nitrit und Nitrat, welche in menschlichem Plasma und in wässriger Lösung bis zu drei Stunden stabil bleiben (Moncada et al. 1994). Da der Griess-Assay v.a. für menschliche Plasma-Proben eine Störanfälligkeit aufweist, wurde der Nachweis auch mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder ESR versucht. Eine direkte Bestimmung von NO ist nur mit diesen Methoden möglich, welche aber für biologische Systeme teils noch nicht selektiv genug und für in vivo Systeme oder Messungen im Vollblut noch nicht

ausreichend validiert sind. Obwohl das Detektionslimit bei diesen Methoden sehr niedrig ist, erfordern sie aber einen hohen apparativen und zeitlichen Aufwand (Halliwell et al. 2004).

## **1.6 Die Rolle der Freien Radikale in der Organtransplantation**

In der allogenen Transplantation ist die Rolle von ROS und RNS bereits beschrieben worden, wie z.B. für die Transplantation von Leber, Niere und Herz (Halliwell und Gutteridge 1999, Connor et al. 1992, Forde et al. 1997). Die meisten Autoren befassen sich mit der ROS-Schädigung nach Ischämie und Reperfusion (I/R) und der antioxidativen Therapie.

Speziell in der allogenen Lebertransplantation gibt es zahlreiche Untersuchungen (Jaeschke et al. 1989, Connor et al. 1992, Iwamoto et al. 2002). In der IR nach Transplantation sind die zelluläre Hypoxie und Reoxygenierung zwei entscheidende Schritte. Infolge dessen kommt es zur Aktivierung von Thrombozyten, Leukozyten und Kupferzellen (Jaeschke et al. 1990, Jaeschke et al. 1991, Leo et al. 1997). Alle diese Zellgruppen können FR freisetzen, lassen sich aber wiederum durch FR stimulieren. In der Leber untersuchte ROS sind Superoxidradikale, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale. Eine schlechte Funktion des Transplantats nach Lebertransplantation wurde in Verbindung mit einer erhöhten Plasmakonzentration von 7-beta-Hydroxycholesterol, einem Marker für oxidativen Stress, in Verbindung gebracht (Corradini et al. 2005). Des Weiteren wurde von der Reduktion des antioxidativen Status nach Reperfusion berichtet (Grezzana et al. 2004).

Der I/R-Schaden ist eng assoziiert mit sinusoidaler Vasokonstriktion während der Reperfusion, als Folge eines Ungleichgewichts der Vasokonstriktoren, wie Endothelin und Vasodilatoren wie NO. In der Leber wird NO unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich über die eNOS in den sinusoidalen Endothelzellen gebildet (Chen et al. 2003). Es wurde gezeigt, dass die eNOS besonders in der I/R vermindert ist, sodass es zu einer mikrozirkulatorischen Störung kommt (Varadarajan et al. 2004). Andererseits werden in den ersten ein bis sechs Stunden nach Reperfusion pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt, die iNOS aktivieren und ROS bilden (Arai et al. 1999, Chen et al. 2003). Auch durch die Ischämie aktivierte residente Makrophagen, die Kupferzellen (KC), werden für die ROS-Freisetzung direkt nach Reoxygenierung verantwortlich gemacht (Rymasa et al. 1991). Die KC setzen innerhalb von Sekunden über eine NADPH-Oxidase Superoxidradikale und Hydroxylradikale und über die iNOS verstärkt NO frei und sezernieren Zytokine wie TNF- $\alpha$  und Interleukin-1 (IL-1), welche CD4+T-Lymphozyten aktivieren. Diese können wiederum ROS bilden und über Zytokine wie TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und GCSF die Kupferzellaktivität verstärken (Decker et al. 1990, Chen et al. 2003). Die Spätphase der I/R

ist durch eine massive Infiltration und Adhäsion von Neutrophilen charakterisiert, welche wiederum die FR-Freisetzung aggravieren (Jaeschke et al. 1991).

Die Frage bleibt, welche Zellpopulation (Leukozyten, Kupferzellen, Thrombozyten, Erythrozyten) hauptsächlich für den oxidativen Stress verantwortlich ist.

Zur Xenotransplantation selber gibt es zu diesem Thema bis dato keine Berichte. In einer eigenen Versuchsstudie unserer Arbeitsgruppe durch Dr. Zhao, konnten wir zeigen, dass in Bezug auf die Freisetzung von ROS ein wesentlicher Unterschied zwischen isogenen und xenogenen Versuchsgruppen besteht (unveröffentlichte Daten). Im Modell der isoliert perfundierten Rattenleber wurde die isogenen Versuchsgruppe mit Rattenvollblut und die xenogenen Versuchsgruppe mit humanem Vollblut perfundiert. Die Werte für die Lipidperoxidation (LPO) und Stickstoffmonoxide (NO) in der xenogenen Gruppe war im Vergleich zur reinen Ischämie-Reperfusion-Gruppe deutlich erhöht.

Da in dieser Studie aber in beiden Versuchsgruppen Vollblut verwendet wurde, ist die Bedeutung verschiedener Zellpopulationen für die Bildung von freien Radikalen während der hyperakuten Abstossung der xenotransplantierten Leber nicht geklärt und deshalb Gegenstand der vorliegenden Arbeit, die sich im Detail mit folgenden Fragen befasst:

## **1.7 Fragestellungen**

- Bestehen Unterschiede zwischen xenogener und allogener Perfusion?
- Welche Zellen sind für die Bildung von ROS/RNS bei der xenogenen Perfusion der Leber verantwortlich?
- Kann dies mit Zeichen der (hyper)akuten Abstossung korreliert werden?

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Verzeichnis der Abkürzungen

- Abb. Abbildung
- ADP Adenosin-5-diphosphat
- ALT Alanin-Amino-Transferase
- AST Aspartat-Amino-Transferase
- ATP Adenosin-5-triphosphat
- AMP Adenosin-5-monophosphat
- C Kohlenstoff
- Cyt. c Cytochrom c
- CL Chemilumineszenz
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- e- Elektron(en)
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- eNOS Endothelial Nitric Oxide Synthase
- ESR Elektronenspin-Resonanz
- FAD Flavinadenindinukleotid
- Fe<sup>2+</sup> Eisen(II)-Ionen
- Fe<sup>3+</sup> Eisen(III)-Ionen
- FR Freie Radikale
- GdCl<sub>3</sub> Gadolinium Chlorid
- GSH Glutathion (reduziert)
- GSSG Glutathion-Disulfid, Glutathion (oxidiert)
- H<sub>2</sub> Wasserstoff
- H<sup>+</sup> Wasserstoffion
- H<sub>2</sub>O Wasser
- HO<sub>2</sub>• Hydroperoxyradikal
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Wasserstoffperoxid
- HE Hämatoxylin-Eosin-Färbung
- HS Harnsäure
- I/R Ischämie-Reperfusion
- IL-1 Interleukin-1
- iNOS Inducible Nitric Oxide Synthase



- KC Kupferzellen
- LDH Laktat-Dehydrogenase
- LPO Lipidperoxidation
- M molar (Mol pro Liter)
- MAC membran attack complex
- MDA Malondialdehyd (OHC-CH<sub>2</sub>-CHO)
- MnSOD Mangansuperoxiddismutase
- mRNS messenger Ribonucleinsäure
- n Anzahl, Stichprobenumfang
- NaCl Natriumchlorid
- NAD(P)<sup>+</sup> Nicotinamidadenindinukleotid(-phosphat) (oxidiert)
- NAD(P)H Nicotinamidadenindinukleotid(-phosphat) (reduziert)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Dinatriumphosphat
- NaOH Natriumhydroxid
- •NO Stickstoffmonoxid
- O<sub>2</sub> Sauerstoff
- •O<sub>2</sub><sup>-</sup> Superoxidanion
- •OH Hydroxylradikal
- OH<sup>-</sup> Hydroxidion
- ONOO<sup>-</sup> Peroxynitrit
- pH negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
- • Symbol für ein ungepaartes Elektron
- PAF Plättchen aktiverender Faktor
- PBS phosphat buffered saline – phosphatgepufferte Salzlösung
- ROS reactive oxygen species -reaktive Sauerstoffspezies
- RNS reaktive Stickstoffspezies
- RNA Ribonucleinsäure
- s Sekunden
- SD Ratten Sprague-Dawley Ratten
- SEM Standardfehler des Medians
- SOD Superoxiddismutase
- TNF Tumor Nekrose Faktor
- U units – (internationale) Einheiten
- WBC white blood cells; Leukozyten

## 2.2 Herstellernachweis der Reagenzien

In den nachfolgend beschriebenen Versuchsdurchführungen wurden die hier aufgeführten Reagenzien verwendet (übliche Bezeichnung der Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge):

- Alkohol: Ethanol 99,8% absolut, M = 46,07g/mol, J.T. Bahr, Deventer, Niederlande
- Alselvers Puffer: 38 mmol/L Zitronen-Säure, 75 mmol/L Trisodium Ziträt, 100 mmol/L Dextrose. Institutseigene Herstellung
- Aqua dest.: gefiltertes Leitungswasser, Filtersystem Mill-Q® Reagent WaternSystem, Millipore Molsheim, Frankreich
- Atropin: ASTA Medica, Frankfurt, Deutschland
- Diethylether: reinst, Merck, Darmstadt, Deutschland
- EDTA Ethylendiamin tetra-acedic acid 99%: Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- Gadolinium Chlorid, Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- Griess-Reagenz: Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- HAES: Hydroxyethylstärke, Braun, Melsungen, Deutschland
- Hämatoxylin: Kristallpulver, Merck, Darmstadt
- Heparin: Liquemin® N 2500, Heparin-Natrium 5000 IE/ml, Ratiopharm, Ulm, Deutschland
- HEPES N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- KCl: Merck, Darmstadt, Deutschland
- Krebs-Henseleit Puffer: 115mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,9 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES, pH 7,35. Institutseigene Herstellung
- MDA-Lösung: Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- NaCl: isotone Kochsalzlösung 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland
- NaHCO<sub>3</sub>: Natriumhydrogencarbonat, M=84,01 g/mol, Merck, Heidelberg, Deutschland
- Narcoren, Pentobarbital: Merial, Halbergmoos, Deutschland
- Nitrotyrosine-EIA: Oxis, Portland, USA
- PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline, Gibco BRL, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland
- Percoll: Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
- Prostaglandin E1: 650 nmol/l, Serva, Heidelberg, Deutschland
- Ringer-Lactat: Braun, Melsungen, Deutschland
- Tabotamp®: Resorbierbares Hämostyptikum, Ethicon, Norderstedt, Deutschland
- Trypanblau: Merck, Darmstadt, Deutschland

- Total tGSH Colorimetric Microplate Assay, Oxford Biomedical Research, Oxford MI, USA

### **2.3 Verbrauchsmaterialien**

- 10 ml Auslaufpipetten: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Braunüle® Vasofix®: (21 G, 20G und 17G), Braun, Melsungen, Deutschland
- 50 ml Falcon Röhrchen: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- 10 ml Röhrchen: Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Einmalspritzen Injekt®: (2, 5, 10, 20, 50 ml), Braun, Melsungen, Deutschland
- Blasenfalle: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Heidelberger Verlängerungen: Braun, Melsungen, Deutschland
- Hämofilter: Poren-Größe 60,mm, Swinnex 25, Milipore, Eschborn, Deutschland
- Kanülen Sterican®: (27G, 22G, 20G), Braun, Melsungen, Deutschland
- Neubauerzählkammer: Brand Gläser, Wertheim, Deutschland
- Oxygenator: (Institutseigenes Modell), ICF, München, Deutschland
- Oxygenatorleitungen: Detakta, Norderstedt, Deutschland
- Pall Purecell® NEO Neonatal High Efficiency Leukocyte Reduction Filter: Pall Medical, Dreieich, Deutschland
- Perfusorleitungen: Detakta, Norderstedt, Deutschland
- Petrischalen: Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
- Reservoir: ICF, München, Deutschland
- Rollerpumpe: Ismatec SA, Zürich, Schweiz
- Vicryl®: 3-0 resorbierbares Nahtmaterial, Ethicon, Norderstedt, Deutschland

### **2.4 Gerätenachweis**

- AC T8, Coulter: Beckmann, Krefeld, Deutschland
- Daisy Lab Software: Datalog, Moenchengladbach, Deutschland
- Druckumwandler COMP DT-XX: Ohmeda, Murray Hill, NJ, USA
- FACS-Gerät: Fluorescence Activated Cell Analyzer No. 80557, Becton Dickson, San Jose, USA
- Filter: Ether DAB, Hedinger GmbH, Stuttgart, Deutschland
- Mikroskop: Zeiss Axioskope, Oberkochen, Deutschland
- Ultramikrotom: Cryo-Ultramikrotom, Leica, Wetzlar, Deutschland
- Zentrifuge: Zentrifuge Rotanta/ S, Hettich, Tuttlingen, Deutschland
-

## **2.5 Herstellernachweis der Antikörper**

- ED1: Maus IgG1, DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
- ED2: Maus IgG1, DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland
- C5-9b: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- C3c: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- P-Selectin: CD62P, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Von Willebrand: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Alle Konzentrationsangaben ohne nähere Erläuterung verstehen sich als Initialkonzentrationen im Reaktionsansatz. Soweit möglich wurden alle Stammlösungen frisch hergestellt und ihre Konzentrationen unter Verwendung der entsprechenden molaren Extinktionskoeffizienten spektralphotometrisch kontrolliert.

## **2.6 Verwendete Tiere**

Die Versuche wurden nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern (Az.: 209.1/211-2531-45/02) am Institut für Chirurgische Forschung (ICF) unter Einbehaltung der Tierschutzbestimmungen durchgeführt. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen der tierexperimentellen Abteilung der oben genannten Einrichtung. Alle Tiere wurden in einem 12-h Tag-Nachtrhythmus gehalten und mit kommerziell verfügbarem Rattenfutter gefüttert und erhielten Wasser ad libitum.

Weibliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 250g-300g wurden von Charles River, Sulzfeld, Deutschland bezogen und für die Perfusionsversuche verwendet.

Als Blutspender dienten für die isogenen Versuche weibliche SD-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 250 mg und 300 mg. Die Tiere wurden 30 min vor Versuchsbeginn zunächst mit Äther narkotisiert und nach Eröffnung des Abdomens über die Aorta abdominalis mit einer heparinisierten 50 ml Spritze exsanguiniert und das Spenderblut bei 37°C im Wasserbad warmgehalten. Gesunde humane Blutspender (weiblich n=3, männlich n=6) standen für die xenogenen Versuche zur Verfügung. Hierbei wurden jeweils 50 ml Blut in minimal- heparinisierten Spritzen über die Armvenen gewonnen und das Spenderblut im beheizten Wasserbad bei 37°C warm gehalten.

## 2.7 Versuchsgruppen

Um den Beitrag der einzelnen Zellpopulationen zur Bildung von freien Radikalen untersuchen zu können wurde, in fünf Versuchsgruppen (A, B, C, D and E) mit jeweils neun Tieren das Perfusat variiert:

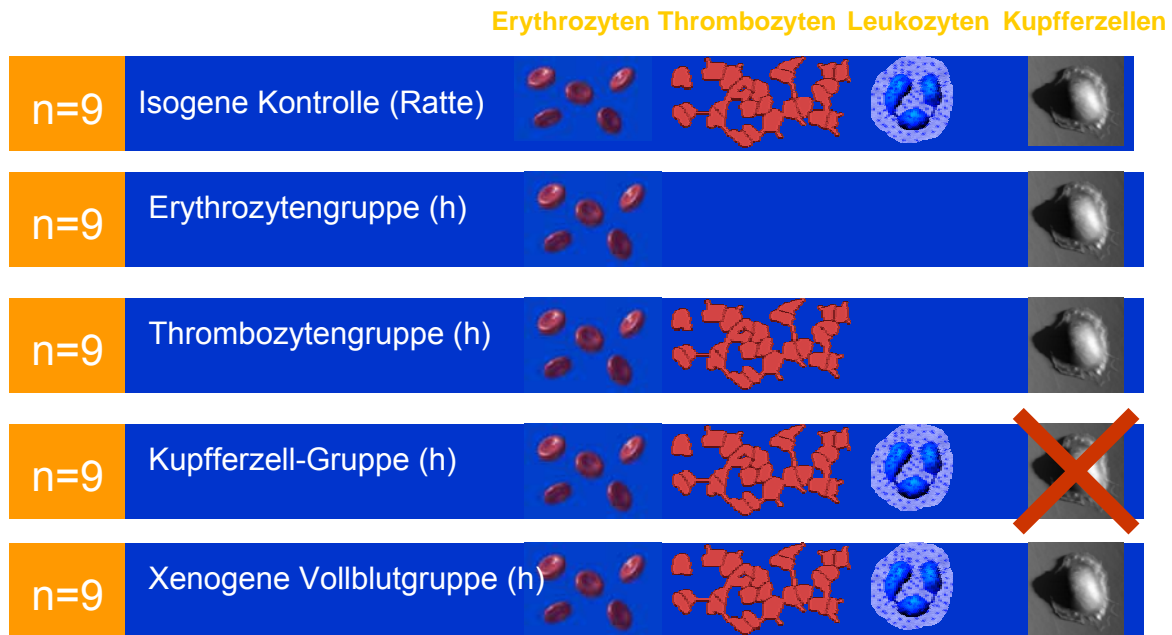


Abb 2.1 Versuchsgruppen: eine isogene Kontrollgruppe (Ratte) und vier xenogene Gruppen (h=humanes Perfusat) wurden untersucht. In der KC-Gruppe wurden den Ratten zur KC-Depletion 24 Stunden vor dem Versuch GdCl<sub>3</sub> i.v. über die Schwanzvene appliziert.

### 2.7.1 Isogene Kontrollgruppe

In unserer isogenen Kontrollgruppe wurde als Perfusionsmedium SD-Rattenvollblut verwendet. Alle Ratten wurden zunächst mit einer Inhalations-Anästhesie und Pentobarbital-Injektion betäubt und danach das Abdomen über einen Medianschnitt eröffnet. Die Tiere wurden mit einer heparinisierten Spritze über die Aorta abdominalis exsanguiniert. Um in allen Versuchsgruppen vergleichbare Ausgangswerte zu erhalten, wurde das Blut in dieser Gruppe, wie auch in allen anderen, anschließend mit Krebs-Henseleit-Puffer auf einen Hämatokrit von 30% verdünnt.

### 2.7.2 Erythrozytengruppe

Um die Bedeutung der Erythrozyten bei der Produktion von FR überprüfen zu können, wurden die Lebern in der zweiten Gruppe mit Perfusaten bestehend aus Serum und Erythrozyten perfundiert. Hierzu wurde humanes Vollblut durch einen Leukozytenreduktions-Filter (Pall Purecell®) geleitet, welcher den „Buffy-Coat“ entfernte. Dieser Filter wurde für neonatale und

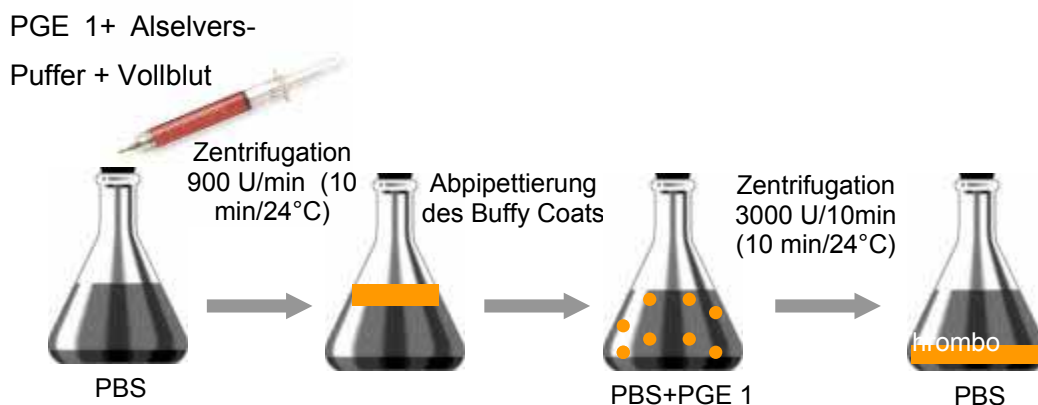
pädiatrische Bluttransfusionen entwickelt (Eisenfeld et al. 1992). Laut Anzeige des Herstellers reduziert dieser Filter die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten auf unter  $2 \times 10^5$  Zellen pro 175 ml.

### 2.7.3 Thrombozytengruppe

In der weiteren Ausführung wird diese Versuchsgruppe als Thrombozytengruppe bezeichnet. Zur Herstellung des Perfusats, das aus Serum, Erythrozyten und Thrombozyten bestand, wurde menschliches Vollblut zunächst mit dem oben genannten Leukozytenreduktions-Filter vorbehandelt. Die Separation der Thrombozyten wurde nach dem optimierten Protokoll von Massberg et al. durchgeführt (Massberg et al. 1998), welches in unserem Institut entwickelt wurde.

Zunächst wurde das Vollblut (50 ml) mit PGE1 (700  $\mu$ l, 650 nmol/l) und Alservers Puffer (10 ml) aufgenommen und danach jeweils 10 ml vom Lösungsgemisch mit 5 ml PBS versetzt und bei 900 U/min für 10 min bei 24°C zentrifugiert. Danach wurde der Buffy Coat abpipettiert und das thrombozytenreiche Plasma einem Wachsritt mit PGE1 (150  $\mu$ l) und PBS (7 ml) unterzogen und anschließend bei 3000 U/min für 10 min bei 24°C zentrifugiert. Das resultierende Thrombozytenpellet wurde anschließend mit PBS re-diluiert.

Die erfolgreiche Isolation und eventuelle Kontamination durch andere Zelltypen, wurden vor Versuchsbeginn anhand des Cell Counts überprüft. Die Funktion der Thrombozyten, d.h. ob die isolierten Thrombozyten durch die Isolierung per Zentrifugation nicht aktiviert und noch aktivierbar waren, wurde durch die Flowzytometrie (P-Selektin) überprüft.



