

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Klinikum Großhadern  
Direktor: Prof. Dr. med. K. W. Jauch

und dem

Institut für Chirurgische Forschung  
der Ludwig- Maximilians-Universität München,  
Klinikum Großhadern  
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Die Bedeutung des Atrialen Natriuretischen Peptids bei der Prävention  
von Ischämie-Reperfusionsschäden nach experimenteller  
Lebertransplantation**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Bach

aus

München

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. R. J. Schauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Boekstegers

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. U. Grützner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2008

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>A.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
<b>B.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	8
1.	Tiermodell	8
1.1	Versuchstiere	8
1.2	Tierhaltung	8
2.	Experimentelle Gruppen	9
3.	Experimentelles Protokoll	11
4.	Präparation	13
4.1	Anästhesie und Monitoring	13
4.2	Operatives Vorgehen bei der ANP- Dosisfindung	14
4.3	Operatives Vorgehen beim Spender und Konservierung	15
4.4	Operatives Vorgehen beim Empfänger	18
5.	Parameter und Meßmethoden	20
5.1	Systemische Hämodynamik	20
5.2	Hepatische Mikrozirkulation	20
5.3	Hepatozelluläre Integrität	23
5.3.1	Transaminasen	23
5.3.2	Lichtmikroskopie der Leber	23
5.4	Hepatozelluläre Funktion	24
6.	Statistische Auswertung	24

<b>C. ERGEBNISSE</b>	25
<b>I. ANP- Konzentrationsbestimmungen</b>	25
1. ANP- Basiskonzentration	25
2. ANP- Dosisfindung	26
<b>II. Einfluss der präischämischen ANP- Infusion auf den frühen IRS nach LTX</b>	28
1. Hepatozelluläre Integrität	28
1.1 Transaminasen	28
1.2 Lichtmikroskopische Befunde	29
2. Hepatozelluläre Funktion	31
3. Hepatische Mikrozirkulation	32
3.1 Sinusoidale Perfusionsrate nach ANP-Behandlung	32
3.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion nach ANP-Behandlung	34
<b>D. DISKUSSION</b>	37
1. Modelle	37
1.1 Lebertransplantation bei der Ratte	37
1.2 ANP- Konzentrationsbestimmung	38
2. Ischämie-/Reperfusionsschäden nach Lebertransplantation	39
3. Zytoprotektion durch ANP in vitro/ ex vivo	41
3.1 Beurteilung des hepatozellulären Schaden und des Mikrozirkulationsschaden	42
4. Zytoprotektion durch ANP in vivo	43

<b>E.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	46
<b>F.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	48
<b>G.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	49
<b>H.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	60
<b>I.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	61

## A. EINLEITUNG

### Lebertransplantation

Ende der sechziger Jahre konnte Starzl von den ersten erfolgreichen orthotopen Lebertransplantationen (LTX) am Menschen berichten, jedoch betrug die längste Überlebenszeit gerade einmal neun Monate (99;103). Durch Verbesserung der immunsuppressiven Therapie, insbesondere durch die Einführung von Ciclosporin (16;17) sowie durch die zunehmende Erfahrung und die Optimierung der chirurgischen Technik bei steigender Anzahl an Operationen, verlängerten sich die Überlebenszeiten stetig. Heute ist die orthotope Lebertransplantation ein weltweit etabliertes Verfahren zur Therapie terminaler Lebererkrankungen, und die Langzeitüberlebensraten betragen kumulativ ca. 75 % nach 5 Jahren (57).