**Abb 2.1** Gewinnung von isolierten Thrombozyten aus menschlichem Vollblut nach dem Protokoll von Massberg et al. 1998.

#### **2.7.4 Kupfferzell-Gruppe**

Die KC wurden durch die Gabe des Lanthanoids Gadolinium Chlorid (GdCl<sub>3</sub>) depletiert. GdCl<sub>3</sub> wurde den Ratten über die Schwanzvene mit einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht 24 Stunden vor Versuchsbeginn appliziert. Diese frühe Gabe sollte sicherstellen, dass ROS, welche beim Untergang von KC entstehen könnten, vor dem Versuch sicher eliminiert waren.

Gadolinium Chlorid (GdCl<sub>3</sub>) ist ein wasserlösliches toxisches Lanthanoid-Metallchlorid, welches eine selektive Blockade der KC bei 5-20 mg/kg KG bewirkt (Vollmar et al. 1996, Adding et al. 2001). GdCl<sub>3</sub> bildet bei >pH 6.0 kolloidale Aggregate mit Serumproteinen, welche durch Kupfferzellen aufgenommen werden. Diese lösen sich im endosomalen-lysosomalen Kompartiment (<pH 6.0) auf. Es folgt die Desintegrierung der Plasmamembran und die nachfolgende Apoptose der betroffenen Kupfferzelle. Die Behandlung zeigte eine Destruktion bis zu 80% der KC und eine Blockade der Phagozytose der Gewebs- Makrophagen (Hardonk et al. 1992, Adding et al. 2001). Um die Deletion der KC in unseren Versuchslebern nachzuweisen wurden im Anschluss an die Versuche Färbungen mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und ED2 als Marker für Makrophagen-Subpopulationen durchgeführt. ED1 ist ein Marker für Ratten-Monozyten und Makrophagen (Dijkstra et al. 1985). Das Antigen wird von den Gewebemakrophagen auf der lysosomalen Membran stark und von peripheren Zellen schwach exprimiert. ED2 erkennt residente Makrophagen und Ratten-Kupfferzellen über ein Antigen an deren Zellmembran.

#### **2.7.5 Xenogene Vollblutgruppe**

Die xenogene Kontrollgruppe wurde mit menschlichem Vollblut perfundiert, welches von neun gesunden freiwilligen Spendern über die Armvenen abgenommen wurde. Die Antikoagulation erfolgte mit Heparin (100 IU/ml). Durch Zugabe von Krebs-Henseleit Puffer wurde der Hämatokrit des Perfusates auf einen Wert von 30% eingestellt (Riedel et al. 1983).

Die Perfusate wurden bei einer konstanten Temperatur in einem beheizten Reservoir bei 37°C bis zum eigentlichen Versuch aufbewahrt.

### **2.8. Modell der isoliert-perfundierten Rattenleber**

#### **2.8.1 Chirurgische Prozedur**

Die SD-Ratten wurden zunächst mit der Inhalation von Äther und einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital (60 mg/kg KG Narcoren) narkotisiert und mit Atropin (0,1 ml) zur Prävention einer Bradykardie i.m. prämediziert. Anschließend erfolgte nach der longitudinalen

Laparatomie des Ratten-Abdomens die behutsame Freilegung der Leber. Das Organ wurde von den Ligamenten befreit, nach kranial mobilisiert und mit einer Klarsichtfolie zum Schutz vor Austrocknung abgedeckt. Beim Leberspender wurde zunächst der Ductus choledochus mit einem 2 cm langen Polyethylen-Katheter (Innendurchmesser 1,7 mm) kanüliert. Die basale Galle-Produktion wurde während der intakten autologen Leberzirkulation für 15 Minuten gemessen. Die Antikoagulation mit Heparin (200 IE) erfolgte anschließend über die Vena iliaca. Nach Ligatur der infrahepatischen Vena cava, Vena hepatica und V. splenica (um einen Rückfluß zu verhindern) erfolgte die Kanülierung der Vena porta und Vena cava inferior (nach Eröffnung des Brustkorbes und retrograder Kanülierung über den rechten Vorhof) jeweils mit einem 21 G Katheter. Diese Katheter dienten im Folgenden als Zu- und Abfluss für das Perfusat. Die Tiere wurden anschließend mit einer Überdosis Pentobarbital und durch die vollständige Eröffnung des Thorax euthanisiert. Anschließend wurde die Leber solange mit 4°C Ringer-Laktat (+200µl Heparin) blutleer gespült, bis die Zellzahl im Eluat unter 1000 Zellen/µl fiel. Dies wurde mittels Coulter Counter überprüft.

### **2.8.2 Perfusionsmodell und Perfusionsvorgang**

Die so isolierte Leber wurde an das in der Abb. 2.3 beschriebenen Perfusionssystem angeschlossen und über die V. portae flusskonstant mit isogenem bzw. xenogenem Blut perfundiert. Das in dieser Studie verwendete Perfusionssystem wurde von unserer Arbeitsgruppe am Institut für Chirurgische Forschung (ICF) entwickelt und konstruiert.

Dieses Perfusionssystem bestehend aus Rollerpumpe, beheizbarem Oxygenator (Institutseigenes Modell), Filter, Blasenfalle (institutseigenes Modell) und beheizbarem Reservoir erlaubt die Perfusion der Rattenleber unter physiologischen Bedingungen (Thein et al. 2001). Das auf 38°C temperierte Blut wird mit Hilfe einer Rollerpumpe aus dem beheizten Reservoir in ein Schlauchsystem gepumpt. Es passiert zunächst einen Oxygenator bestehend aus einem dünnen, gasdurchlässigen Schlauch (Silikonkautschukgemisch, Wandstärke 0,2 mm, Innendurchmesser 1 mm, spiralförmig um einen Wärmekern gewickelt) und wird über einen Hämofilter (Swinnex 25, Porengröße von 60 µm) und eine Blasenfalle in die Vena porta und die Leber geleitet. Nach der Passage durch das Organ fließt das Blut über die Vena cava wieder zurück in das Reservoir.

Nach einer Gesamt-Ischämiezeit von 45 min wurde die Spenderleber mit einer konstanten physiologischen Flussrate von  $1,1 \pm 0,1$  ml/min/g Leber in dem geschlossenen Kreislauf mit den oben beschriebenen Perfusaten perfundiert. Das Start-Volumen der Perfusate betrug 30 ml in der isogenen Gruppe und 50 ml in den xenogen-perfundierten Gruppen. Zu allen Zeiten betrug die Temperatur konstant 38°C. Der Säure-Basen Haushalt der Perfusate wurde auf



physiologische Werte eingestellt (pH 7,35-7,44, PaO<sub>2</sub> >70 mmHg, PaCO<sub>2</sub> 36-44 mmHg, Base excess 2mmol/L). Dies erfolgte über die steuerbare Zufuhr von CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> oder die Zugabe von Natriumbikarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) zum Perfusat nach Bedarf. Die in situ perfundierte Leber wurde über zwei Heizkissen auf konstante 38°C gewärmt. Das Perfusat wurde auf 38,0 ± 0,5° Celsius durch das mit dem Wärmekern im Oxygenator verbundene, regulierbare Wasserbad und Reservoir erwärmt. Unmittelbar vor der Eintrittsstelle des Blutes in die V. porta wurde ein Druckumwandler über einen Hochfluss-Dreivehgeahn in das Perfusionssystem integriert, der zur Messung des Perfusionsdruckes mit einem Computer (Software DASY-Lab) verbunden war.

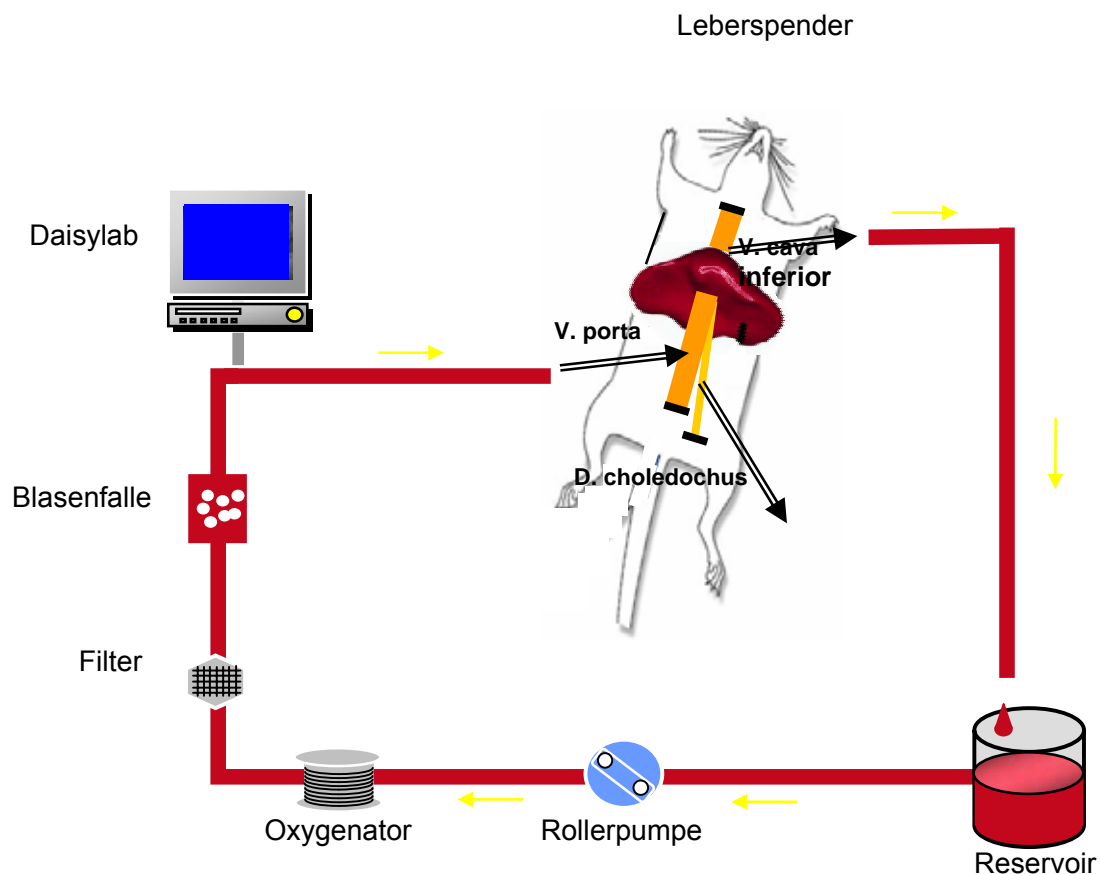


Abb. 2.2 Schematisches Modell der isoliert-perfundierten Rattenleber (mod. nach Terajima)

## 2.9 Versuchsprotokoll

Die Perfusate wurden 30 Minuten vor Beginn der Versuche gewonnen und in einem Wasserbad bei 38°C konstant gehalten. Nach Präparation des Leberspenders und einer kalten Ischämiezeit von 45 Minuten wurden die Lebern mit den jeweiligen Medien für 120 Minuten perfundiert.

Blutproben für die Messungen wurden über den in der V. cava inf. liegenden Katheter gewonnen. Die Blutproben wurden sofort nach der Entnahme aus dem Perfusionssystem in einer handelsüblichen Tischzentrifuge mit 3000U/min für 2 min Minuten zentrifugiert und das so gewonnene Serum bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert oder im flüssigen Stickstoff schockgefrostet oder für die ROS-Assays zum Teil sofort weiterverarbeitet.

Das Versuchsprotokoll sah unter Berücksichtigung der wichtigsten Parameter folgendermaßen aus:

Ischämiezeit	1	5	15	30	60	90	120
ROS/RNS	λ	λ	λ	λ	λ	λ	λ
Leberenzyme	λ		λ	λ	λ	λ	λ
Portaldruck	λ			λ	λ		λ
Galle-Produktion			λ	λ	λ	λ	λ
Zellzahl	λ						

Abb. 2.3 Messzeitpunkte der Versuchsparameter (ROS/RNS, Leberenzyme, Galleproduktion, Portalvenendruck, Zellzahl im Perfusat) nach einer Ischämiezeit von 45 min. Nachfolgend im Text sind die jeweiligen Zeitpunkte für die einzelnen ermittelten Biomarker aufgeführt.

- **ROS/RNS-Marker**

Malondialdehyd (MDA), NO, Gluthation (GSH): 45 min vor Reperfusion, dann zu den Zeitpunkten 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120 min.

Nitrotyrosin: 1, 60, 120 min

- **Leberenzyme (AST,ALT, LDH)**

45 min vor Perfusion und 1, 5, 15, 30, 60, 90 und 120 min.

- **Galleproduktion**

Die Galle wurde während der Reperfusion in Intervallen von 15 Minuten über einen Katheter im Ductus choledochus gesammelt. Der basale Gallefluss wurde über 15 Minuten in vivo bestimmt. Die Messung wurde in Mikroliter Galle pro Gramm Körpergewicht und Minute angegeben (Bowers et al. 1987).

- Der **Portalvenendruck** als Parameter der Makrohämodynamik wurde alle 30 Minuten aufgezeichnet. Er wurde kontinuierlich über einen Drucksensor, der an das Perfusionssystem angeschlossen war, mit Hilfe von DASY-Lab gemessen.

- **Zellzahl**

Die Zahl der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten wurden vor und nach der Reperfusion bestimmt (Cell-Coulter).

- **Histologie**

Nach Abschluss des Versuches wurden die Leber im Ganzen entnommen, gewogen und histologische Proben jeweils aus der Peripherie und zentral entnommen.

## 2.10 Assays

### 2.10.1 Leberfunktion-Assays

Die Perfusatproben wurden zentrifugiert das Serum abpipettiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Den auftretenden Leberschaden erhoben wir anhand der Leberenzyme Aspartat-Amino-Transferase (AST), Alanin-Amino-Transferase (ALT) und Laktat-Dehydrogenase (LDH). Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) im Serum ist ein unspezifischer Marker für die Schädigung von Gewebe und Zellen. Die Konzentration der Alaninaminotransferase (ALT) im Serum und der Aspartat-Amino-Transferase (AST) im Serum gilt als ein Maß für eine schwere Schädigung des Leberparenchyms. AST ist insbesondere ein Marker für den Untergang der Mitochondrien, da es zu 70% mitochondrial gebunden ist.

Die genannten Enzyme wurden in den Blutproben mit freundlicher Unterstützung des Instituts für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern bestimmt.

### 2.10.2 FR-Assays

Zur Erfassung des oxidativen Stresses haben wir dann folgende Parameter gemessen (Abb.2.4): die reaktiven Stickoxidradikale wurden über die Reaktion von Nitrit/Nitrat mit dem

Griess-Reagenz bestimmt. Der durch die Freisetzung von freien Radikalen entstandene oxidative Stress wurde über die Lipidperoxidation mittels MDA-Assay nachgewiesen. Zusätzlich haben wir in einem ELISA die Konzentration von Peroxynitrit gemessen und die Erschöpfung der antioxidativen Systeme erfolgte über die Bestimmung der Konzentration des Gesamtglutathions.

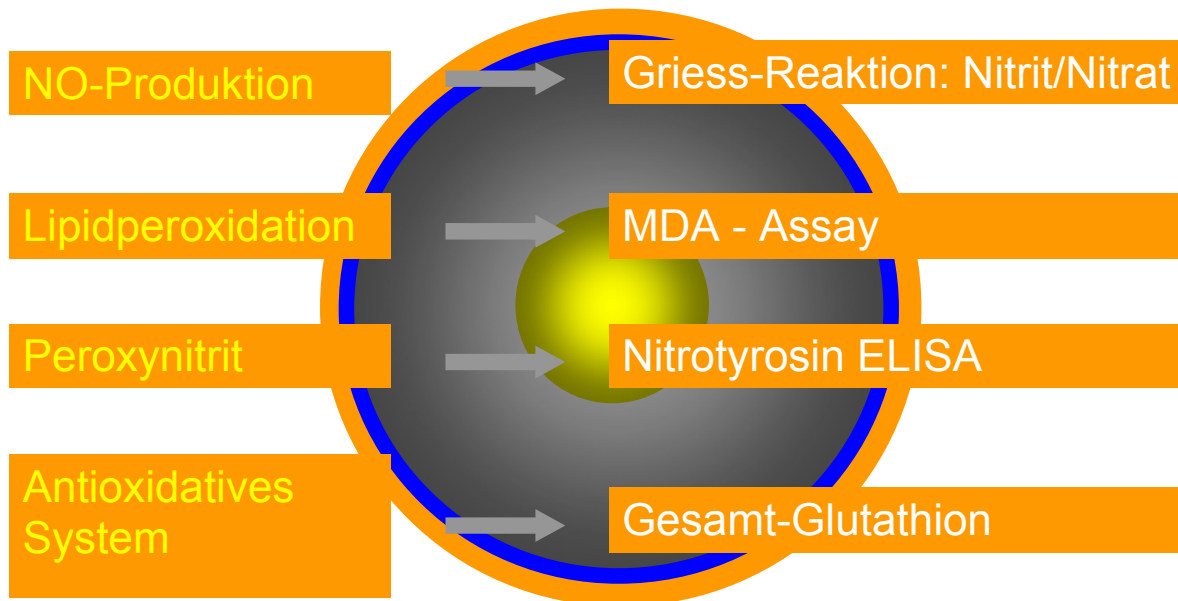


Abb. 2.4 Die Parameter des oxidativen Stresses: Erfassung der endogenen Stickoxid-Freisetzung über die Griess-Reaktion. Die Lipidperoxidation wurde über den MDA-Assay, Peroxynitrit über einen ELISA für Nitrotyrosin und das antioxidative System über die Konzentration des Glutathions bestimmt.

Nachfolgend werden die einzelnen von uns verwendeten laborchemischen Assays zur Bestimmung des oxidativen Stresses beschrieben:

### 2.10.2.1 Bestimmung der endogenen Stickoxid-Freisetzung (Griess-Reaktion)

Die endogene Stickoxid-Freisetzung kann spektrophotometrisch über die Bestimmung seiner stabilen Endprodukte Nitrit und Nitrat gemessen werden. Das Verhältnis von Nitrit zu Nitrat ist variabel und abhängig von dem Weg der oxidativen Inaktivierung des NOs. Während die Reaktion mit Superoxidanionen hauptsächlich Nitrat hervorruft, kommt es bei der Reaktion von Stickoxid mit molekularem Sauerstoff zur Produktion von Nitrit. Die am weitesten verbreitete Analysetechnik ist die kolorimetrische Reaktion von Nitrit mit dem Griess-Reagenz. Die Reaktion lief dabei in zwei Schritten ab: Die erste beinhaltete die

chemische oder enzymatische Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Die zweite bestand aus der Reaktion von Nitrit mit Griess-Reagenz. Nach Diazotierung von Sulfanilamid und Kopplung mit Naphthyldiamin kam es zu einem purpurnen Farbumschlag, der bei 540 nm gemessen wurde.

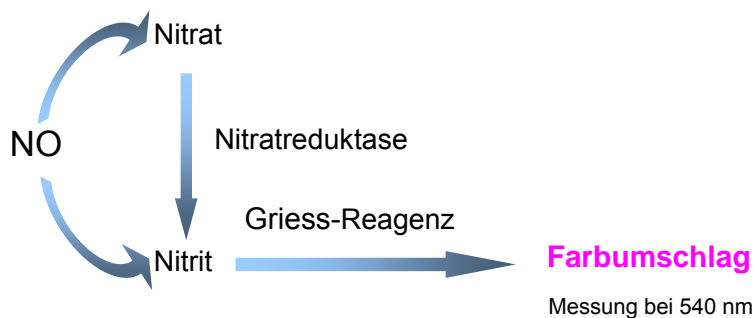


Abb 2.5 Griessreaktion zur Bestimmung der NO-Produktion

### 2.10.2.2 Lipidperoxidation (MDA/TBA-Assay)

Nach der Schädigung der Zellmembran durch FR kommt es zur Bildung von Lipidperoxiden. Das durch den Zerfall dieser Lipidperoxide entstandene Malondialdehyd MDA wurde mit Thiobarbitursäure (TBA) erhitzt. Es kam zu einem rosa-farbenem Farbumschlag, der bei 532 nm gemessen wurde.

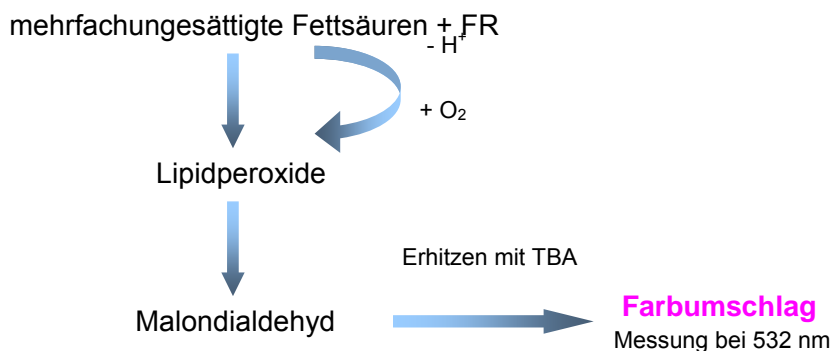


Abb 2.6 Bestimmung der Lipidperoxidation via MDA/TBA Assay

### 2.10.2.3 Peroxynitrit (Nitrotyrosin-Assay)

Peroxynitrit wird in der Reaktion zwischen den freien Radikalspezies NO und Superoxid gebildet. Peroxynitrit reagiert mit dem Phenolring von Tyrosin und bildet hierbei Nitrotyrosine. In dem vorliegenden Sandwich-ELISA wurde das Antigen an einen

monoklonalen Antikörper (nitriertes Maus-Hämoxyanin) gebunden und mit einem Biotin-markiertem polyklonalem Anti-Nitrosin Antikörper (Ziege) detektiert. Ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat band dann an den Antikörper. Nach Hinzufügen des Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrates wurde der gelbe Farbumschlag bei 450 nm gemessen.