Die Indikationen zur Lebertransplantation, unterteilt in chronische Lebererkrankungen und akutes Leberversagen, sind folgende:

- Akutes Leberversagen: durch Hepatitis A-Virus- (HAV), Hepatitis B-Virus- (HBV), Hepatitis C-Virus- (HCV) Infektionen, Medikamente (z.B. Paracetamol, Halothan), Intoxikationen (z.B. mit Pilzgiften), Gefäßokklusion (Budd-Chiari-Syndrom), Reye-Syndrom, akute Schwangerschaftsfettleber, selten nach Lebertrauma (86;99-102)
- Chronische Lebererkrankungen: Leberzirrhose durch chronische HBV-, HCV-, HB/D-Infektion, Autoimmunhepatitis, alkoholtoxische Leberzirrhose, primär biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis, Gallengangsatresie (bei Kindern); Stoffwechselerkrankungen wie Morbus Wilson, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, Porphyrie, Oxalose, Hämochromatose, Mukoviszidose, Tyrosinämie, Galaktosämie; hepatozelluläre Karzinome mit und ohne Leberzirrhose, zentrales Gallengangskarzinom, Metastasenleber bei neuroendokrinem Primärtumor, große Zystenlebern (86;99-102)

In Deutschland werden derzeit nach Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation (Stand 2006) jährlich ca. 800 orthotope Lebertransplantationen nach postmortaler Organspende durchgeführt, der Bedarf liegt jedoch bei mehr als 1100 Lebertransplantationen. Diese schon seit Jahren auch weltweit bestehende Kluft zwischen der Zahl der Patienten auf der Warteliste und der Zahl der tatsächlich verfügbaren Organe

fürte dazu, dass auch immer mehr grenzwertig geeignete Organe, also z.B. Organe mit hohem Verfettungsgrad, langer Ischämiezeit oder mit hohem Spenderalter zur Transplantation akzeptiert werden. Die Transplantation solcher Organe ist jedoch mit einer deutlich erhöhten postoperativen Letalität verbunden (85;86).

### Konservierung der Leber

Die Entwicklung der University of Wisconsin- Lösung (UW- Lösung) bedeutete einen großen Fortschritt im Bereich der Organkonservierung und trug wesentlich zur positiven Entwicklung der Überlebensraten nach Lebertransplantation bei (5;53;114). Sie löste 1990 die bis dahin verwendete Euro-Collins-Lösung ab und ermöglichte eine Verdoppelung der Konservierungszeiten auf maximal 20 Stunden.

Trotz der verbesserten Konservierungstechniken wird der Erfolg der Lebertransplantation auch heute noch durch Konservierungsschäden entscheidend beeinflusst und sie sind zu einem erheblichen Anteil für Transplantatverluste verantwortlich, die eine Retransplantation erfordern (7). Es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Dauer der Konservierung und Inzidenz von Retransplantationen aufgrund eines primären Transplantatversagens gezeigt werden (30). Ein primäres Transplantatversagen (Synonym: Primäre Nichtfunktion, PNF) kommt bei 5 bis 10 % der transplantierten Lebern vor und kann nur durch eine Retransplantation, die innerhalb von 48 bis 72 Stunden erfolgen muss, behandelt werden (30;41). Die PNF bedeutet eine absolut ungenügende Funktionsaufnahme des Organs und ist gekennzeichnet durch einen raschen und exzessiven Anstieg der Transaminasen, eine fehlende Gallebildung sowie gravierende Gerinnungsstörungen. Diese diagnostischen Kriterien sind bereits in den ersten Stunden nach Lebertransplantation erfassbar (86).

Eine weitere schwerwiegende Komplikation ist die initiale Transplantatdysfunktion (IDF), die bei bis zu 30% der transplantierten Patienten auftritt. Kennzeichen dieser Komplikation sind ein postoperativer Anstieg der GOT auf  $\geq 2500$  U/l sowie eine verzögerte Erholung der hepatischen Syntheseleistungen. Allerdings müssen nur ca. 30 % der Patienten mit IDF retransplantiert werden, da es in etwa zwei Drittel der Fälle zu einer Rekompensation der Transplantatfunktion kommt (26;86).

Neben der Verknüpfung der Inzidenz von PDF und IDF mit der Konservierungszeit gilt auch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Nicht-Anastomosenstenosen der Gallengänge und der kalten Ischämiezeit als gesichert (91;92). Diese ischämischen Gallengangsstrikturen treten während der ersten 3 Monate nach LTX auf. Wegen ihrer oft

disseminierten, intrahepatischen Lokalisation sind sie bei einem ausgeprägten Befund meist auch nur durch eine Retransplantation therapierbar.