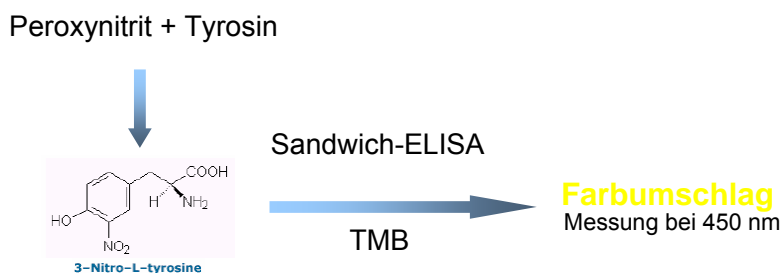


Abb. 2.6 Nitrotyrosin-Assay zur Bestimmung von Peroxyinitrit

#### 2.10.2.4 Antioxidativer Status (GSH/GSSG)

Glutathion ist als Coenzym des antioxidativen Enzyms Glutathionperoxidase essentiell. GSH vermindert durch seine eigene Oxidation die Anhäufung FR. Das Gesamt-Glutathion ist damit ein guter Indikator für den zellulären oxidativen Stress. Das GSH- Redoxsystem hat die Funktion, die SH-Gruppen der Enzyme und Proteine in reduzierten Zustand zu erhalten und so die Bildung von hochmolekularen Aggregaten zu verhindern. GSH vermindert durch seine eigene Oxidation zu GSSG die Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die physiologische Konzentration von GSH liegt zwischen 1-10 mM. Zur Bestimmung des Glutathion-Gehaltes benützten wir den kinetischen enzymatischen Assay von Oxford Biomedical Research. Der Glutathion-Gehalt wurde hierbei durch das Hinzufügen des Reagenz DTBN (2-Dithiobis-2-Nitrobenzolsäure) bestimmt. Der hervorgerufene Farbumschlag wird kolorimetrisch bei 405 nm gemessen.

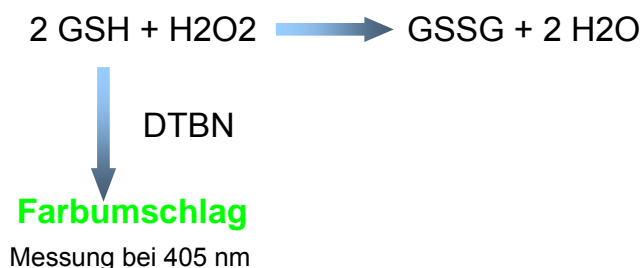


Abb. 2.7 Antioxidativer Status: Bestimmung von GSH/GSSG

## **2.11 Histologische Untersuchungen**

Am Ende der Versuche wurden Gewebeproben (ca. 3 x 3 x 3 mm große Quader) der Leber zur histologischen Untersuchung entnommen. Es wurde die Histologie aus periportalen und peripheren Proben angefertigt. Sofort nach Beendigung der Versuche erfolgte die Entnahme der Proben, welche entweder in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert oder in Paraformaldehyd für die weitere Verarbeitung fixiert wurden. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet und anschließend 3-4 µM dicke Gewebsschnitte angefertigt. Pro Versuchstier wurden jeweils eine zentrale und periphere Probe in mindestens fünf Quadranten analysiert.

Für die Routine-Mikroskopie wurden ein Teil der Proben mit Hämatoxylin und Eosin und Esterase zum Leukozytennachweis gefärbt. Hierbei wurden die Proben auf Intaktheit der Zellmorphologie, Hämorrhagien, Nekrosen, sinusoidale und vaskuläre Thrombosen untersucht. Um die Abstoßung zu quantifizieren verwendeten wir hierbei das Banff Schema für akute Leber Abstoßung (Anonymous et al, 1997). Hierbei wurde bei allen Versuchslebern der RAI (Rejection Activity Index) bestimmt (Tab. 2.2) (Demetris et al. 2002). Die akute Abstoßung war hauptsächlich histologisch charakterisiert durch eine gemischte, aber prädominierende mononukleäre portale Inflammation, bestehend aus blastischen Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophile. Die Entzündung und Zerstörung von Gallenwege und subendotheliale inflammatorischen Veränderungen der portalen Venen oder terminalen hepatischen Venolen waren bezeichnend für die hyperakute Abstoßung. Der Rejection Activity Index (RAI) bezeichnete die Schwere der akuten Abstoßung. Deskriptiv konnte dann je nach Punktwert zwischen keiner, milder, moderater und schwerer Abstoßung unterschieden werden. Die schwerste Form der Abstoßung wurde mit 9 Punkten bewertet.

Da wir von einer Komplement vermittelten hyperakuten Abstoßung ausgingen, wurden die Schnitte zusätzlich einer Färbung auf C5-9b und C3c zum Nachweis der Komplementaktivierung unterzogen. Des Weiteren wurden die Ergebnisse der Depletion der Kupferzellen anhand der immunohistochemischen Färbungen auf ED1/und ED2 Antikörper gezeigt (Dijkstra et al. 1985).

Kategorie	Kriterien	Score
<b>Portales entzündliches Infiltrat</b>	Vorwiegend lymphozytäres Entzündungsinfiltrat in einem kleineren Teil der Portalfelder ohne Verbreiterung der Portalfelder	1
	Verbreiterung der meisten oder aller Portalfelder durch gemischtzellige entzündliche Infiltrate vorwiegend aus Lymphozyten unter Einschluss vereinzelter Blasten, Neutrophiler und Eosinophiler	2
	Deutliche Verbreiterung der meisten oder aller Portalfelder durch gemischtzellig-entzündliche Infiltrate unter Einschluss zahlreicher Blasten und Eosinophiler mit Übergriff des Infiltrats auf das periportale Parenchym	3
<b>Entzündliche Gallengangsschäden</b>	Ein kleinerer Teil der Gallengänge manschettenförmig umgeben und infiltriert von Entzündungszellen. Geringe reaktive Veränderungen wie z.B. eine erhöhte Kern-Plasma-Relation in den Epithelzellen	1
	Die Gallengänge mehrheitlich oder insgesamt entzündlich infiltriert. Mehr als nur gelegentliche, degenerative Veränderungen in den Epithelzellen wie z.B. Kernpleomorphie, gestörte Polarität und zytoplasmatische Vakuolisierung des Epithels	2
	Wie für Ziffer 2, jedoch in den meisten oder in allen Gängen degenerative Veränderungen oder fokale Kontinuitätsstörungen	3
<b>Entzündliche Schäden am venösen Endothel</b>	Subendotheliales lymphozytäres Infiltrat in einigen, aber nicht in der Mehrzahl der portalen und/oder terminalen hepatischen Venolen	1
	Subendotheliales Infiltrat in den meisten portalen und/oder terminalen hepatischen Venulen	2
	Wie für Ziffer 2, jedoch mit mäßiger bis starker perivenulärer Entzündung, ausgedehnt auf das perivenuläre Parenchym und verbunden mit perivenulären hepatozellulären Nekrosen	3
<b>Rejektions-Aktivitäts-Index (RAI) = _/9</b>		

Tab 2.2 *Kriterien zur Beurteilung der Abstossungsreaktion entsprechend dem World Gastroenterology Consensus Document von 1997. Klassifikation der Transplantatabstossung nach dem Banff-Schema anhand der Bestimmung des Rejection Activity Indexes.*  
(mod. nach Pathologie online)



## **2.12 Statistik**

Nach Absprache mit der Medizinstatistik im Institut für Medizinische Informatik Biometrie Epidemiologie (IBE), Klinikum Großhadern, verwendeten wir nach Testung der Normalverteilung, als nicht-parametrische Tests bei einem Stichprobenumfang von  $n=9$  in jeder Versuchsgruppe den Mann-Whitney Test und den Kruskal-Wallis –Test.

Die Auswertung der Messergebnisse der jeweiligen Versuchsserien erfolgte unter Angabe des Medians und des jeweiligen Standardfehlers der Mediane von (n) Einzelversuchen. Allen graphischen und tabellarischen Darstellungen dieser Arbeit liegen diese Werte zugrunde. Zur statistischen Prüfung auf signifikante Unterschiede wurde der zweiseitige t-Test für verbundene Stichproben angewandt. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  als signifikant angesehen. Die signifikanten Unterschiede in den Abbildungen werden im Text erläutert.

Die Berechnungen und Darstellungen in dieser Arbeit wurden unter Verwendung von folgenden Computerprogrammen erstellt: Word NT (Microsoft), Excel NT (Microsoft), Power Point NT (Microsoft) und Sigma Plot 5.0 (Jandel Scientific).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Präparation der Perfusate und Kupfferzell-Depletion

In Tab. 3.1 und Abb. 3.1. sind die Zahlen an Leukozyten (WBC), Thrombozyten und Erythrozyten in unseren Perfusionsmedien dargestellt. In der Erythrozytengruppe, wurden die WBC und Plättchen erfolgreich mit dem Pall Purecell-Filter aus dem Perfusat entfernt. Die Anzahl der Leukozyten und Thrombozyten in den von uns gewonnenen Aliquots waren unter der Nachweisgrenze, welche von einem herkömmlichen Cell Coulter detektiert werden kann. Auch in der Thrombozytengruppe, welche nur aus Thrombozyten und Erythrozyten bestehen sollten, finden sich keine WBC wieder. Die Anzahl der Thrombozyten, die wir in dieser Gruppe wie in der Methodik beschrieben zugegeben hatten, ist vergleichbar mit der physiologischen Anzahl von Plättchen in der menschlichen Vollblutgruppe. Wir hatten also, wie vom Versuchsprotokoll vorgesehen, selektiv Zellpopulationen aus den Perfusaten entsprechend unseres Versuchsgruppensdesigns entfernt.

Versuchsgruppe	Erythrozyten (Zellzahl $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	Thrombozyten (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	Leukozyten (Zellzahl $\times 10^3/\mu\text{l}$ )
Isogene Kontrolle	5 $\pm$ 0,39	517 $\pm$ 152,5	3 $\pm$ 2,63
Erythrozytengruppe	3,42 $\pm$ 0,42	2 $\pm$ 2,93	0,1 $\pm$ 0,14
Thrombozytengruppe	3,1 $\pm$ 0,24	189 $\pm$ 31,1	0,1 $\pm$ 0,04
KC-Gruppe	3,4 $\pm$ 0,15	198 $\pm$ 55,6	4,4 $\pm$ 2,44
Vollblutgruppe	3,44 $\pm$ 0,22	183 $\pm$ 33,5	2,9 $\pm$ 1,21

Tab. 3.1 Zellzahlzusammensetzung der Versuchsgruppen (Median  $\pm$  SEM).

Die Ergebnisse der Deletion der Kupfferzellen anhand der immunohistochemischen Färbungen auf ED1- und ED2 Antikörper sind in Abb. 3.2 dargestellt. ED1 und ED2-Antikörper erkannten selektiv die ständigen Makrophagen der Lebern, die KC. Während in den Kontrollgruppen die KC deutlich angefärbt wurden (mediane KC-Zahl 9 $\pm$ 1, n=9), konnten wir in der mit Gadoliniumchlorid vorbehandelten Gruppe in der ED1 und in der ED2-Färbung eine Depletion von 89% feststellen (Mediane KC-Zahl 0 $\pm$ 1, n=9). Es wurden jeweils aus zentralen und peripheren Proben fünf Quadranten ausgezählt und der Median der angefärbten KC ausgewertet. Zusätzlich hatten wir in Vorversuchen histologische Leberschnitte von Gadoliniumchlorid vorbehandelten SD-Ratten ohne xenogene Reperfusion in der HE-Färbung auf Anzeichen einer Leberschädigung untersucht. Es konnten keine histologischen Veränderungen in den vorbehandelten Lebern von uns beobachtet werden. Somit waren die

Voraussetzungen für die Untersuchung der verschiedenen Zellpopulationen erfüllt. Durch die Separation und Zusammensetzung der Perfusate und die Deletion von KC, konnten die Produktion von ROS durch die verschiedenen Zellgruppen gezielt untersucht werden.

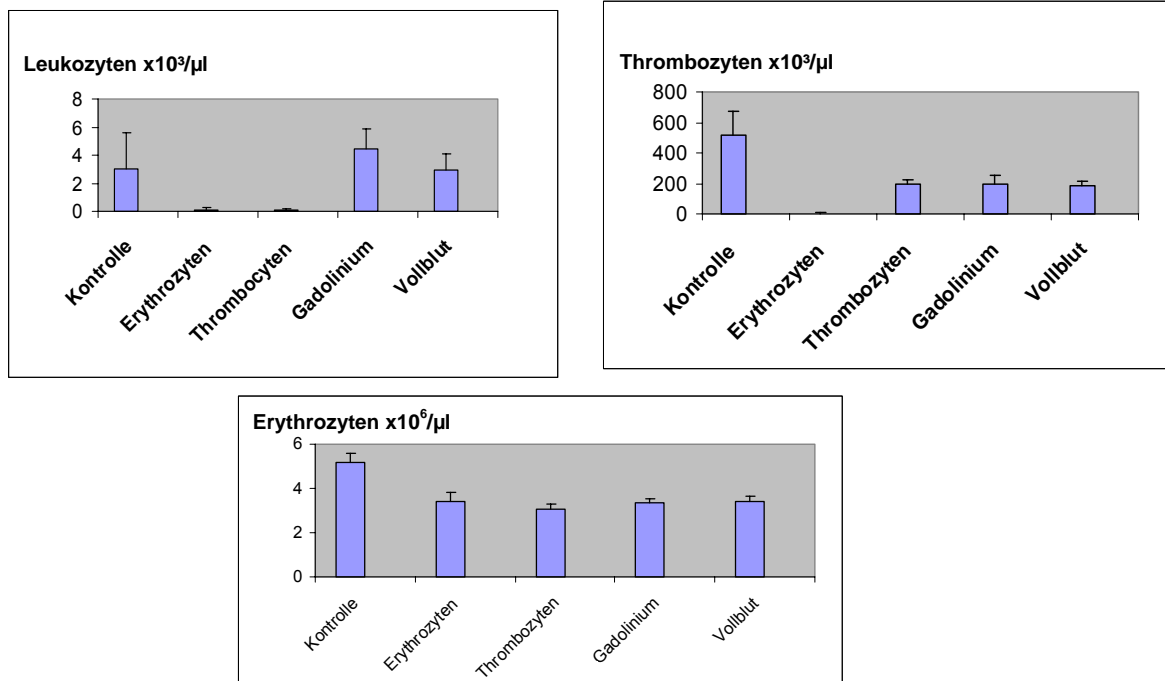


Abb.3.1. Zellzahlen in den Perfusaten

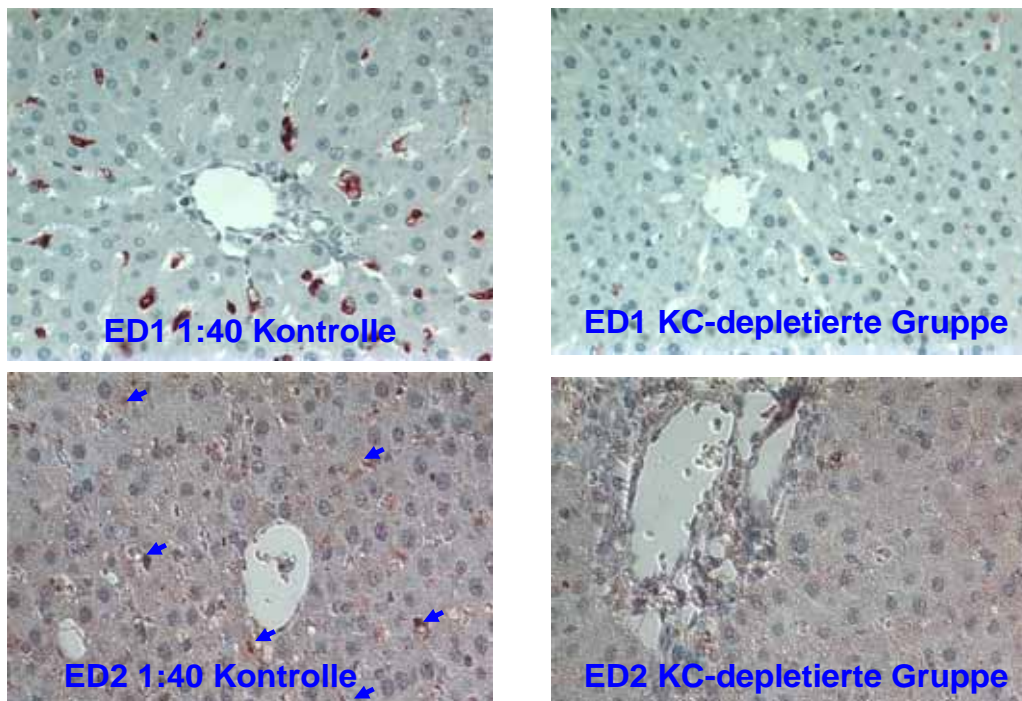


Abb. 3.2. Histologischer Nachweis der Kupferzell-Depletion. Im Vergleich zur Kontrollgruppe lassen sich in der KC-depletierten Gruppe weder in der ED1, noch in der ED2- Antikörperfärbung KC nachweisen.

## 3.2 Leberfunktion

### 3.2.1 Galleproduktion

Der Gallefluss der Leber als Funktionsparameter (Bowers et al. 1987), wurde in  $\mu\text{l}$  pro Gramm Leber (Feuchtgewicht) und Minute berechnet (Abb.3.3). In allen Gruppen wurde der Gallefluss vor Reperfusion bestimmt. Dieser unterschied sich in den verschiedenen Gruppen nicht (Abb. 3.3).

In allen Gruppen ging die Gallenproduktion während der initialen Reperfusion auf ein Minimum zurück, hierbei war der Rückgang in der KC-Gruppe und der xenogenen Vollblutgruppe signifikant ausgeprägter als in den übrigen Gruppen und verblieb auf einem niedrigen Niveau. Die Galleproduktion in der Erythrozyten- und Thrombozytengruppe erholte sich rasch wieder, zwar nicht wieder auf Ausgangswerte, aber auf Werte vergleichbar mit den Werten in der isogenen Kontrollgruppe (Tab. 3.2). Im Gegensatz dazu, verblieb die Gallenproduktion der KC-depletierten Gruppe und der xenogen-perfundierten Vollblutgruppe über die gesamte Versuchsdauer auf niedrigem Niveau.

$\mu\text{l/g}$ Leber/ 15 min $\pm$ SD	Isogene Kontrolle	Erythrozyten- Gruppe	Thrombozyten- Gruppe	KC-Gruppe	Vollblutgruppe
<b>in vivo</b>	0,69 $\pm$ 0,13	0,79 $\pm$ 0,08	0,78 $\pm$ 0,08	0,80 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,13
<b>15 min</b>	0,05 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,01*	0,02 $\pm$ 0,02*
<b>30 min</b>	0,13 $\pm$ 0,09	0,13 $\pm$ 0,09	0,19 $\pm$ 0,10	0,04 $\pm$ 0,03*	0,03 $\pm$ 0,03*
<b>45 min</b>	0,19 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,10	0,16 $\pm$ 0,07	0,05 $\pm$ 0,05*	0,06 $\pm$ 0,08*
<b>60 min</b>	0,17 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,11	0,16 $\pm$ 0,07	0,06 $\pm$ 0,05*	0,04 $\pm$ 0,04*
<b>75 min</b>	0,15 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,10	0,15 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,04*	0,04 $\pm$ 0,04*
<b>90 min</b>	0,15 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,09	0,15 $\pm$ 0,09	0,04 $\pm$ 0,04*	0,04 $\pm$ 0,03*
<b>105 min</b>	0,14 $\pm$ 0,07	0,16 $\pm$ 0,08	0,13 $\pm$ 0,08	0,04 $\pm$ 0,04*	0,03 $\pm$ 0,03*
<b>120 min</b>	0,13 $\pm$ 0,04	0,17 $\pm$ 0,08	0,12 $\pm$ 0,08	0,03 $\pm$ 0,04*	0,04 $\pm$ 0,03*

Tab. 3.2 Mittelwert der Galleproduktion in  $\mu\text{l}$  pro g Leberfeuchtgewicht  $\pm$  SD, gemessen alle 15 min zunächst in vivo, dann nach Reperfusion mit den jeweiligen Perfusaten ( $n=9$  pro Versuchsgruppe). \* =  $p<0,05$  vs. Isogene Kontrolle

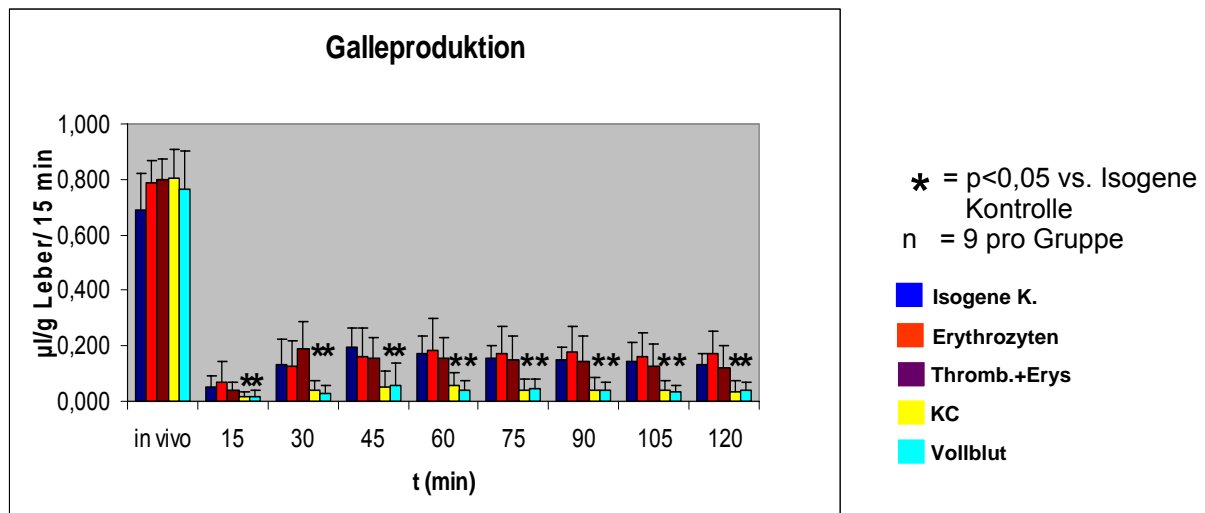


Abb. 3.3 Galleproduktion in  $\mu\text{l/g Leber/15min}$  im Vergleich der Gruppen. Es bestehen signifikant Unterschiede in der Galleproduktion zwischen der KC- und Vollblutgruppe im Vergleich zu den übrigen Versuchsgruppen.