Die PNF, die IDF und die ischämischen Gallengangsstrikturen stellen folglich gravierende Komplikationen durch Konservierungsschäden dar und bestimmen entscheidend Mortalität und Letalität nach LTX. Eine Verbesserung der Konservierungstechniken könnte die Inzidenz dieser Komplikationen reduzieren und damit zu einer Entlastung des knappen Spenderpools führen. Außerdem könnten vermehrt grenzwertig geeignete Organe akzeptiert werden bzw. nach Transplantation solcher Organe die Erfolgsraten gesteigert und dadurch dem Mangel an Spenderlebern entgegengewirkt werden.

### Ischämie-Reperfusionsschäden

Die Konservierung von postmortalen Spenderorganen erfolgt durch Spülung und anschließende hypotherme Lagerung in speziellen Konservierungslösungen. Dem Spenderorgan widerfahren während des gesamten Ablaufs der Lebertransplantation mehrere Ischämiephasen. Bei Explantation kommt es mit Beginn der retrograden Perfusion der Leber mit der Konservierungslösung zu einer ersten warmen Ischämiephase, auf die nach Spenderhepatektomie eine kalte Ischämiephase folgt. Von Beginn der Implantation des Organs bis zur Reperfusion wird die Leber einer zweiten warmen Ischämie unterworfen. Durch diese Kombination aus Phasen kalter und warmer Ischämie entstehen Ischämieschäden. Durch die Reperfusion des Transplantates werden zusätzliche Zellschäden induziert, die als Reperfusionsschäden bezeichnet werden (29). Konservierungsschäden im Rahmen der Lebertransplantation sind somit Ischämie-Reperfusionsschäden (IRS).

Als Pathomechanismen für IRS konnten z.B. die Depletierung von ATP sowie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies identifiziert werden. Verantwortlich für die ATP-Depletierung sind anoxische Zellschäden der Mitochondrien, die zu den frühesten Veränderungen gehören. Durch den ATP-Mangel kommt es zum Erliegen ATP-abhängiger Stoffwechsel- und Transportsysteme, wodurch insbesondere auch die intrazelluläre Ionen-Homöostase betroffen ist. So steigen in isolierten Hepatozyten die zytosolischen  $\text{Na}^+$ -,  $\text{Ca}^{2+}$ -, und  $\text{H}^+$ - Konzentrationen während der Hypoxie an, während die  $\text{K}^+$ - Konzentration abfällt (11;12;33). Die bei hypoxischen Hepatozyten zuerst entstehende Akkumulation von  $\text{Na}^+$  (11) kann am ehesten durch eine Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - ATP-ase erklärt werden. Der Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ - Konzentration ist von entscheidender Bedeutung für die Entstehung der Zellschwellung, insbesondere bei hypothermer



Konservierung von Organen (38;97). Die Zellschwellung wiederum kann zu einer Abnahme der nutritiven Perfusion in den Sinusoiden führen und wird daher für einen wichtigen Pathomechanismus der Zellschädigung gehalten (66). Dafür sprechen besonders die protektiven Eigenschaften osmotisch aktiver Verbindungen (z.B. Lactobionat) in Konservierungslösungen (76;98;109).

### Rolle der Calcium-Homöostase

Nach dem zuerst auftretenden Anstieg der  $\text{Na}^+$ -Konzentration hypoxischer Hepatozyten kommt es zusätzlich zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (11;12). Ursächlich hierfür scheint in erster Linie ein vermehrter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die Plasmamembran, der auf einen gesteigerten Influx über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sowie eine Umkehr des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers durch die Anwesenheit der hohen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen zurückgeführt wird (33). Auch eine vermehrte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern wurde in verschiedenen Modellen nachgewiesen (81;113).

Die deutliche Reduktion hypoxischer Hepatozytenschäden bei Verwendung  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Inkubationsmedien legt eine entscheidende Bedeutung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieges in der Entstehung hepatischer Ischämieschäden nahe (33).

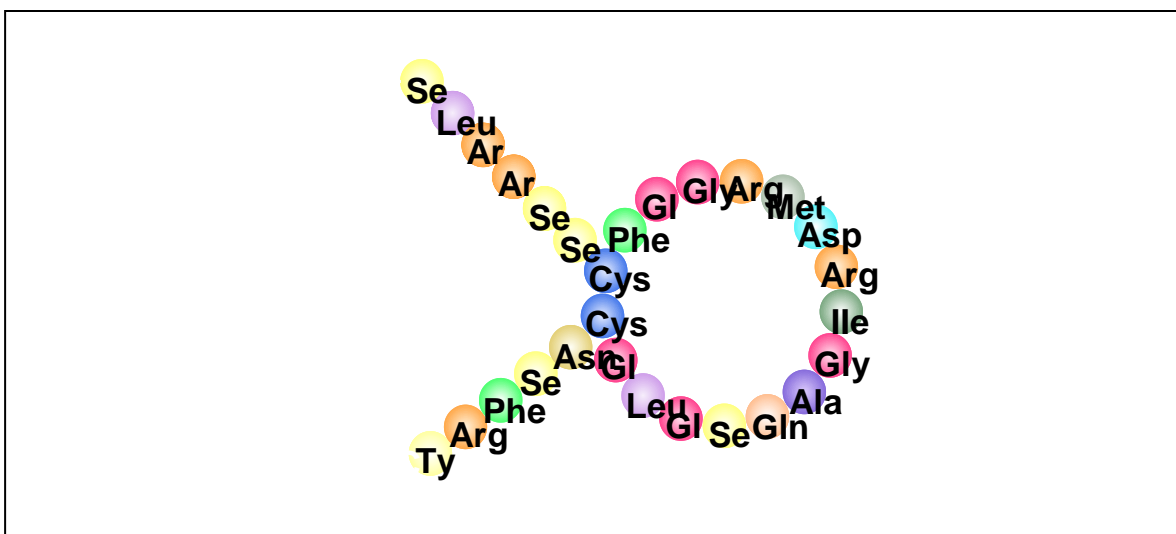
Im Zellstoffwechsel erfüllt  $\text{Ca}^{2+}$  eine Vielzahl von Aufgaben, so dass ein Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gravierende Auswirkungen hat. Als wesentliche zellschädigende Mechanismen wurden die Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteasen, Phospholipasen und Endonukleasen identifiziert (21;28;34;43;44;81-83;115). Die durch  $\text{Ca}^{2+}$  gesteigerte Aktivität von Endonukleasen führt zum Abbau ribosomaler RNS und tRNS im Zytosol und dadurch zur Störung der Proteinsynthese. Durch Aktivierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Phospholipasen kommt es zu einer Abnahme des Phospholipidgehalts der Zellmembranen und zieht damit eine Änderung der Fluidität und Funktion der Membran nach sich (117). Auch eine Aktivierung nicht-lysosomaler,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteasen (Calpaine) wurde bei Anoxie bzw. Ischämie-Reperfusion der Leber nachgewiesen (4;13;25). Die unterschiedlichen Aktivitäten dieser Proteasen in Hepatozyten, Sinusendothelzellen und Gallengangsendothelzellen scheinen auch Ursache der unterschiedlichen Schädigung dieser Zellen während der Anoxie zu sein (13).

Die in mehreren Studien nachgewiesenen protektiven Effekte von  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten (3;18-20;48;110;112) können allerdings nicht auf eine Beeinflussung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  in Hepatozyten zurückgeführt werden, vielmehr scheinen antioxidative Eigenschaften hierfür verantwortlich zu sein (72) sowie eine Hemmung der Kupffer- Zellen während der

Reperfusion (112). Die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten hemmbaren spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, deren Blockade die in der antihypertensiven Therapie gewünschte Vasorelaxation bewirkt, scheinen in Hepatozyten nicht vorzuliegen bzw. nur eine geringe Bedeutung zu haben (74).