### 3.2.2 Leberenzyme

Sehr ähnliche Resultate ließen sich im Hinblick auf die Konzentration der Leberenzyme als Ausdruck des Leberschadens beobachten (Abb. 3.4.1-3).

Die Basalwerte waren in allen Gruppen nicht signifikant verschieden. Der Referenzbereich für die Leberenzyme (Normalwerte Ratte: AST 40-55 IU/L, ALT 25-35 IU/L, LDH 100-400 IU/L) in der Ratte wurde gegen Ende des Beobachtungszeitraumes von 120 min von allen Versuchsgruppen überschritten und konnte als Hinweis für eine Schädigung des Leberparenchyms durch die Ischämie/Reperfusion gewertet werden. Die Konzentration der Leberenzyme in der Kontroll-, Erythrozyten- und Thrombozytengruppe stiegen zwischen 30 min und 60 min Reperfusion im Vergleich zum Basalwert signifikant an, lagen aber während des gesamten Versuches unter den Werten der KC- und der Vollblutgruppe (Abb. 3.4.1-3.a). Eine steigende Aktivität für die Alaninaminotransferase (ALT) im Serum und die Aspartat-Aminotransferase (AST) in der KC- und Vollblutgruppe ließ sich bereits nach spätestens 30 min Reperfusion beobachten. Diese waren wesentlich höher als die Werte der Kontrolle und stiegen während des Versuchablaufes bis auf ein Mehrfaches des Ausgangswertes an. Besonders in der mit  $\text{GdCl}_3$  vorbehandelten Gruppe waren die stärksten Aktivitäten von ALS, AST und LDH zu verzeichnen. Für ALT lagen die Medianwerte für diese Gruppe nach 120 min bei  $352 \pm 112$  U/l, für AST  $1563 \pm 197$  U/l, und  $38 \pm 10$  U/l für die LDH (Abb. 3.4.1-3.b).

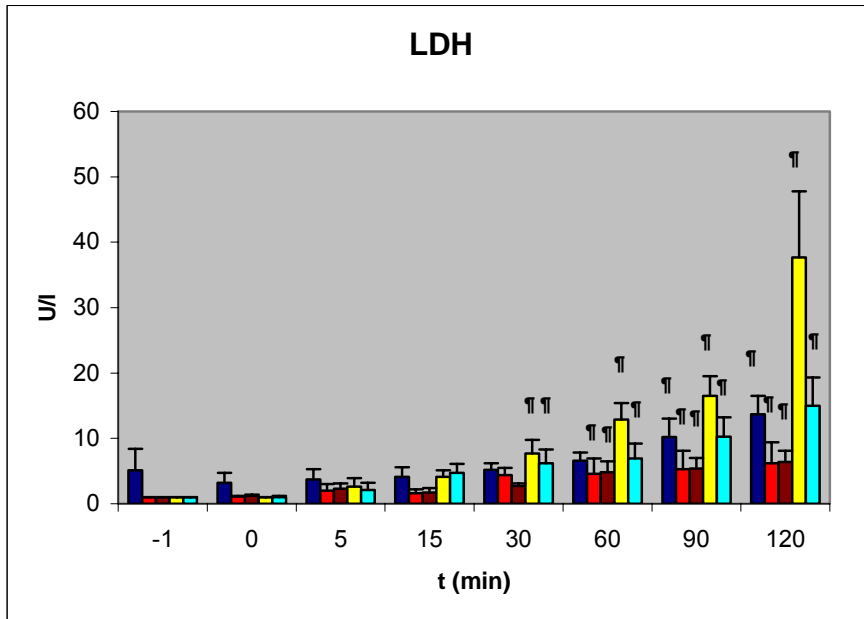


Abb.3.4.1.a LDH: Verlauf über 120 min

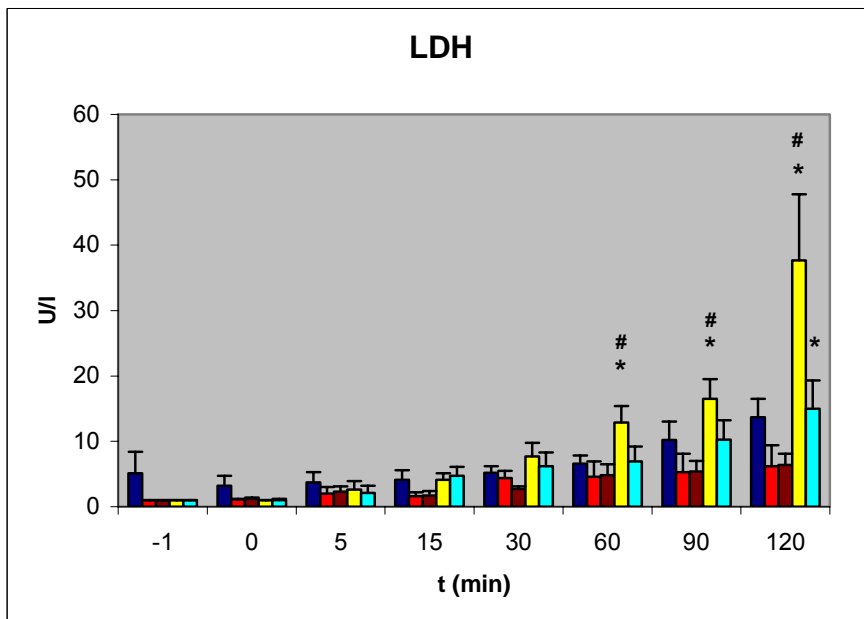


Abb.3.4.1.b LDH: Intergruppenvergleich

- Isogene Kontrolle
- Erythrozytengruppe
- Thrombozytengruppe
- KC-Gruppe
- Xenogene Vollblutgruppe

# = p<0,05 KC vs. Vollblut

\* = p<0,05 vs. Isogene Kontrolle

n = 9/Gruppe

¶ = p<0,05 vs. Basalwert -1

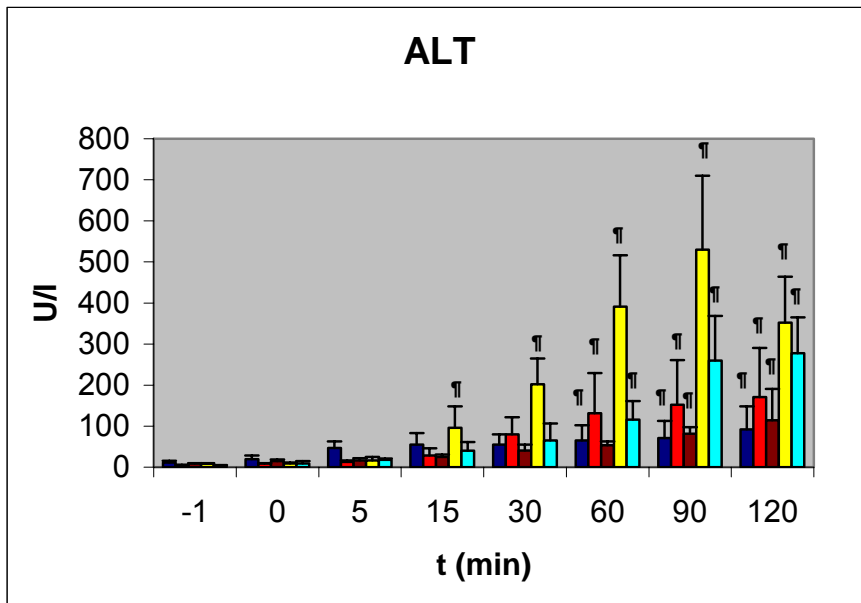


Abb.3.4.2.a ALT: Verlauf über 120 min

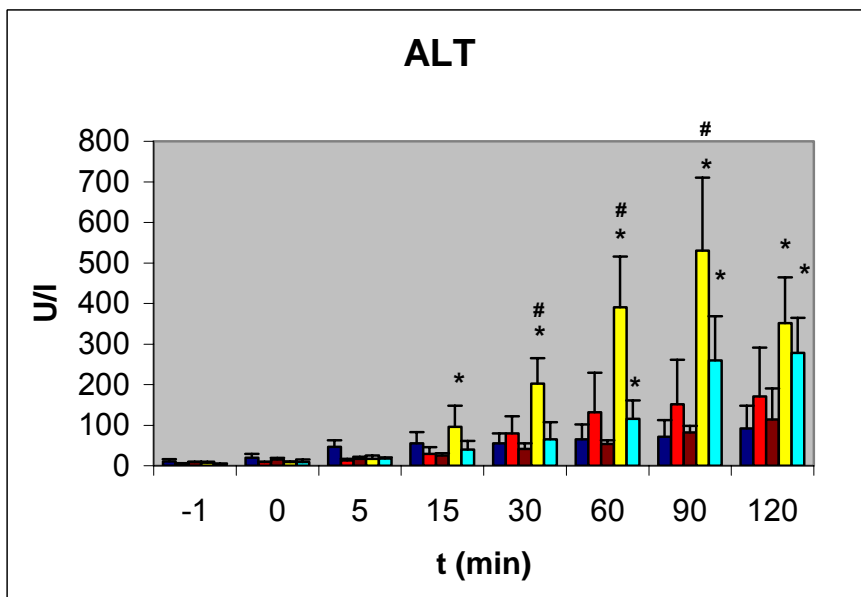


Abb.3.4.2.b ALT: Intergruppenvergleich

- Isogene Kontrolle
- Erythrozytengruppe
- Thrombozytengruppe
- KC-Gruppe
- Xenogene Vollblutgruppe

- # = p<0,05 KC vs. Vollblut
- \* = p<0,05 vs. Isogene Kontrolle
- n = 9/Gruppe

- ¶ = p<0,05 vs. Basalwert -1

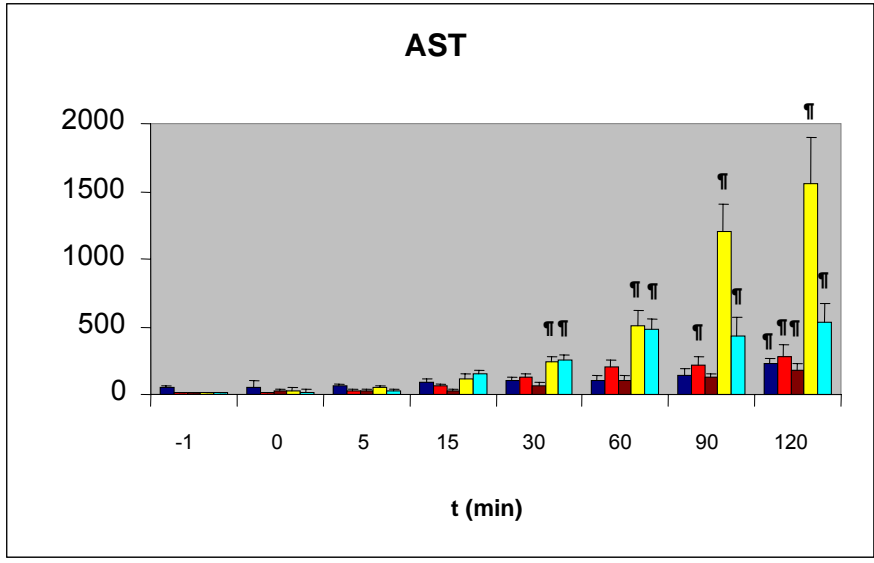


Abb.3.4.3.a AST: Verlauf über 120 min

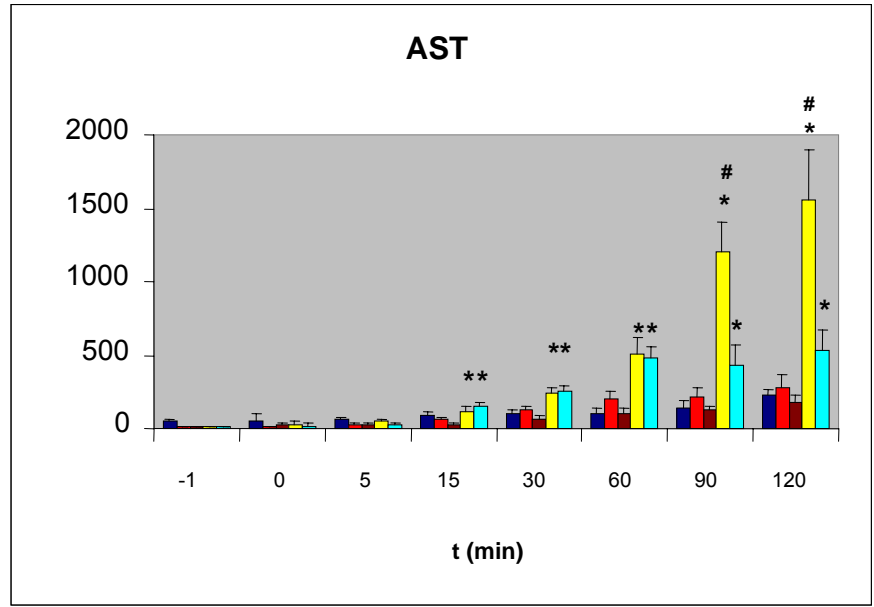


Abb.3.4.3.b AST: Intergruppenvergleich

■ Isogene Kontrolle      # =  $p < 0,05$  KC vs. Vollblut      ¶ =  $p < 0,05$  vs. Basalwert -1  
■ Erythrozytengruppe      \* =  $p < 0,05$  vs. Isogene Kontrolle  
■ Thrombozytengruppe  
■ KC-Gruppe      n = 9/Gruppe  
■ Xenogene Vollblutgruppe



### 3.2.3 Makrohämodynamik (Portalvenendruck)

Abbildung 3.5. zeigt die Veränderungen im Pfortaderdruck auf. Der portal-venöse Blutdruck wurde als Parameter der Hämodynamik der Leber bestimmt. In der isogenen Kontrolle lag der Druck innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes durchschnittlich bei ca. 8 mmHg ( $\pm 0,62$ ), was dem physiologischen Druck bei der Ratte entspricht. Der Portaldruck erhöhte sich bei der Erythrozyten- und Thrombozytengruppe im Verlauf über 120 min nicht. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Erythrozytengruppe und der Thrombozytengruppe nach 120 min Perfusion ( $10 \pm 0,9$  mmHg vs.  $9 \pm 1,01$  mmHg).

In der KC und der xenogenen Vollblutgruppe erhöhte sich der Druck nach Beginn der Reperfusion bis auf mehr als das Dreifache des Ausgangswertes und verblieb auf hohem Niveau im Laufe des Versuches. In der xenogenen Vollblutgruppe kam es zu einem durchschnittlichen Druckanstieg auf  $20 \pm 3,5$  mmHg. In der mit GdCl<sub>3</sub> behandelten Gruppe trat mit  $13 \pm 3,4$  mmHg kein höherer Anstieg des Portaldruckes im Vergleich zur Vollblutgruppe auf.

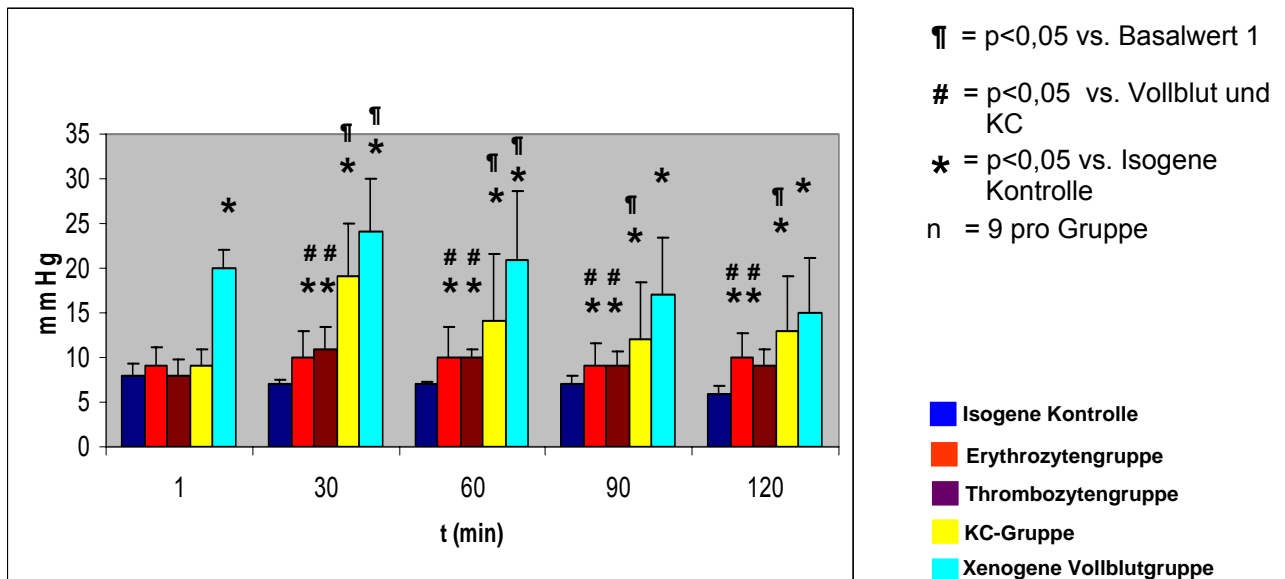


Abb.3.5 Blutdruck in der Vena portae in mmHG innerhalb des Versuchszeitraumes von 120 Minuten. Druckverlauf in der isogenen, Erythrozyten- und Thrombozytengruppe stabil. Im Vergleich dazu Druckanstieg in der Gadolinium- und Vollblutgruppe.

### 3.3 ROS-Assays

#### 3.3.1 Lipidperoxidation (MDA/TBA-Assay)

Nach Reperfusion stieg die MDA-Konzentration als Ausdruck der Lipidperoxidation nur in der KC-Gruppe und Vollblutgruppe signifikant an (Tab. 3.3). Die Werte für die LPO stiegen in der Vollblutgruppe sofort nach Reperfusion an und waren durch den ganzen Versuchsablauf signifikant höher im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Im Mittel lagen die Werte in dieser Gruppe bei  $1,053 \pm 0,501 \mu\text{M/l}$  im Vergleich zu  $0,595 \pm 0,181 \mu\text{M/l}$  in der isogenen Kontrollgruppe. Besonders deutlich wurde der Unterschied im prozentualen Anstieg (Abb. 3.6) sichtbar. Die MDA Werte waren in der KC-Gruppe nach einer Stunde Reperfusion signifikant erhöht, aber in einem geringeren Ausmaß im Vergleich zur xenogenen Vollblutgruppe. Es gab keine signifikanten Anstiege in den MDA-Werten und keine Unterschiede in der Thrombozyten-Erythrozyten- und isogenen Kontrollgruppe.

MDA $\mu\text{M/l}$	Isogene Kontrolle	Erythrozyten- Gruppe	Thrombozyten- Gruppe	KC-Gruppe	Vollblut-Gruppe
<b>in vivo</b>	0,244 $\pm$ 0,110	0,180 $\pm$ 0,024	0,293 $\pm$ 0,040	0,234 $\pm$ 0,057	0,158 $\pm$ 0,101
<b>1 min</b>	0,304 $\pm$ 0,062	0,225 $\pm$ 0,057	0,230 $\pm$ 0,048	0,316 $\pm$ 0,092	0,910 $\pm$ 0,272 ¶#*
<b>5 min</b>	0,313 $\pm$ 0,106	0,265 $\pm$ 0,108	0,321 $\pm$ 0,026	0,296 $\pm$ 0,110	0,744 $\pm$ 0,340 ¶#*
<b>15 min</b>	0,463 $\pm$ 0,206	0,421 $\pm$ 0,054	0,509 $\pm$ 0,071	0,402 $\pm$ 0,156	1,060 $\pm$ 0,380 ¶#*
<b>30 min</b>	0,688 $\pm$ 0,277	0,506 $\pm$ 0,085	0,608 $\pm$ 0,032	0,693 $\pm$ 0,165	0,880 $\pm$ 0,395 ¶#*
<b>60 min</b>	0,543 $\pm$ 0,288	0,531 $\pm$ 0,097	0,328 $\pm$ 0,024	0,826 $\pm$ 0,155 ¶*	1,239 $\pm$ 0,516 ¶#*
<b>90 min</b>	0,692 $\pm$ 0,196	0,497 $\pm$ 0,280	0,566 $\pm$ 0,062	1,011 $\pm$ 0,359 ¶*	1,985 $\pm$ 0,557 ¶#*
<b>120 min</b>	0,716 $\pm$ 0,159	0,438 $\pm$ 0,189	0,561 $\pm$ 0,047	1,174 $\pm$ 0,422 ¶*	1,448 $\pm$ 0,533 ¶#*

Tab. 3.3 Median und SEM der MDA-Werte als Parameter der LPO in  $\mu\text{M/l}$  zu den jeweiligen Messzeitpunkten ( $n=9$  pro Versuchsgruppe). ¶= $p<0,05$  vs. Basalwert vR. #= $p<0,05$  Vollblut vs. KC. \*= $p<0,05$  vs. Isogene Kontrolle.