### ANP

Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Zelle hormonell reguliert wird (64), erschien aber eine Therapie durch  $\text{Ca}^{2+}$ -senkende Hormone als möglich. Eine solche Eigenschaft wurde für das atriale natriuretische Peptid (ANP) beschrieben, welches von atrialen Myozyten bei vermehrter Vorhofdehnung durch Volumenexpansion und bei kardialer Hypoxie freigesetzt wird (35;126). Damalige Studien befassten sich hauptsächlich mit den natriuretischen und vasorelaxierenden Eigenschaften des ANP, die die Volumenhomöostase entscheidend beeinflussen (124). ANP wird als Prohormon in den Herzvorhöfen gebildet und nach enzymatischer Abspaltung als C-Terminus (ANP 99-126) in die Zirkulation abgegeben (35). Neben dem ANP gibt es weitere natriuretische Peptide wie das brain natriuretic peptide (BNP) und das C-type natriuretic peptide (CNP) (106;107), die wie das ANP natriuretische und vasorelaxierende Effekte vermitteln. Alle natriuretischen Peptide haben eine Ringstruktur, welche für die rezeptorvermittelte Wirkung als entscheidend angesehen wird (Abb. 1).



**Abb. 1: Struktur des ANP.** Die für die rezeptorvermittelte Wirkung entscheidende Ringstruktur besteht aus 17 Aminosäuren.

Die Effekte der natriuretischen Peptide werden über spezifische Rezeptoren in der Plasmamembran vermittelt. Bisher konnten drei verschiedene Rezeptoren identifiziert werden (32), die als A-, B-, und C- (Clearance-) Rezeptoren bezeichnet werden. Die A- und B- Rezeptoren sind über eine transmembranäre Domäne und intrazelluläre Kinase an eine Guanylat-Cyclase gekoppelt (32), und werden daher auch GC-A- und GC-B-Rezeptoren genannt. Durch eine Aktivierung dieser Rezeptoren kommt es über Stimulation der Guanylat-Cyclase zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP-Konzentration. ANP bindet am GC-A-Rezeptor, eine Stimulation des GC-B-Rezeptors wurde nur bei sehr hohen ANP-Konzentrationen festgestellt (61). Der C-Rezeptor bindet ANP sowie auch BNP und CNP. Dieser Rezeptor sorgt für die Internalisierung und Hydrolyse dieser Peptide und reguliert hierdurch ihre Plasmakonzentrationen (71).

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -senkenden Eigenschaften des ANP ist das cGMP verantwortlich, das als „second messenger“ fungiert. cGMP stimuliert cGMP-abhängige Proteinkinasen, die die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über verschiedene Mechanismen senken (70). Zum einen wurde eine Stimulation des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers nachgewiesen (30), zum anderen auch eine Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über zytoplasmatische und mikrosomale Membranen beobachtet. Hierfür sind Phosphorylierungsprozesse durch cGMP-Kinasen verantwortlich, die zur Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen der Plasmamembran und Mikrosomen führen (24;129). Außerdem reduzieren cGMP-Kinasen den mikrosomalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom über  $\text{IP}_3$ -stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle indirekt durch Hemmung der Phospholipase (47).

Aufgrund der  $\text{Ca}^{2+}$ -senkenden Eigenschaft des ANP schien folglich eine Prävention hepatischer Ischämie-Reperfusionsschäden möglich. An der Niere waren bereits protektive Effekte von ANP nach renaler Ischämie beschrieben worden (80;96), wobei hier als protektiver Mechanismus eine Antagonisierung der Ischämie-induzierten Vasokonstriktion vermutet wurde. Darüber hinaus wurde an kultivierten Hepatozyten eine Reduktion von Hypoxie-Reoxygenierungsschäden durch ANP nachgewiesen (84;122). Dabei wurde eine Reduktion des Anstiegs der freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Hepatozyten beobachtet sowie eine massive Stimulation der intrazellulären cGMP-Produktion. Bilzer und Gerbes wiesen dann am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber nach, dass ANP zytoprotektiv wirkt und zwar sowohl nach kalter als auch nach warmer Ischämie (9;36). Als wirksam erwies sich eine präischämische Behandlung der Lebern mit 200 nM ANP über 20 Minuten, niedrigere Konzentrationen oder eine postischämische Behandlung schienen unwirksam zu sein. Die Untersuchungen hinsichtlich des Wirkprinzips im Rahmen dieser Studien unterstützen den schon beschriebenen GC-A-Rezeptor/cGMP-