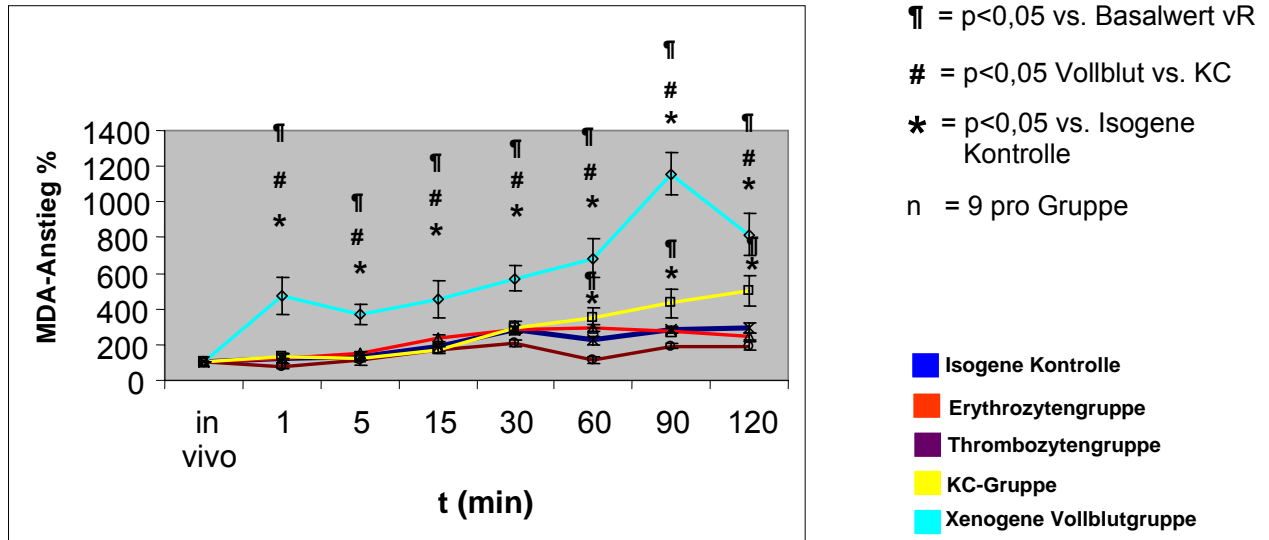


Abb. 3.6. Prozentualer MDA-Anstieg im Vergleich zu Baselinewerten den Ausgangswerten vor Reperfusion in vivo im MDA/TBA-Assay zur Bestimmung des Ausmasses der Lipidperoxidation.

### 3.3.2 NO (Griess Reaktion)

Es wurde keine messbare NO-Freisetzung in der Erythrozytengruppe beobachtet (Tab.3.4). In der isogenen Kontrolle, der Erythrozyten- und Thrombozytengruppe waren auch 120 min nach Reperfusion kein signifikanter Anstieg von NO zu sehen (Abb. 3.7). Erhöhte Ausgangswerte von Nitrit als Indikator für die NO-Freisetzung fanden sich in der KC-depletierten Gruppe ( $0,491 \pm 0,085$  nM/l) und Thrombozytengruppe ( $0,852 \pm 0,329$  nM/l). Die KC-Gruppe wies deutlich höhere Werte auf als die xenogene Vollblutgruppe. Der Anstieg während des Versuches war aber wesentlich niedriger als in der xenogenen Vollblutgruppe (Abb. 3.7), somit war die NO-Freisetzung in der Vollblutgruppe am stärksten.

Nitrit nM/l	Isogene Kontrolle	Erythrozyten- Gruppe	Thrombozyten- Gruppe	KC-Gruppe	Vollblut- Gruppe
<b>in vivo</b>	0,453± 0,068	0± 0	0,852± 0,329	0,491± 0,085	0± 0
<b>1 min</b>	0,555± 0,178	0± 0	0,839± 0,358	0,600± 0,266	0± 0
<b>5 min</b>	0,537± 0,096	0± 0	0,864± 0,181	0,503± 0,046	0± 0
<b>15 min</b>	0,601± 0,198	0± 0	0,845± 0,110	1,689± 0,206*	0,348±0,328*#
<b>30 min</b>	0,699± 0,207	0,176± 0,176	1,026± 0,084	2,095± 0,236*	0,435± 0,414*#
<b>60 min</b>	0,598± 0,187	0± 0,176	1,188± 0,103	2,720± 0,556*	0,524± 0,652*#
<b>90 min</b>	0,598±0,127	0± 0	1,343±0,221	2,304± 0,506*	0,781± 0,489*#
<b>120 min</b>	0,666± 0,167	0± 0	1,298± 0,349	2,302± 0,396*	0,972± 0,249*#

Tab. 3.4 Median und SEM der NO-Freisetzung in der Griess-Reaktion zu den jeweiligen Messzeitpunkten (n=9 pro Versuchsgruppe). \*= $p < 0,05$  vs. Isogene Kontrolle, #= $p < 0,05$  Vollblut vs. KC.

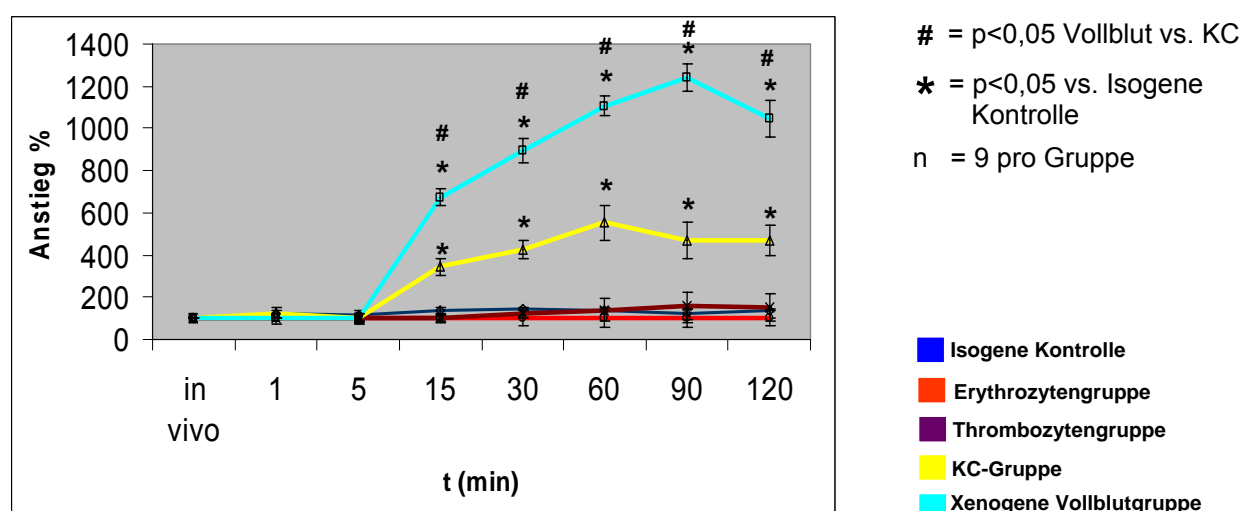


Abb. 3.7. Prozentualer Anstieg der NO-Freisetzung im Vergleich zur Baseline in vivo.

### 3.3.3 Peroxynitrit (Nitrotyrosin-Assay)

Das Produkt der Reaktion zwischen NO und Superoxidradikalen Peroxynitrit wurde anhand des Nitrotyrosinwertes im Plasma erhoben. Es ließ sich keine Peroxynitritfreisetzung in der isogenen Kontrolle nachweisen. In vivo, also vor der Reperfusion gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den xenogen perfundierten Gruppen (Tab. 3.5). Im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Erythrozytengruppe waren die Werte für Nitrotyrosin in der Vollblut und KC- und Thrombozytengruppe nach 60 min und 120 min signifikant erhöht, wobei die Werte der Thrombozytengruppe signifikant unter den der KC- und Vollblutgruppe lagen. Zwischen der KC- und Vollblutgruppe gab es während des gesamten Versuchablaufes keine signifikanten Unterschiede.

Peroxynitrit nM/l	Isogene Kontrolle	Erythrozyten- Gruppe	Thrombozyten- Gruppe	KC-Gruppe	Vollblut- Gruppe
<b>in vivo</b>	0± 0	1,070± 0,635*	1,401±1,401*	1,392± 0,887*	1,550±1,550*
<b>60 min</b>	0,080±0	1,229± 0,636*	2,613± 1,196*	3,889± 0,211*	5,323± 1,667*#
<b>120 min</b>	0± 0	1,242± 2,432*	5,322± 1,669*	7,852± 1,571*	6,991± 2,432*#

Tab. 3.5 Median und SEM der Peroxynitritwerte im Nitotyrosin-Assay (n=9 pro Versuchsgruppe).

\*= p<0,05 vs. Isogene Kontrolle, #= p<0,05 Vollblut vs. KC.

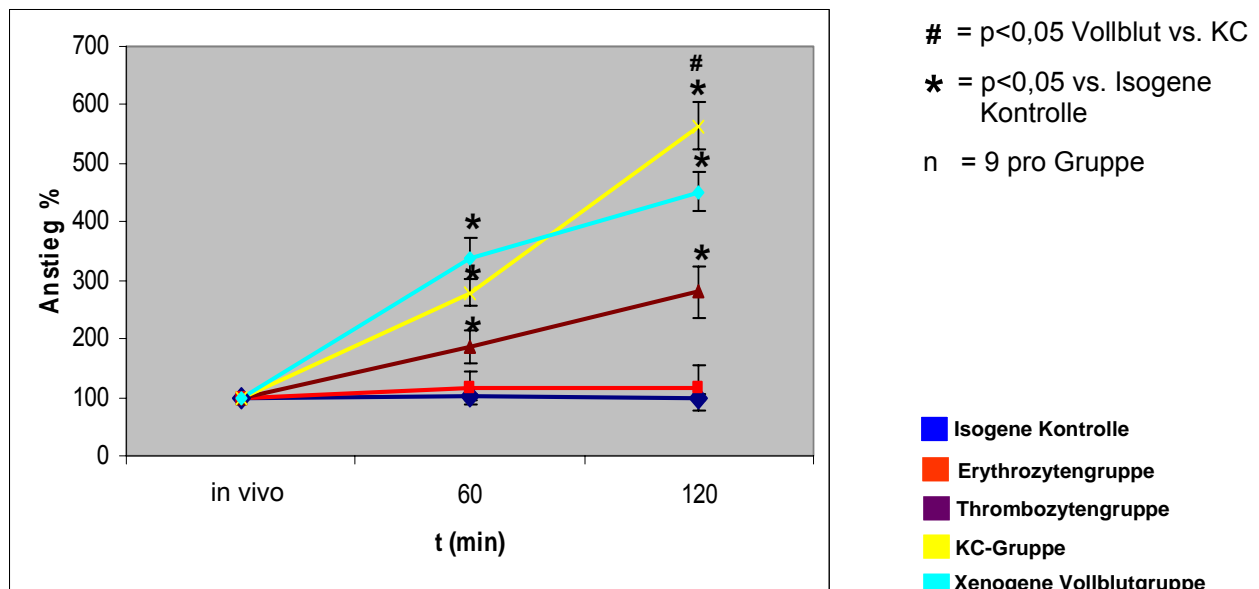


Abb.3.8. Prozentualer Anstieg des Peroxynitrits im Nitrotyrosin-Assay im Vergleich zum Ausgangswert in vivo.

### 3.3.4 Antioxidativer Status (GSH/GSSG)

Zwischen der isogenen Kontrolle, der Erythrozytengruppe und der Thrombozytengruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3.6) hinsichtlich des antioxidativen Status. Die GSH-Konzentrationen in diesen Gruppen nahmen im Verlauf der Reperfusion ab, allerdings in einem geringeren Ausmaß als in der Vollblutgruppe (Abb.3.9). Im Laufe des Versuches stiegen die GSH-Werte wieder an, erreichten aber nach 120 min nicht das Ausgangsniveau (Tab. 3.6). Die Werte für die KC-Gruppe blieben über den Versuchszeitraum stabil.

GSH µM/l	Isogene Kontrolle	Erythrozyten- Gruppe	Thrombozyten- Gruppe	KC- Gruppe	Vollblutgruppe
in vivo	221± 44	219± 33	200± 28	233± 12	170± 30
1 min	204± 32	198± 36	161± 21	219± 17	21± 18*#
5 min	179± 25	167± 20	164± 54	248± 28*	22± 8*#
15 min	147± 13	121± 48	109± 8	218± 40*	10± 9*#
30 min	140± 30	117± 32	102± 44	191± 31*	27± 9*#
60 min	106± 22	124± 22	64± 30	206± 40*	33± 18*#
90 min	98± 0,19	120± 31	84± 43	206± 63*	56± 33*#
120 min	117± 31	165± 33	96± 5	220± 42*	55± 22*#

Tab. 3.6 Median und SEM der Plasmakonzentration von GSH (n=9 pro Versuchsgruppe). \*= $p < 0,05$  vs. Isogene Kontrolle, #= $p < 0,05$  Vollblut vs. KC.

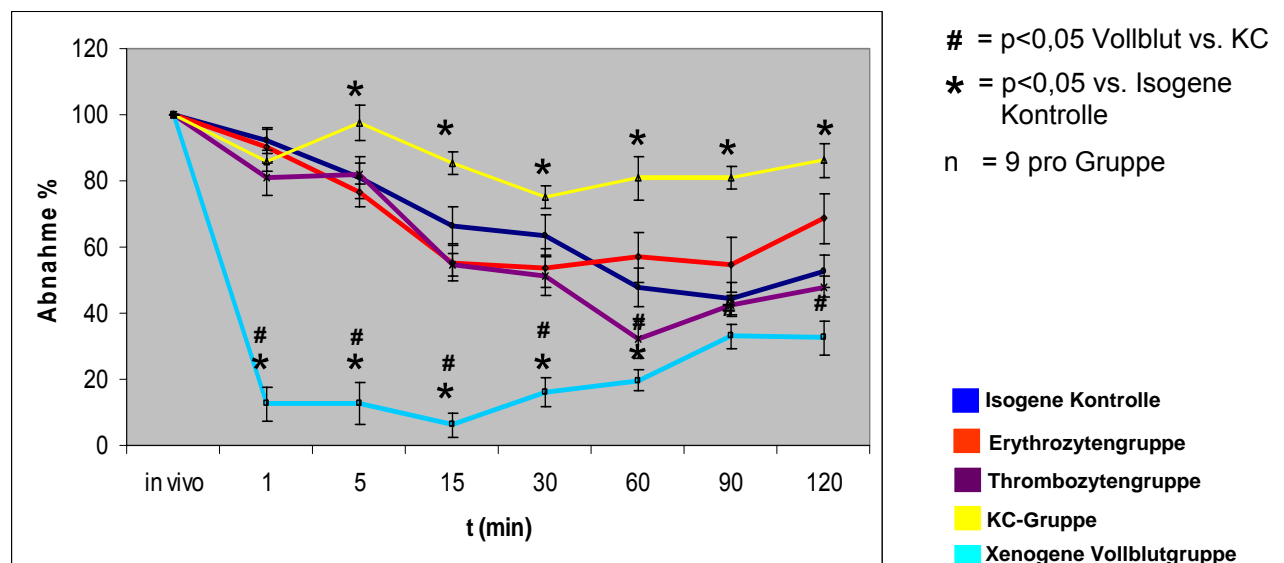


Abb.3.9. Antioxidativer Status der Versuchsgruppen in 120 min Reperfusion.

### 3.4 Histologische Untersuchungen

#### 3.4.1 Leberschaden und Abstossungsreaktion (Rejection Activity Index)

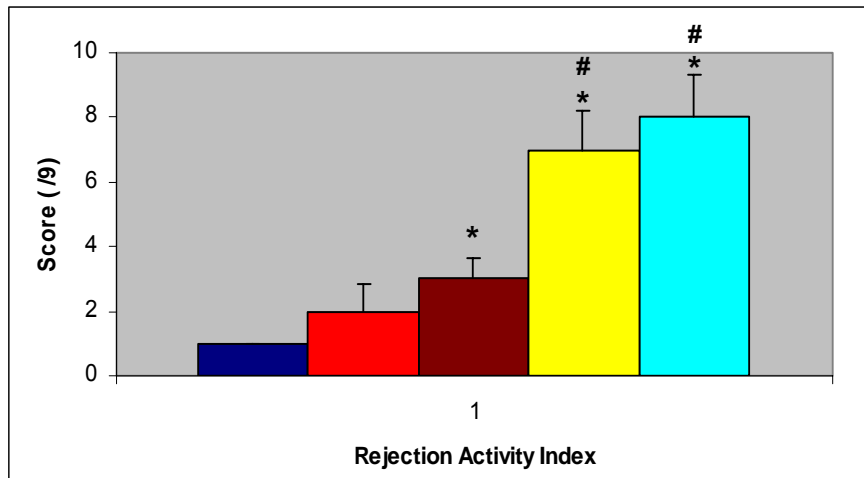
Makroskopisch konnte in der KC- und xenogenen Vollblutgruppe ein nekrotischer Gewebsuntergang bereits nach einer halben Stunde nach Reperfusion anhand großflächiger Einblutungen und einer bläulich-lividen Verfärbung der Leberoberfläche beobachtet werden. Makroskopische Veränderungen waren in den Lebern der isogenen Kontrollgruppe, Erythrozyten- und Thrombozytengruppe auch nach 120 min nicht zu sehen.

Mit Hilfe der Histologie haben wir das Ausmaß des Leberschadens und der hyperakuten Abstossung systematisch analysiert. Die Einteilung des Ausmasses der hyperakuten Abstossung erfolgte anhand des Banff Schemas (Tab.2.2).

REJECTION ACTIVITY INDEX (RAI)	
Kategorie und Kriterien	Score
Portale Entzündung (Lymphozyten, Neutrophile, etc...)	0 - 3
Entzündung und Schädigung von Gallenwegen	0 - 3
subendotheliale Entzündung der Venen / Venolen	0 - 3

Tab 3.7 Banff Schema zum Grading der Abstossungsreaktion in Lebern nach dem „International Consensus Document“. *Hepatology* 1997; 25(3):658-63

Abb. 3.11 zeigt die Auswertung sämtlicher histologischen Schnitte der Gruppen anhand des Grading nach den Banff-Kriterien und des RAI. Der hohe Score in der KC- und Vollblutgruppe im Vergleich zur Kontroll- und Erythrozytengruppe spiegelte die massive Abstossungsreaktion im Rahmen der xenogenen Reperfusion der Rattenleber wieder. Die Erythrozyten- und Thrombozytengruppe zeigten nur marginale Veränderungen mit einem Durchschnittsscore zwischen 2 und 3.



# =  $p < 0,05$  vs. Thrombozyten

\* =  $p < 0,05$  vs. Isogene Kontrolle

n = 9 pro Gruppe

- Isogene Kontrolle
- Erythrozytengruppe
- Thrombozytengruppe
- KC-Gruppe
- Xenogene Vollblutgruppe

Abb 3.11. Rejection Activity Index nach den Banff-Kriterien.

Auf den folgenden Seiten ist in der oberen linken Ecke ein Schnitt aus der Erythrozytengruppe, in der oberen rechten Ecke aus der Thrombozytengruppe, in der Mitte aus der isogenen Kontrolle, rechts unten aus der xenogenen Vollblutgruppe, links unten ein Schnitt aus der KC-Gruppe dargestellt (Abb. 3.10.).

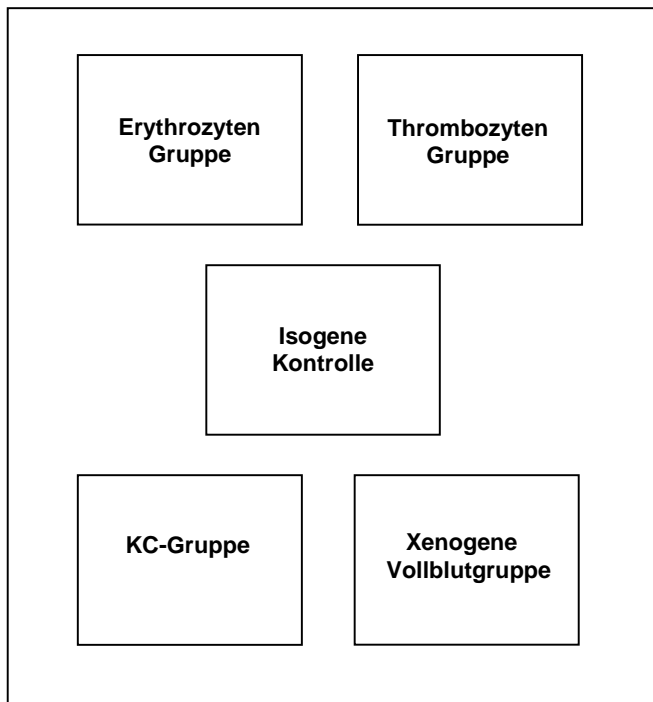


Abb. 3.10. Histologie-Schema



Die histologische Untersuchung in der isogenen Kontrollgruppe ergab nur ein geringes interstitielles Ödem, als Zeichen einer Schädigung der Hepatozyten, wobei die Leberstruktur jedoch noch erhalten blieb (Abb.3.12). Auch die Befunde der Erythrozytengruppe und Thrombozytengruppe waren ähnlich unauffällig. Es liessen sich keine Zeichen eines Leberschadens oder einer Abstoßung finden. Dagegen wurde in der KC-Gruppe ein massiver Leberschaden festgestellt. Die Kombination zwischen perivenulärer Inflammation, Nekrose und Gallenwegsuntergang war typisch für das Bild einer schweren hyperakuten Abstoßung. Wie in Abb.3.12 zu sehen traten Veränderungen der Leberstruktur im Sinne von ödematösen Schwellungen der Hepatozyten, Untergang von Gallengänge und Nekroseherden auf. Besonders ließen sich aber in der Vollblutgruppe die typischen Zeichen einer schweren hyperakuten Abstoßung beobachten: ausgedehnte perivenuläre Nekrose mit massiven Einblutungen stellten sich in der HE-Färbung dar. Starke portale Entzündungen, welche sich auch in das periportale hepatische Parenchym ausweiten, wurden in der Esterase-Färbung nachgewiesen (Tab. 3.8; Abb.3.13). Evident war die Abwesenheit von Leukozyten in der Erythrozyten- und Thrombozytengruppe nach Depletion über den Leukozytenfilter. Eine massive Infiltration des hepatischen Gewebes durch Leukozytem in der KC- und Vollblutgruppe wurde als Zeichen der Inflammation während der hyperakuten Abstossung beobachtet, dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

<b>Versuchsgruppe</b>	<b>intravasale Leukozyten</b>	<b>perivasale Leukozyten</b>	<b>gewebsständige Leukozyten</b>
<b>Isogene Kontrolle</b>	5±1	2±1	2±1
<b>Erythrozytengruppe</b>	0±1	1±1	0±1
<b>Thrombozytengruppe</b>	0±0	1±1	1±1
<b>KC-Gruppe</b>	11±3*	8±1*	11±3*
<b>Vollblutgruppe</b>	10±3*	7±1*	10±2*

Tab. 3.8. Auswertung der Leukozyteninfiltration in der Esterasefärbung (Median ± SEM, n=9).

\*= $p < 0,05$  vs. Isogene Kontrolle.

### **3.4.2 Komplementaktivierung (C3c, C5-9)**

Essentiell für die xenogene hyperakute Abstoßung ist, wie in der Einleitung beschrieben, die Aktivierung des Komplementsystems. Zum Nachweis der Komplementaktivierung untersuchten wir die Deposition von C3c und C5-9 in histologischen Schnitten.

In der isogenen Kontrollgruppe ließen sich weder C3c noch C5-9 nachweisen (Abb. 3.14, 3.15), wohingegen die Komplementfärbung in allen xenogen-perfundierten Gruppen positiv ausfiel. Es kann also davon ausgegangen werden, dass in diesen Gruppen das Komplementsystem über eine Antigen-Antikörper-Reaktion im Sinne einer Induktion der hyperakuten Abstoßung aktiviert wurde. Weder die Deletion von Thrombozyten, KC, noch Leukozyten hatte in unserem Versuchsaufbau histologisch eine Auswirkung auf die Aktivierung des Komplementsystems (Abb. 3.14, 3.15). Interessanter Weise kam es jedoch nur bei der Anwesenheit von Leukozyten im Perfusat zu einer nennenswerten Bildung ROS und RNS und damit zur einer einhergehenden Gewebsdestruktion.

HE-Färbung

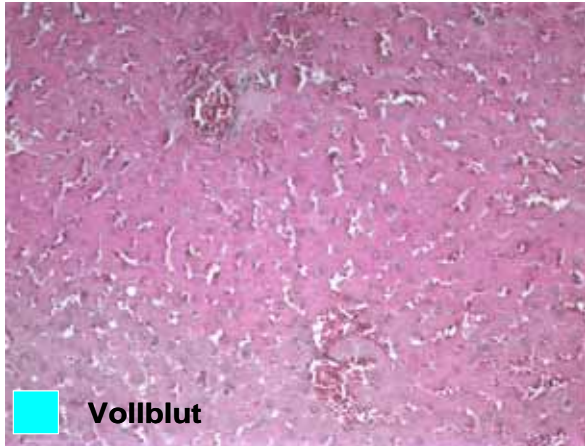
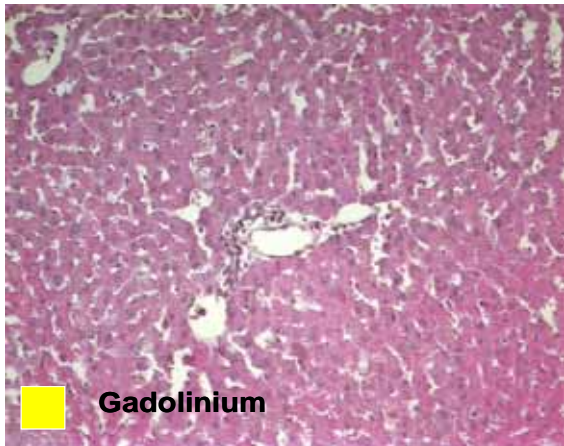
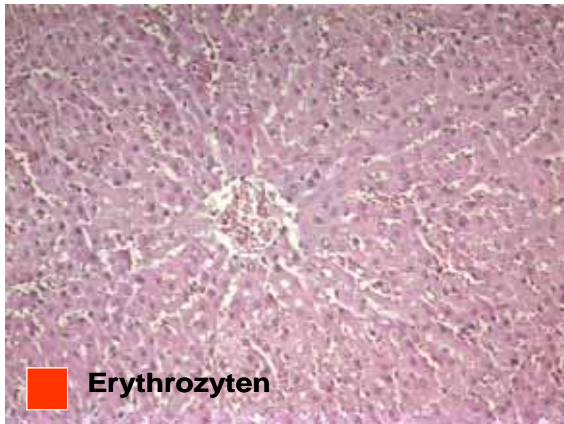


Abb. 3.12 HE-Färbung

Esterase

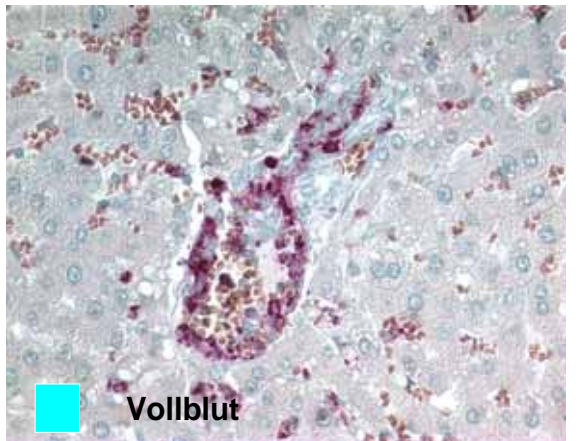
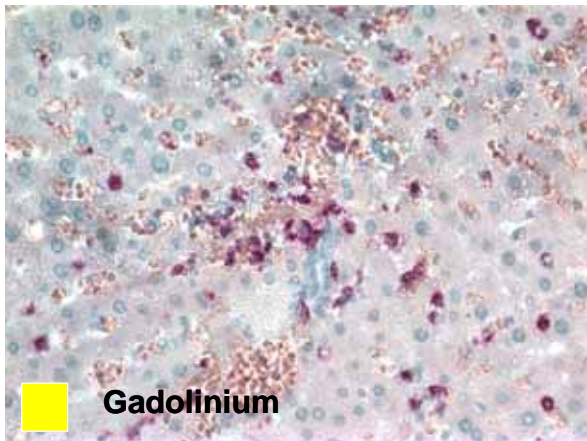
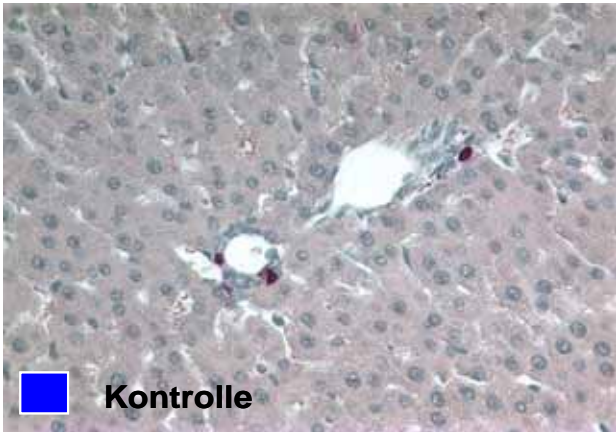
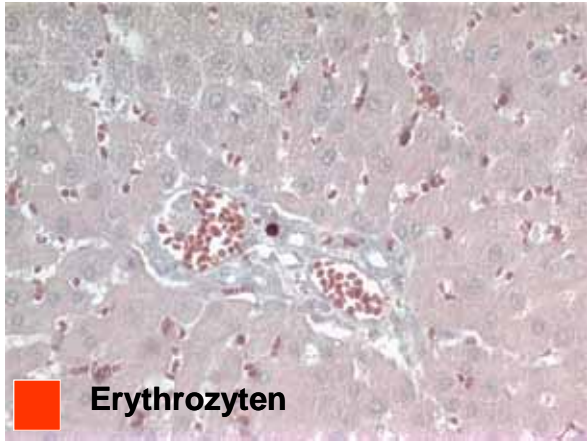


Abb. 3.13 Esterasefärbung zur Darstellung der Leukozyteninfiltration

C3c

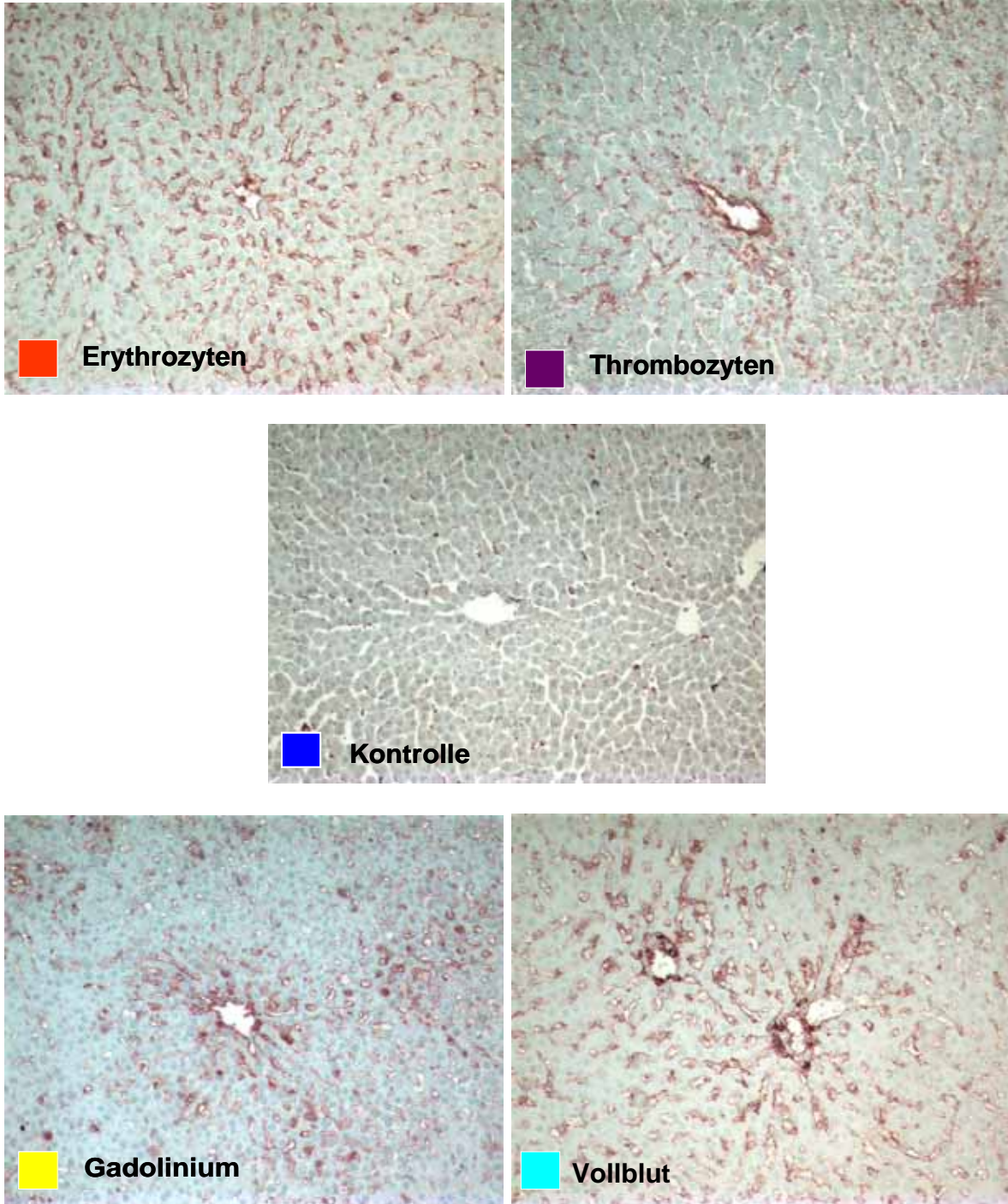


Abb.3.14 C3c-Komplementfärbung

C5-9c

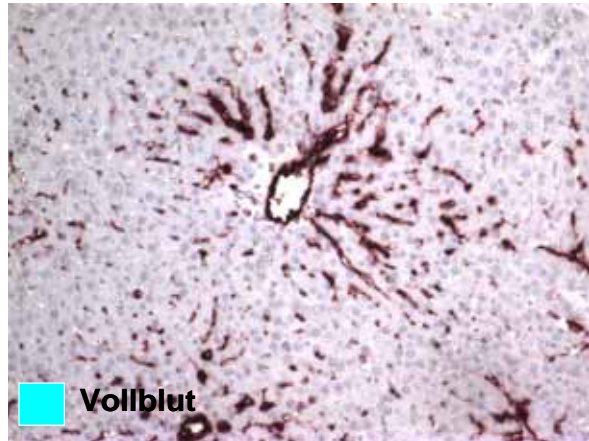
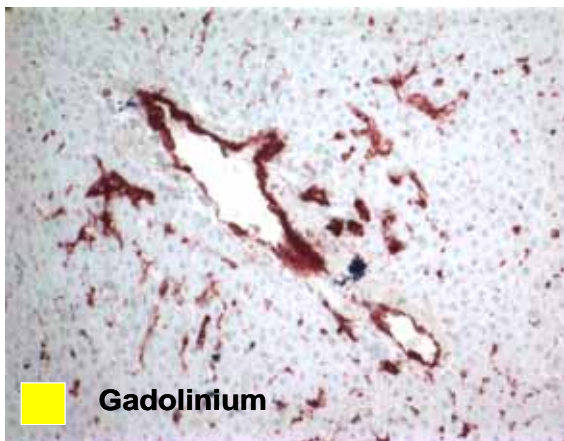
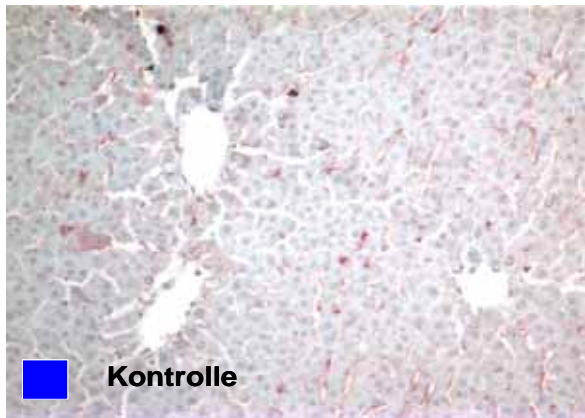
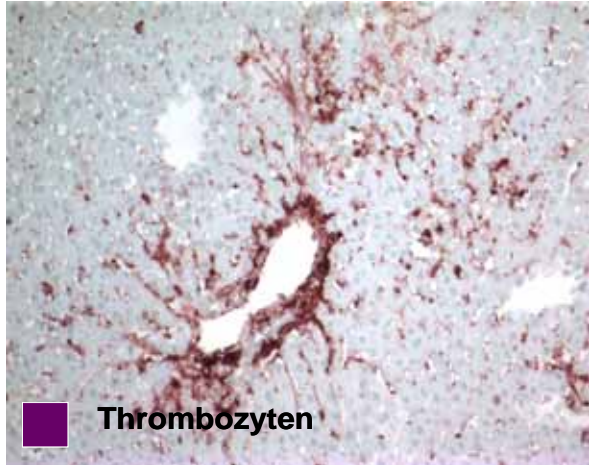
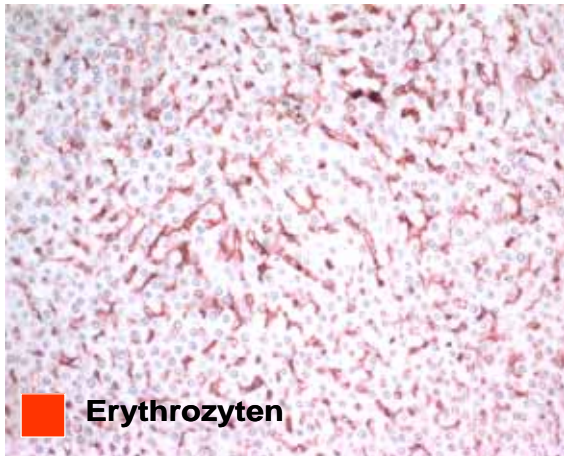


Abb 3.15. C5-9c Komplementfärbung

## 4 Diskussion

### 4.1 Aspekte der Xenotransplantation und der hyperakuten Abstossungsreaktion

Mit den klinischen und wissenschaftlichen Erfolgen der heutigen Transplantationsmedizin besteht zunehmend Bedarf an Spenderorganen: fast ein Viertel der Patienten, die für eine Transplantation vorgemerkt sind, versterben, bevor ein für sie geeignetes Spenderorgan zur Verfügung steht. In Abbildung 4.1. ist deutlich zu erkennen, dass die Anzahl der Neuanmeldungen für eine Spenderleber in Deutschland deutlich die Zahlen der tatsächlich durchgeführten Transplantationen übersteigt. Betrachtet man den Verlauf beider Kurven, wird die Differenz zwischen den zur Verfügung stehenden Spenderorganen und der Organnachfrage im Verlauf der letzten 10 Jahre immer größer. Angesichts des immensen Versorgungs- und Verteilungsproblems der Spenderorgane stellt sich die Frage, welche Alternativen es für Patienten, die auf ein "fremdes" Organ angewiesen sind, gibt.

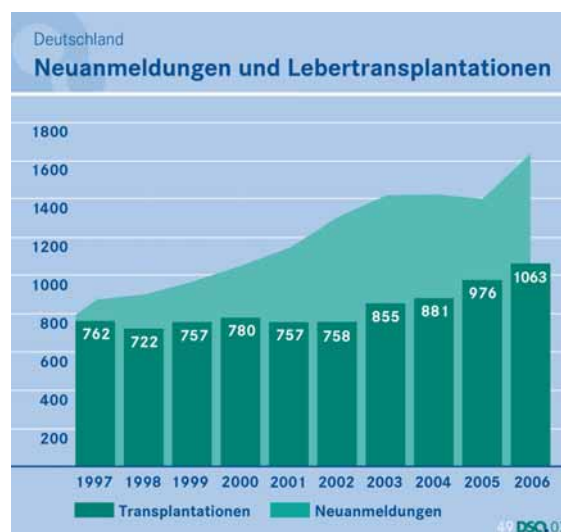


Abb. 4.1. Darstellung der durchgeführten Transplantationen in Deutschland im Vergleich zu den Neuanmeldungen (Mit Genehmigung der Deutschen Stiftung Organtransplantation 2007).

Seit Beginn der Transplantationschirurgie wurden vielfältige Anstrengungen unternommen, Organe von nicht humanen Spezies als Ersatzorgane, seien es Niere, Herz oder Leber, zu transplantieren. Mit dem Begriff "Xenotransplantation" bezeichnet man die Verpflanzung lebender Zellen, Gewebe oder Organe über die Artengrenzen hinweg.

Xenotransplantationen wurden bereits im 17. und 18. Jahrhundert in Form von Bluttransfusionen vom Tier auf den Menschen durchgeführt. Ärzte operierten zunächst über die Artenschanke hinweg, stellten aber fest, dass Organe, die von einem Individuum der gleichen Spezies

stammen wie der Empfänger, bessere Überlebenschancen hatten. Die ersten dokumentierten Transplantationen vom Tier auf den Menschen fanden in Frankreich 1905 durch die Transplantation eines Teils einer Kaninchenniere in die Niere eines urämischen Kindes durch Princeteau und 1906 durch Jaboulay, als dieser eine Schweineniere und eine Ziegeniere einer Frau transplantierte, statt. Beide Transplantate wurden innerhalb einer Stunde abgestossen. Weitere Versuche auch nach Einführung von Immunsuppressiva in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts, wie die Verpflanzung von Nieren, Herzen und Lebern führten jedoch nicht zum erhofften Erfolg, da es an ausreichendem Wissen um die Abstoßungsreaktionen und physiologische Unterschiede mangelte (Deschamps 2005, Hammer und Thein 2002).

Der Ischämie/-Reperfusionsschaden stellt einen unvermeidbaren Teil der Organtransplantation und damit auch der Xenotransplantation dar (Cozzi et al. 2006). Das Phänomen, welches als Ischämie/Reperfusion bezeichnet wird, beinhaltet eine Abfolge von pathologischen Reaktionskaskaden mit komplexen pathophysiologischen Konsequenzen (Abb. 4.2.). Die I/R aktiviert das Komplementsystem, PAF und Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL 1 $\beta$  und IL8. Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, E-Selektin, ICAM 1,2, VCAM 1 werden hochreguliert. Ein wichtiger, in der allogenen Transplantation bereits beschriebener Schritt, ist die Freisetzung von ROS in Folge des oxidativen Stresses (Arthur et al. 1988, Halliwell 1989, Connor et al. 1992, Forde et al. 1997). In der Frühphase des oxidativen Stresses kommt es zur Aktivierung von T-Zellen, Thrombozyten und Hepatozyten und anderen granulozytären Zellen wie den Kupferzellen, welche wiederum zur Freisetzung von FR beitragen (Jaeschke et al. 1990, Jaeschke et al. 1991, Leo et al. 1997). Im xenogenen System kommt die massive Aktivierung des Komplementsystemes durch präformierte xenogene Antikörper des Empfängers aggravierend hinzu (Cozzi et al. 2006). Die Rolle der ROS wurde hierbei noch nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, welche Rolle freie Radikale während der hyperakuten Abstoßung der xenogen perfundierten Leber spielen und welche Zellgruppen hauptsächlich für die Freisetzung dieser Verbindungen verantwortlich sind.



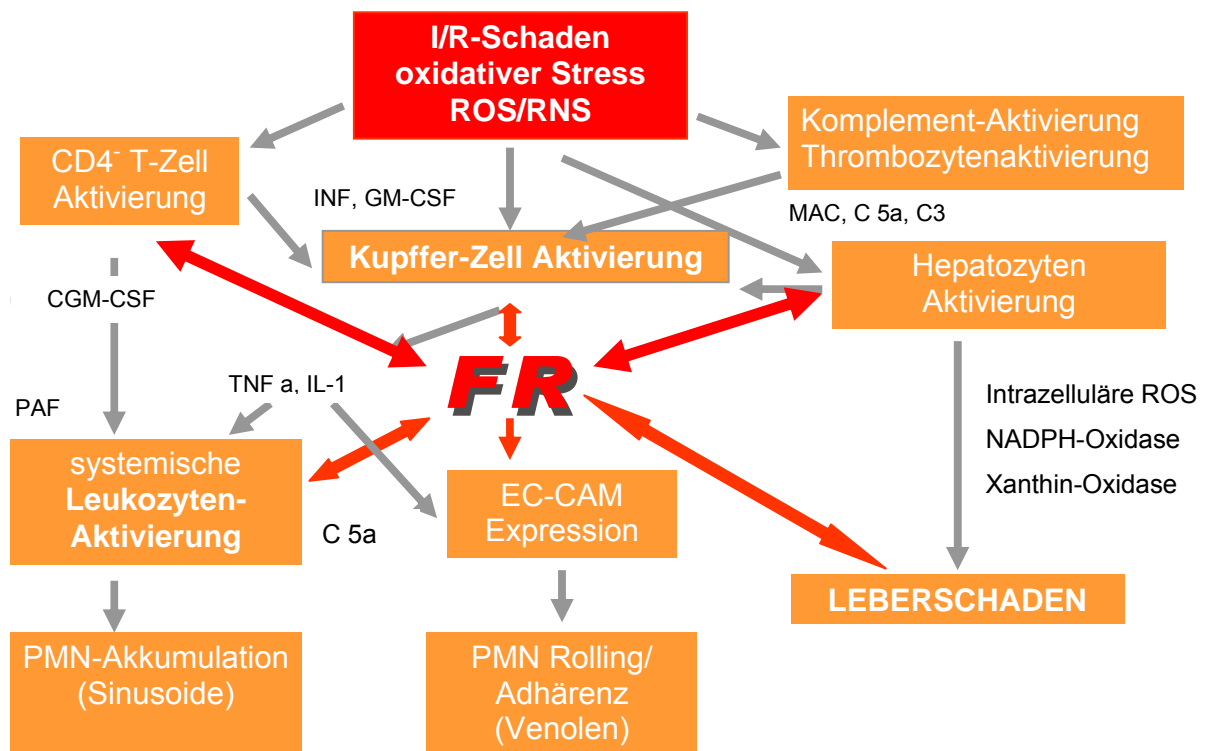


Abb. 4.2 Auswirkung des I/R-Schadens und oxidativen Stresses auf die Aktivierung von Zellen (Leukozyten, Hepatozyten, Kupferzellen, Thrombozyten) und des Komplementsystemes über Zytokine und Adhäsionsmoleküle. In Folge wird die Freisetzung von FR getriggert und die Zellen wiederum durch ROS/RNS aktiviert. Das Resultat der Reaktionskaskaden ist eine Schädigung des Organs und der Verlust der Funktion des Transplantates.

## 4.2 Diskussion der Methodik

### 4.2.1 Perfusionsystem

Mit unserem Modell der xenoperfundierten Rattenleber hatten wir ein in unserem Institut validiertes und etabliertes Modell vorliegen, welches sich für die xenogene Perfusion von Rattenlebern eignete (Terajima et al. 2000, Thein et al. 2001). Das in unseren Versuchen verwendete Perfusionsystem erlaubte die Perfusion der Rattenleber mit einem physiologischen Blutdruck (Normotonie) wobei das Perfusat über einen Qxygenator mit Sauerstoff angereichert (Normoxie) wurde. Darüber hinaus hatten wir durch die Anwärmung der Perfusate und zusätzlich installierte externe Heizkissen eine physiologisch gleich bleibende Temperatur (Normothermie) gewährleistet. Wie von unserer Arbeitsgruppe bereits publiziert, wurde das Perfusionsystem im Hinblick auf systemimmanente Einflüsse auf das Perfusat evaluiert. So konnte gezeigt werden, dass es durch das System per se, zu keiner Zell- oder

Komplementaktivierung kommt. Damit erfüllte das Perfusionssystem die Voraussetzungen für unsere Untersuchungen.

#### **4.2.2 Perfusionsdauer**

In Kontrollversuchen, in welchen Rattenlebern mit humanem Vollblut perfundiert wurden, hatten wir beobachtet, dass, die xenogene Abstossungsreaktion bzw. der Verlust der Leberfunktion im Sinne eines Anstieges des Perfusionsdruckes und makroskopischer Veränderungen (Hämorrhagien, Nekrosen) schon innerhalb den ersten fünf Minuten begannen. Nach einer Verlängerung der Reperfusionzeit auf bis zu vier Stunden in den ersten zwei Versuchstieren der jeweiligen Versuchsgruppen, setzten wir für nachfolgende Versuche die Reperfusionzeit auf 120 Minuten fest, da danach keine weiteren signifikanten Veränderungen des Portalsdruckes oder der Galleproduktion als Marker für die Leberfunktion in den jeweiligen Versuchsgruppen beobachtet wurden.

#### **4.2.3 Herstellung der Perfusate**

Grundlegende Voraussetzung für unsere Untersuchung war die gezielte Gewinnung und Aufreinigung der jeweiligen zu untersuchenden Zellpopulationen, bzw. die Depletion und Aufreinigung des Vollblutes von bestimmten Zellen. Wir konnten kontrolliert mit Hilfe des Coulter Counters und der Esterasefärbung für die Leukozyteninfiltration im Gewebe, gezielt Perfusate herstellen, welche ausschließlich die zu untersuchenden Zellen enthielten (Tab. 3.1.). Abgesehen von der Anpassung des Hämatokrits erfuhr sowohl die isogene als auch die humane Vollblutgruppe keine weitere Manipulation wohingegen für die Herstellung des Perfusates für die Erythrozytengruppe mit dem von uns verwendeten Leukozytenfilter eine wenig aufwändige, kostengünstige und in der Hämatologie klinisch gut erprobte Methode der Leukozyten- und Thrombozytendepletion zur Verfügung stand (Eisenfeld et al. 1992). Für die Thrombozytengruppe verwendeten wir eine in unserem Institut etablierte und validierte Methode der Thrombozytenaufreinigung (Massberg et al. 1998). Der Erhalt der physiologische Funktion der Thrombozyten sowie deren Aktivierungsgrad wurde nach den Zellisolationsschritten in jedem Versuch mittels Flowzytometrie (P-Selektin) überprüft. Die kritischste Gruppe betreffend der selektiven Depletion war die KC-Gruppe, da wir eine verlässliche Methode benötigten, um in vivo KC zu zerstören oder deren Funktion zu blockieren ohne eine Beeinflussung der Funktion der übrigen hepatischen Zellpopulationen. Wir entschieden uns auf Grund von zahlreichen publizierten Daten (Hardonk et al. 1992, Vollmar et al. 1996, Adding et al. 2001) für die Depletion der KC mit dem toxischen Gadolinium-Chlorid, welches ein wasserlösliches trivalentes Kation der Lanthanidserie ist. Anhand histologischer Färbungen mit den für die Lebermakrophagen spezifischen monoklonalen Antikörpern ED1 und ED2, welche mit dem

jeweiligen Antigen auf der Kupferzellmembran reagieren, konnten wir die erfolgreiche Depletion nachweisen. Wir konnten eine Depletion von bis zu 89% der KC in unseren Versuchstieren histologisch bestätigen, was den publizierten Daten entsprach (Hardonk et al. 1992). In Vorversuchen wurden, um die Leberfunktion zu untersuchen, von isogen-perfundierten Rattenlebern nach Gadolinium Chloridbehandlung histologische Schnitte angefertigt. Auch diese zeigten eine Depletion der KC unter vollständigem Erhalt der mikroskopischen Leberstruktur.

#### **4.2.4 Assays zur Bestimmung freier Radikale**

Die Erfassung der Konzentration der ROS im Organismus stellt auf Grund deren Kurzlebigkeit ein Problem dar. Hochreaktive Radikale haben sehr kurze Halbwertszeiten und Diffusionskonstanten, wohingegen weniger reaktive Radikale eine weitere Reichweite haben (Abb. 1.1). Deshalb kann aus Aktivität und möglichem Schaden durch Freie Radikale keine lineare Beziehung abgeleitet werden (Yu et al. 1994). Aus diesem Grund war ein weiterer Punkt unserer Untersuchungen die Bedeutung verschiedener FR-Spezies für den Gewebeschaden während der hyperakuten Abstoßung.

Wir führten im Vorfeld der eigentlichen Experimente zahlreiche Validierungsversuche u.a. mit der ESR-Messung (Electron Spin Resonance) - als einzige mögliche direkte Methode für den Nachweis von FR - durch. Diese waren nicht erfolgreich, da die ESR-Signale im Serum und im in vivo System zu störanfällig waren und mit der Zeit abnahmen, da die Radikale im Perfusat direkt abgefangen wurden und damit die Messergebnisse über die Zeit verfälscht hätten werden können. Diese Phänomene wurden bereits von anderen Versuchsgruppen berichtet (Halliwell und Whiteman 2004). Zudem waren sehr hohe Konzentrationen des Spin Traps nötig um die FR direkt zu messen. Dies aber hätte zur Folge, dass die physiologischen Bedingungen in den Perfusaten, verfälscht worden wären. Neben dem Versuch FR mittels ESR direkt nachzuweisen, haben wir versucht die SOD Aktivität zu messen. Die Probleme dieses Verfahrens waren die starke pH-Anfälligkeit, Messartefakte und unzureichenden Spezifität der Reagentien gegenüber Superoxidionen. Aus den genannten Gründen beschlossen wir auf diese beiden Methoden zu verzichten.

Im Folgenden sind die obligaten Bedingungen des ROS-Nachweises für unsere Fragestellung und ihre Umsetzung aufgeführt:

- *Die Bestimmung soll in vivo möglich sein.*

Die von uns benutzten Analyseverfahren (MDA/TBA, Griess Reaktion, Nitrotyrosin ELISA, Gesamt-Glutathion) wurden bereits in Tiermodellen validiert (Halliwell und Whiteman 2004).

- *Es sollen dem Perfusat keine Reagenzien hinzugefügt werden, welche das Ergebnis beeinflussen können.*

Keine unserer FR-Assays benötigte ein Hinzufügen eines Reagenz oder Spin Traps in das Perfusat. Die Folge aber war, dass unsere angewendeten Methoden die ROS-Produktion nicht direkt messen und mögliche Zwischenprodukte oder Reaktionsschritte nicht vollständig erfassen konnten. Deshalb versuchten wir den weiteren Abbau der zu messenden ROS-Produkte zu minimieren, indem die Proben nach Reperfusion direkt aus dem Perfusionssystem entnommen und sofort weiterverarbeitet wurden.

Ein Nachteil z.B. der colorimetrischen Bestimmung von Nitrit über die Reaktion mit dem Griess-Reagenz war, dass der Nachweis von NO insbesondere im menschlichen Plasma gestört werden könnte, da es zu Interaktionen zwischen den SH-Gruppen in den Proben und dem Griess-Reagenz kommen könnte. Des Weiteren konnte der Griess-Assay bei der Erfassung von biologisch gebildetem NO nicht zwischen aktivem NO und dem inaktiven Metaboliten Nitrit unterscheiden, so dass exogene Nitrite, Allynitrit-Ionen oder Nitroso-Verbindungen in der Lösung ebenfalls zu erhöhten Werten führen könnten (Tarpey et al. 2001).

- *Da die direkte Messmethoden der ROS nicht zur Verfügung standen, sollten stabile Endprodukte der ROS als Biomarker bestimmt werden, welche die Zellschädigung durch ROS spezifisch wiedergeben.*

Als logische Schlussfolgerung des vorherigen Punktes, mussten wir spezifische Endprodukte der ROS-Zerfallskette bestimmen. Als validierte und publizierte Methoden wählten wir die Messung von - durch den Zerfall der Lipidperoxide entstehendem - Malondialdehyd (MDA) (MDA/TBA-Assay) und das Peroxynitrit (Nitrotyrosin, Sandwich-ELISA) als Produkt der Reaktion zwischen den freien Radikalspezies NO und Superoxid. Auch hier ist kritisch anzumerken, dass mögliche Zwischenprodukte der komplexen ROS-Reaktionen nicht vollständig erfasst wurden und somit der ROS-Messung entgingen (z.B. ist das MDA nur eines von vielen Aldehyden, welche in Folge der LPO gebildet werden (Halliwell und Whiteman 2004)).

### **4.3 Diskussion und Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Versuchgruppen**

#### **4.3.1 Isogene versus xenogene Reperfusion (isogene Kontrollgruppe)**

In der isogenen Kontrolle waren in der HE und Esterasefärbung keine Zeichen einer hyperakuten Abstoßung zu beobachten. Die isogene Perfusion der Rattenleber zeigte über den gesamten Versuchszeitraum von 120 Minuten nur einen leichten Anstieg der Leberenzyme, welcher sich durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden erklären lässt, aber keine hyperakute Abstoßung und keine signifikante Freisetzung von freien Radikalen. Im Gegensatz dazu sind fanden wir in der mit humanem Vollblut perfundierten Gruppe eine massive hyperakute Abstoßung mit einem fulminanten Leberschaden und einer starken FR Freisetzung (s.a. Diskussion der xenogenen Vollblutgruppe 4.3.2.4). Wir konnten also in unserem Versuchsaufbau zeigen, dass ein signifikanter Unterschied bezüglich der Freisetzung von ROS/RNS zwischen der isogenen und xenogenen Reperfusion mit Vollblut besteht.

#### **4.3.2 Xenogene Reperfusion**

Es werden nun die einzelnen xenogen perfundierten Versuchgruppen hinsichtlich, des Ausmaßes der hyperakuten Abstoßung, des Umfangs der FR-Bildung, und der Leberschädigung anhand von Veränderungen des Perfusionsdrucks und dem Anstieg der Leberenzyme diskutiert.

##### **4.3.2.1 Erythrozytengruppe**

Entsprechend den Kriterien für die hyperakute Abstoßung konnte in dieser Gruppe in der HE-Färbung keine Leberschädigung durch die hyperakute Abstoßung beobachtet werden (Abb. 3.12-13). Trotz positiver C3c und C5-b Färbung (Abb 3.14., 3.15) als Zeichen einer Komplementaktivierung, d.h. trotz Vorliegen einer hyperakuten Abstoßung, hatten wir keine Anzeichen einer FR Freisetzung. Ein Vergleich dieser Versuchsgruppe mit der isogen perfundierten Kontrolle ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Leberfunktion (Galleproduktion, Leberenzyme) und Freisetzung freier Radikale, aber einen deutlichen Unterschied zur KC und xenogenen Vollblutgruppe. Wir konnten daraus folgern, dass die alleinige Anwesenheit von Erythrozyten im Perfusat zwar zu einer Aktivierung des Komplementsystems im Sinne einer hyperakuten Abstoßung führten, die jedoch keine Schädigung der Leberfunktion zur Folge hatte.

#### **4.3.2.2 Thrombozytengruppe**

In der Thrombozytengruppe waren in der HE und Esterasefärbung ein Erhalt der Leberstruktur und - wie zu erwarten - eine fehlende Leukozyteninfiltration ins Gewebe zu beobachten (Abb. 3.12, 3.13). Dies war auch ein Hinweis darauf, dass wir erfolgreich Leukozyten aus unseren Erythrozyten- und Thrombozytenperfusaten entfernen konnten. Es wurde mikroskopisch in der Thrombozytengruppe, trotz immunhistochemischem Nachweises einer Komplementaktivierung bei positiver C3c und C5-b Färbung (Abb 3.14., 3.15) keine Thrombenbildung nachgewiesen.

Die NO Konzentrationen in der Thrombozytengruppe waren von Anfang an höher im Vergleich zu den anderen Gruppen, was den Funktionserhalt und die Fähigkeit der Thrombozyten NO freizusetzen, bestätigte. Der Anstieg während der Reperfusion war jedoch nicht signifikant. Kritisch anzumerken ist, dass Prostaglandin E1, welches wir zur Isolation der Thrombozyten benützt hatten, den I/R-Schaden durch eine verminderte NO- und Superoxidradikalfreisetzung neutralisieren kann (Huk et al. 2000). Durch die Waschschriffe im Isolationsprotokoll hatten wir versucht, diesen Effekt möglichst gering zu halten. Bemerkenswert aber war, dass die Thrombozytengruppe Peroxynitrit nach Reperfusion im Vergleich zur isogenen Kontrolle und Erythrozytengruppe vermehrt freisetzte was die Prostaglandin-Hypothese relativieren würde. Die vermehrte Peroxynitritfreisetzung in dieser Versuchsgruppe hatte aber auf die restlichen untersuchten Parameter in dieser Gruppe inklusiver Leberfunktion keine Auswirkung, denn durch den Zusatz von Thrombozyten konnten im Vergleich zur reinen Erythrozytengruppe kein zusätzlicher schädigender Effekt im Hinblick auf Galleproduktion, Pfortaderdruck und des Gewebes Schadens festgestellt werden. Die Peroxynitrittoxizität wurde bereits von anderen Gruppen kritisch diskutiert (Radi et al. 1998, Liu et al. 2000).

Vergleichbar mit der Erythrozytengruppe waren trotz der Komplementdeposition die FR Bildung und der Leberschaden minimal, womit wir nochmals zeigen konnten, dass FR wichtig für die hyperakute Abstoßung und der nachfolgenden Schädigung der Leberfunktion sind, aber die Aktivierung des Komplementsystems trotz vorhandener Erythro-, Thrombo- und Hepatozyten sowie Kupfferzellen ohne Leukozyten nicht zur Freisetzung von FR und nachfolgender Leberschädigung führte.

#### **4.3.2.3 Kupfferzellgruppe**

Die Depletion der KC hatte keine protektive Wirkung auf die hyperakute Abstoßung in unserem Modell, da histologisch und immunhistochemisch in der mit Gadolinium vorbehandelten Gruppe nach xenogener Perfusion eine eindeutige hyperakute Abstoßung und ein Leberschaden, im

Sinne von ödematösen Schwellungen der Hepatozyten, Untergang von Gallengänge, ausgedehnten Nekroseherden und Komplementaktivierung beobachtet wurde (Abb. 3.12-15).

Die Deletion von KC hatte aber einen gewissen protektiven Effekt hinsichtlich der LPO, da die MDA Werte in der KC Gruppe nach Reperfusion signifikant erhöht waren, aber zu einem geringeren Ausmaß im Vergleich zur xenogenen Vollblutgruppe. Die Lipidperoxidation war in unserem experimentellen Modell also hauptsächlich an dem Vorhandensein von KC und Leukozyten gebunden.

Im Bezug auf den antioxidativen Status nach xenogener Perfusion konnten wir in der KC-Gruppe einen erhöhten Spiegel des Gesamt-Glutathions von Beginn an verzeichnen (Tab. 3.6, Abb 3.9). Die Depletion von KC scheint den antioxidativen Status der Spenderleber zu erhöhen. Dies könnte das geringere Ausmaß der Lipidperoxidation im Vergleich zur xenogenen Vollblutgruppe erklären. Die Werte für Gesamt-Glutathion in der KC Gruppe blieben im Verlauf des Versuches stabil. Eine Erklärung wäre die blockierende Wirkung von NO auf die GSH-Peroxidase und das Glutathion (Hon et al. 2002), denn in dieser Gruppe war die Plasmakonzentration von NO vielfach höher im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppe (Abb. 3.7). Der zu der Vollblutgruppe vergleichbar hohe Spiegel des Peroxynitrits, ließe sich auch mit dem hohen Spiegel des NOs erklären. Eine Hypothese für den erhöhten NO-Wert nach KC Depletion, wäre das Abfangen von NO durch das Vorhandensein von KC.

Ob nun der protektive Wert der KC Depletion durch die niedrigeren MDA Konzentration und erhöhten Glutathionwerten -im Vergleich zu der xenogenen Vollblutgruppe- die schädigenden Wirkung der erhöhten NO und Peroxynitrit Bildung überwog, konnte nur anhand des Leberschadens festgestellt werden. Die Depletion der Lebermakrophagen, der Kupfferzellen, hatte in unserem Xeno-Modell im Gegensatz zu vorbeschriebenen Allo-Modellen (Motoyama et al 1995, Rai et al. 1996) keinen protektiven Einfluss auf die Leberfunktion, da es keine signifikanten Unterschiede zur xenogenen Vollblutgruppe gab. Der Anstieg der Leberenzyme und Cholestaseparameter, war sogar noch stärker als in der Vollblutgruppe und könnte auf eine additive toxische Schädigung durch das Gadolinium-Chlorid zurückgeführt werden. Dieser Mechanismus wurde in der Literatur kontrovers diskutiert (Hardonk et al. 1992, Kukan et al. 1997, Motoyama et al. 1995, Rai et al. 1996, Spencer et al. 1997, Adding et al. 2001, Zhong et al. 2005). Da wir jedoch in Vorversuchen (s.a. Diskussion 4.2.3) histologisch nach Gadolinium Chlorid-Applikation keine vermehrte Zellschädigung feststellen konnten, konnte die Erhöhung der Leberenzyme nicht vollständig geklärt werden.

Im Gesamtbild hatte die Depletion der KC keinen protektiven Effekt auf die hyperakute Abstoßung, die nachfolgende FR Bildung und den Leberschaden.

#### **4.3.2.4 Xenogene Vollblutgruppe**

Alle Kriterien für die hyperakute Abstoßung wie eine massive Gewebsinfiltration durch Leukozyten, ein hoher Rejection Activity Index, die Destruktion der Leberstruktur und die Komplementaktivierung wurden wie erwartet von dieser Gruppe erfüllt.

Von allen Versuchsgruppen waren die Parameter für ROS in der xenogenen Vollblutgruppe am stärksten ausgeprägt. Zusätzlich nahm die Konzentration von GSH in der Vollblutgruppe gleich zu Beginn der Reperfusion rapide ab und erholte sich auch nicht in demselben Ausmaß wie in den anderen Versuchsgruppen (Abb 3.9). Sowohl die Lipidperoxidation, als auch der prozentuale Anstieg der NO- und Peroxynitritfreisetzung war am stärksten, parallel hierzu wurde eine starke Einschränkung der Leberfunktion und eine massive Abstoßungsreaktion beobachtet. Ob nun die ROS-Freisetzung die Organschädigung triggert oder vice versa die Organschädigung bzw. die hyperakute Abstoßung die ROS-Freisetzung auslöst, lässt sich mit unserem Versuchsaufbau nicht vollständig beantworten. Nachgewiesen wurde aber die essentielle Rolle der FR bei der hyperakuten Abstoßung. Auffallend waren die niedrigeren Ausgangswerte der Plasmakonzentration von NO der xenogenen Vollblutgruppe im Vergleich zur KC Gruppe (Tab. 3.4). Dies könnte darauf hinweisen, dass KC zu Beginn der hyperakuten Abstoßung NO abfangen und bezüglich RNS protektiv wirken könnten. Der genaue Mechanismus blieb ungeklärt und könnte in zukünftigen Versuchen genauer untersucht werden. Interessant war, dass sowohl bei der FR Bildung als auch dem Portaldruck in der xenogenen Vollblutgruppe eine gewisse Stagnierung der beobachteten Parameter nach 60 Minuten Perfusion zu sehen war. Eine Erklärung wäre die massive hyperakute Abstoßungsreaktion, einhergehend mit Zerstörung der zellulären Integrität und damit ein massiver Untergang von Mitochondrien, welche ROS produzieren. Die zelluläre Schädigung konnte sowohl makroskopisch als auch histologisch durch den vollkommenen Verlust der Organintegrität festgestellt werden. Hieraus erklärt sich auch der stetige Anstieg der Leberenzyme.

Hauptsächlich für den oxidativen Schaden verantwortlich waren in unserem Xeno-Modell die Leukozyten und in einem geringeren Maße die Kupfferzellen, aber nur in Kombination mit den Leukozyten. Verglichen zu den anderen Versuchsgruppen hatte einzig die Leukozytendepletion durch Filtration eine protektive Wirkung auf die Organfunktion.

#### **4.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass die Bildung freier Radikale mit dem Ausmaß der Abstoßungsreaktion, dem Leberschaden und der Dysfunktion des xeno-perfundierten Organs



korreliert. Im Gegensatz zur isogenen Reperfusion mit Ratten-Vollblut, konnten wir in der Perfusion mit xenogenem humanen Vollblut eine massive Freisetzung von ROS/RNS in Verbindung mit einer hyperakuten Abstoßung und einem ausgedehnten Leberschaden beobachten. In der xenogenen Reperfusion ließ sich die Freisetzung von freien Radikalen den Leukozyten und in geringerer Masse den Kupfferzellen zuordnen, denn es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Zellpopulationen hinsichtlich der Bildung von FR und dem nachfolgenden Organschaden. Nur die Leukozytendepletion hatte einen protektiven Effekt auf den FR assoziierten Leberschaden während der hyperakuten Abstoßung.

Die Xenotransplantation der Leber ist zurzeit noch weit davon entfernt, klinisch eingesetzt zu werden (Cozzi et al. 2006). Eine Inhibierung oder Modulation der FR-Freisetzung könnte eine viel versprechende Basis für einen wichtigen therapeutischen Ansatz der hyperakuten Abstoßung und die klinische Applikation der Xenotransplantation darstellen. Eine Möglichkeit die schädigenden oxidativen Folgen der FR-Freisetzung zu limitieren, wäre entweder die antioxidativen Systeme zu stärken oder der Zirkulation Antioxidantien wie z.B. spezifische Scavenger hinzuzufügen (Schauer et al. 2004). Die Praktikabilität stellt ein Problem dar, da es noch nicht gelungen ist Antioxidantien gezielt, artspezifisch und in genügend hoher Konzentration einem in vivo System zu zufügen. Dagegen gibt es bereits einige Möglichkeiten NO durch selektive iNOS- oder eNOS-Inhibitoren zu hemmen (Jsobe et al. 1999).

In der Literatur wird die Initialisierung der hyperakuten Abstoßung von Xenotransplantaten der Aktivierung des Komplementsystems zugeschrieben. Wir konnten in unserem Modell nun erstmals zeigen, dass die Aktivierung des Komplementsystems nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Leukozyten zur Freisetzung von radikalen Stickstoff- und Sauerstoffspezies führt, die dann wiederum die Schädigung des Gewebes und die Dysfunktion des Transplantates verursachen.

Inwieweit eine gezielte pharmakologische Hemmung der Leukozytenaktivität zu einer Verminderung der hyperakuten Abstoßung von Xenotransplantaten bewirken kann, bleibt Inhalt künftiger Untersuchungen.

## Zusammenfassung

Die hyperakute Abstossung stellt die unmittelbarste Hürde für die Leber-Xenotransplantation dar. Das Ziel dieser Arbeit war es die Bedeutung verschiedener Zellpopulationen für die Bildung von freien Radikalen während der hyperakuten Abstossung der xenotransplantierten Leber zu untersuchen. Wir befassten uns mit der Frage ob es einen Zusammenhang zwischen der FR-Freisetzung und der hyperakuten Abstossung gibt und welche Zellpopulationen hauptverantwortlich für den oxidativen Schaden während der hyperakuten Abstossung sind.

In einem etablierten Xenoperfusions-System wurden Rattenlebern mit Perfusaten bestehend aus gezielt-isolierten Zellgruppen reperfundiert. Hierbei evaluierten wir ein Leukozytenfiltersystem und wendeten zur Thrombozytengewinnung ein validiertes Separations/Zentrifugationsprotokoll an. Sowohl die physiologische Zusammensetzung der Perfusate, als auch die physiologische Funktion der Zellen konnten durch Coulter Counter, P-Selektin Flowzytometrie und histologische Untersuchungen gewährleistet werden. Zur Erfassung der FR-Produktion, wurden die Lipidperoxidation, NO Abbauprodukte anhand der Griess-Reaktion, Peroxynitrikonzentration und der antioxidative Status mittels Glutathionkonzentration analysiert. Durch die Verwendung dieser Messmethoden, ließen sich freie Radikale nicht direkt messen und mögliche Zwischenprodukte oder Reaktionsschritte nicht vollständig erfassen, aber die Bestimmung derer stabilen Endprodukte bot uns die Möglichkeit auch ohne Hinzufügen von Chemikalien in das Perfusionssystem ein umfassendes Bild des oxidativen Stresses zu erfassen. Die Organfunktion wurde mittels der Galleproduktion und der Freisetzung von Leberenzyme kontrolliert. Der Potaldruck war ein wichtiger Messparameter für die Makrohämodynamik. Nach Ende der Perfusion wurden Gewebeproben zur histologischen Aufarbeitung mit der HE-, Esterase- und Komplementfärbung zum Nachweis der hyperakuten Abstossungsreaktion entnommen. Folgende Ergebnisse konnten wir zusammenfassend aus unseren Daten gewinnen:

In unserem Modell der perfundierten Rattenleber gab es einen signifikanten Unterschied bezüglich der Freisetzung von ROS/RNS zwischen der isogenen und xenogenen Reperfusion mit Vollblut. In den xenogen perfundierten Gruppen hatten wir trotz Zeichen einer Komplementaktivierung, d.h. einer hyperakuten Abstossung, in den Versuchsgruppen mit geringen FR-Konzentrationen eine Reduktion der Leberschäden beobachtet. Wir konnten daraus folgern, die ROS-Bildung im engen Zusammenhang mit der Leberfunktion, dem Zellschaden und der hyperakuten Abstoßungsreaktion stand. Wir konnten in unserem Modell nun erstmals zeigen, dass die Aktivierung des Komplementsystems nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Leukozyten zur Freisetzung von radikalen Stickstoff- und Sauerstoffspezies

führt, die dann wiederum die Schädigung des Gewebes und die Dysfunktion des Transplantates verursachen.

Es gab signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Zellpopulationen hinsichtlich der Freisetzung von FR in unserem Xenotransplantations-Modell. Unsere Daten weisen darauf hin, dass in der Frühphase der hyperakuten Abstossung weder Erythrozyten noch Thrombozyten oder Hepatozyten eine große Rolle in der Freisetzung von FR spielen. Es ließen sich in den Erythrozyten- und Thrombozytengruppen keine signifikanten Unterschiede zur isogen perfundierten Kontrollgruppe finden. Hauptsächlich für den oxidativen Schaden - also Freisetzung von ROS und RNS - verantwortlich waren in unserem Modell die Leukozyten und in einem geringeren Maße die Kupferzellen, aber nur in Kombination mit den Leukozyten. Die Leukozytendepletion durch die Filtration wirkte am protektivsten auf die Organfunktion, wogegen die Depletion von KC, nur die ROS-Freisetzung reduzierte, aber keinen protektiven Einfluss auf den Grad der hyperakuten Abstossung und Organschädigung hatte. Die Anwesenheit von KC dagegen scheinen NO abzufangen und wirken bezüglich RNS protektiv.

Unsere Daten tragen zu dem Verständnis der frühen Vorgänge und insbesondere der Rolle der Freien Radikale während der hyperakuten Abstossung in der Xenotransplantation der Leber bei. Eine Inhibierung oder Modulation der ROS-Freisetzung könnte eine viel versprechende Basis für einen therapeutischen Ansatz der hyperakuten Abstossung darstellen. Inwieweit eine gezielte pharmakologische Hemmung der Leukozytenaktivität und der Einsatz von FR spezifischen Scavengern zu einer Verminderung der hyperakuten Abstoßung von Xenotransplantaten bewirken können, bleibt Inhalt künftiger Untersuchungen.

## Literatur

Abuja PM, Albertini R (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*; 306: 1- 17.

Adding LC, Bannenberg GL, Gustafsson LE (2001). Basic experimental studies and clinical aspects of gadolinium salts and chelates. *Cardiovascular Drg Reviews*; 19:41-56.

Anonymous (1997). Banff Schema for grading liver allograft rejection: An international consensus document. *Hepatology*; 25:658-663.

Arai M, Thurman R, Lemaster JJ (1999). Involvement of Kupffer cells and sinusoidal endothelial cells in ischemic preconditioning to rat livers stored for transplantation. *Transplant Proc*; 31:425-427.

Arthur MJP (1988). Reactive oxygen intermediates and liver injury. *J Hepatol*; 6:125-131.

Babior BM (1984). Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*; 64: 959-966.

Beckman JS, Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol*; 271:C1424–C1437.

Berlett BS, Stadtman ER (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative Stress. *J Biol Chem*; 272:20313-16.

Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA (2000). Nitric Oxide Regulation of Free Radical- and Enzyme-Mediated Lipid and Lipoprotein Oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 20: 1707-15.

Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC (1987). Bile flow- an index of ischemic injury. *J Surg Res*; 42:565-9.

Chen T, Zamora R, Zuckerbraun B, Billiar TR (2003). Role of nitric oxide in liver injury. *Curr Mol Med*; 3:519–526.

Connor HD, Gao W, Nukina S, Lemaster JJ, Mason RP, Thurman RG (1992). Evidence that free radicals are involved in graft failure following orthotopic liver transplantation in the rat- an electron paramagnetic resonance spin trapping study. *Transplantation*; 54:199-204.

Corradini SG, Micheletta F, Natoli S (2005): High preoperative recipient plasma 7 $\beta$ -hydroxycholesterol is associated with initial poor graft function after liver transplantation. *Liver Transplantation*; 11:1494-1504.

Cozzi E, Bosio E, Seveso M, Vadori M, Ancona E (2006). Xenotransplantation current status and future perspectives. *Br Med Bull*; 75-76: 99-114.

Deschamps JY, Roux FA, Sai P et al. (2005). History of xenotransplantation. *Xenotransplantation*; 12: 91–109.

Decker K (1990). Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem*; 192:245-61.

Demetris A, Ruoppert K, Dvorchik I (2002). Real time monitoring of akute liver-allograft rejection using the Banff-Scheme. *Transplantation*. 74(9):1290-6.

Diao TJ, Yuan TY, Li YL (2002). Immunologic role of nitric oxide in acute rejection of golden hamster to rat liver transplantation. *World J Gastroenterol*; 8 (4):746-51.

Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G (1985). The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpoulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2, ED3. *Immunology*; 54:589-99.

Eisenfeld L, Silver H, McLaughlin J (1992). Prevention of transfusion-associated cytomegalovirus infection in neonatal patients by removal of white cells from blood. *Transfusion*; 32:205-209.

Fenton HJH (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc*; 5:899-910.

Fridovich I (1974). Superoxidase Dismutases. *ADV Enzymo*; 41:35-97.

Fridovich I (1983). Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*; 23: 239-257.

Forde RC, Fitzgerald DJ (1997). Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury. *Circulation*; 97:787-9.

Gershman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*; 119: 623-6.

Grezzana TJM, Corso CO, Zanotelli ML, Brandao ABM, Schlindwein E, Meine MHM, Fleck A Jr, Cassal A, Hope L, Hoppen R, Kiss G, Gleisner ALM, Cerski T, Bello A, Severo V, Innocenti C, Cantisani GPC (2004) Oxidative stress, hepatocellular integrity, and hepatic function after initial reperfusion in human hepatic transplantation. *Transplant Proc*; 36:843–5.

Gutteridge JM (1982). The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipids peroxidation catalysed by iron salts. *FEBS LETT*; 150:454-8.

Gutteridge JM, Rowley DA, Griffiths E, Halliwell B (1985). Low molecular weight iron complexes and oxygen radical reactions in idiopathic haemochromatosis. *Clin Sci*; 68: 463-7.

Gutteridge JM, Halliwell B (2000): Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci*; 899:136- 147.

Haber F and Weiss JJ (1943). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc London Ser A*; 147:332-52.

Halliwell B (1996). Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr*; 16:33-50.

Halliwell B, Gutteridge JM (1999). *Free radicals in biology and medicine*. 3rd edition, Oxford Science Publications

Halliwell B, Whiteman M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*; 142: 231-255.

Hammer C, Thein E (2002). Commentary: Physiological aspects of Xenotransplantation, 2001. *Xenotransplant*; 9:303-8.

Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstal J (1992). Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leuk Biol*; 52:296-302.

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*; 28:1456-62.

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2002). Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch Biochem Biophys*; 397:377-83.

Hon WM, Lee KH, Khoo HE (2002). Nitric oxide in liver disease: friend, foe, or just passerby? *Ann NY Acad Sci*; 962:275-95.

Huk I, Brovkovich V, Nanobashvili J, Neumayer C, Polterauer P, Prager M, Patton S, Malinski T (2000). Prostaglandin E1 reduces ischemia/reperfusion injury by normalizing nitric oxide and superoxide release. *Shock*; 14:234-42.

Inoue S und Kawanishi S (1995). Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett*; 371:86-8.

Iwamoto A, Egashira T, Takayama F, Yamnaka Y, Noguchi T (2002). Change in free radical-related substances in plasma following ischemia-reperfusion in rat liver. *Pathophysiology*; 8: 167-74.

Jaeschke H, Mitchell JR (1989). Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury. *Biochem Biophys Res Commun*; 160:140-7.

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW (1990). Neutrophils contribute to ischemia-reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB*; 4:3355-59.

Jaeschke H, Farhood A (1991). Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Amer J Physiol*; 260:G355-62.

Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ (1993). Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Am J Physiol*; 264:G801-9.

Jsohe M, Katsuramaki T, Hirata K, Kimura H, Nagayama M, Matsuno T (1999). Beneficial effects of inducible nitric oxide synthase inhibitor on reperfusion injury in the pig liver. *Transplant*; 68:803-813.

Kaur H and Halliwell B (1990). Action of biologically-relevant oxidizing species upon uric acid. Identification of uric acid oxidation products. *Chem Biol Interac*; 73:235-47.

Lander HM (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB*; 11:118-24.

Lenaz G (2001). The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*;52:159-64.

Leo R, Patino D, Iuliano L (1997). Platelet activation by superoxide anions and hydroxyl radicals intrinsically generated by platelets that had undergone anoxia and then reoxygenated. *Circulation*; 95:885-91.

Liu TZ, Stern A (1998). Assessment of the role of oxidative stress in human disease. *J Biomed Lab Sci*; 10:12-28.

Liu P, Xu B, Quilley J, Wong PY (2000). Peroxynitrite attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol*; 279:C1970-7.

Makrides S (1998). Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacological Reviews*; 50:59-88



Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K (1998). Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*; 92:507-15

McCord JM and Fridovich I (1969). Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem*; 224:6049-55.

McCord JM and Fridovich I (1970). The utility of superoxide dismutase in studying free radical reaction. The mechanism of the mediation of cytochrome C reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem*; 245:1374-7.

Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B (1996). Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by Nitric Oxide. *J Biol Chem*; 271:40-7.

Moncada S (1994). *Biology of nitric oxide* (1994). Colchester: Portland Press; 319-322.

Motoyama K, Kamel T, Nakafusa Y (1995). Donor treatment with gadolinium chloride improves survival after transplantation of cold-stored livers by reducing Kupffer cell tumor necrosis factor production in rats. *Transplant Proc*; 27; 752-64.

Murad F (1994). The nitric oxide-cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. *Recent Prog Horm Res*; 49:239-48.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*; 87: 315 - 424.

Radi R (1998). Peroxynitrite reactions and diffusion in biology. *Chem Res Toxicol*; 11:720-1.

Radi R (2004). Nitric oxide, oxidants, protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 4003-8.

Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S (1992). S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*; 107:745-9.

Rai RM, Yang SQ, McClain C, Karp CL, Kelen AS, Diehl AM (1996). Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Physiol*; 270:G909-18.

Riedel GL, Scholle JL, Shepard AP, Ward WF (1983). Effects of hematocrit on oxygenation of the isolated perfused rat liver. *Am. J. Physiol*; 245:G769-74.

Roland CR, Naziruddin B, Mohanakumar T, Glys MW (1996). Gadolinium chloride inhibits Kupffer cell nitric oxide synthase (iNOS) induction. *J Leukoc Biol*; 60:487-92.

Ryma B, Wang J.F., De Groot H (1991). Superoxide release by activated Kupffer cells upon hypoxia and reoxygenation. *Am J Physiol*; 261:G602-7.

Saadi S and Platt JL (2002). Humoral rejection and endothelial cell activation. *Xenotransplant.*; 9:239-41.

Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Meissner H, Shildberg FW, Mess K, Bilzer M (2004). Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver against reperfusion injury following rat liver transplantation. *World J Gastroenterol*; 10:864-70.

Spencer AJ, Wilson SA, Batchelor J, Reid A, Rees J, Harpur E (1997). Gadolinium chloride toxicity in the rat. *Toxicol Pathol*; 25:245-55.

Tarpey MM, Fridovich I (2001). Methods of detection of vascular reactive species nitric oxide, Superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circulation Research*: 224-36.

Terajima H, Enders G, Thiaener A, Hammer C, Kondo T, Thiery J, Yamamoto Y, Yamaoka Y, Messmer K (2000). Impact of hyperthermic preconditioning on postischemic hepatic microcirculatory disturbances in an isolated perfusion model of the rat liver. *Hepatology*; 31:407-15.

Thannickal VT, Fanburg BL (2000). Reactive Oxygen Species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 279:L1005-28.

Thein E, Selvilimis G, Muenzing S, Hammer C, Messmer K (2001). Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs. *Xenotransplant*; 8:94-9.

Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, Traynor O, Geoghegan J, Hegarty JE, O'Farrelly C (2004). Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Transplantation*; 78:250–6.

Vollmar B, Ruttiger D, Wanner GA, Leiderer R, Menger MD (1996). Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock*; 6:434-41.

Yu BP (1994): Cellular defences against damages from reactive oxygen species. *Physiol Rev*; 74:139-62.

Zhong Z, Qu W, Connor HD, Thurman RG (1995). Inactivation of Kupffer cells minimizes reperfusion injury in fat-loaded livers from ethanol-treated rats. *Transplant Proc*; 27:528-30.

# Thanh-Truc Ba Ngo

## LEBENS LAUF

---

geboren am 26.02.1979 in Gia Dinh (Vietnam)  
wohnhaft in Fehrenbachallee 1-3, 79106 Freiburg

### Schul Ausbildung

1985 – 1998  
Grundschule Heimenkirch  
Gymnasium Lindenberg  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,1)

### Hochschulausbildung

1998 – 2000  
Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm  
08.09.2000  
Ärztliche Vorprüfung  
2000 – 2005  
Studium der Humanmedizin  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
28.08.2001  
1. Staatsexamen  
16.04.2004  
2. Staatsexamen  
12.05.2005  
3. Staatsexamen (Gesamtnote 1,9)

### Praktisches Jahr

04.2004 – 08.2004  
Hämato-Onkologie, Med. Klinik III, Universitätsklinikum  
Großhadern, LMU, München  
08.2004 – 12.2004  
Transplantation Unit (Interdisziplinäres Zentrum für  
Transplantationschirurgie und Nephrologie),  
Groote Schuur, University of Capetown, South Africa  
12.2004 – 04.2005  
Orthopädische Klinik, Kantonsspital Winterthur, Schweiz

### Ärztliche Tätigkeit

Seit August 2006  
Assistenzärztin an der Medizinischen Klinik I,  
Abteilung Hämatologie und Onkologie,  
Universitätsklinikum Freiburg  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Mertelsmann

### Stipendien

1992 – 1998  
Orgelstipendium und C-Stipendium der Diözese Augsburg  
1998 – 2005  
Stipendiatin des Bayerischen Begabtenförderungswerkes

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mir durch kompetente Ratschläge, konstruktive Kritik und verlässliche Mitarbeit bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite standen und die mich auch in schwierigen Situationen weiterhin unterstützt haben.

Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Konrad Meßmer als ehemaligem Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung an der Ludwig-Maximilians-Universität München möchte ich für die Aufnahme in das Institut danken.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Claus Hammer möchte ich insbesondere für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und vor allem auch für sein Vertrauen und die finanzielle Unterstützung danken.

Herrn Prof. med. Georg Enders möchte ich für die Übernahme der Doktorandenbetreuung, und seiner Unterstützung bei der wissenschaftlichen Betreuung besonders danken.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. vet. Eckart Thein für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung dieser Arbeit, sowie für die Einführung in die Arbeitsmethoden. Er stand mir kritisch und konstruktiv bei der Auswertung der Ergebnisse zur Seite und unterstützte mich hilfreich bei der Anfertigung des Manuskriptes. Für die Unterstützung bei fachlichen Problemen und Fragen möchte ich mich weiterhin bei Herrn Dr. med. Andres Beiras bedanken.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Frau Anne-Marie Allmeling und den medizinisch-technischen Assistentinnen des Labors des Instituts für Chirurgische Forschung für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit und die tatkräftige Hilfe bei den Versuchsdurchführungen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein herzlichster Dank meiner Familie und besonders meinen Eltern Frau Lieu Thi Kim-Cuc und Herrn Ngo Van Ba für die immerwährende Unterstützung.