vermittelten Mechanismus der Zytoprotektion durch ANP. Darüber hinaus wurde als protektiver Mechanismus eine ANP/cGMP-vermittelte Reduktion oxidativer Zellschäden durch aktivierte Kupffer-Zellen postuliert (9;36).

Diese Ergebnisse von Bilzer und Gerbes zeigten eindrucksvoll das zytoprotektive Potential eines  $\text{Ca}^{2+}$ -senkenden Hormons in der Leber, das im Gegensatz zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten den zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in Hepatozyten bei Hypoxie reduziert. Es stellt sich somit die Frage, ob hiermit eine neue Methode zur Behandlung von Spenderlebern und Prävention hepatischer Ischämie-Reperfusionsschäden bei der Lebertransplantation zur Verfügung steht. Bisher fehlt der Nachweis einer Wirksamkeit von ANP in einem in vivo-Modell der Lebertransplantation, also unter Einbezug sämtlicher extrahepatischer Faktoren. Dieser Nachweis sollte mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erbracht werden. Es ergaben sich somit folgende Fragestellungen:

1. Wie hoch ist der ANP-Basalspiegel der Versuchstiere und wie sieht die Pharmakodynamik nach Applikation verschiedener Dosierungen aus?
2. Welche intravenös verabreichte ANP-Dosis wird letztendlich benötigt, um die als zytoprotektiv angesehene portalvenöse Konzentration von 200 nM ANP zu erreichen?
3. Sind die zytoprotektiven Eigenschaften des ANP am in vivo-Modell auch nachvollziehbar?
4. Anhand welcher Parameter ist eine Zytoprotektion nachweisbar?

## **B. MATERIAL UND METHODEN**

Die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen wurden 2002 - 2004 mit Zustimmung der zuständigen Behörden der Landesregierung von Oberbayern am Institut für Chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern (Ludwig-Maximilians-Universität, München) durchgeführt.

### **1. Tiermodell**

#### **1.1 Versuchstiere**

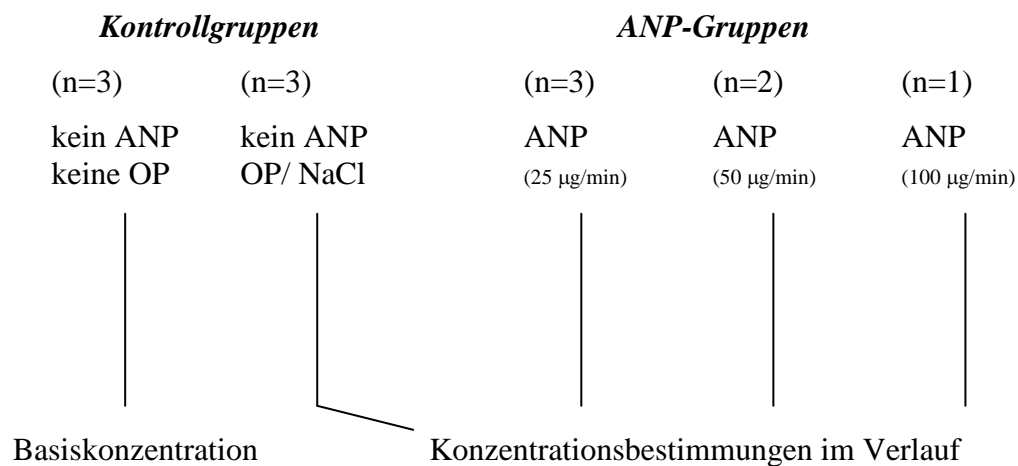
Für die Studie wurden insgesamt 36 männliche Lewis-Ratten verwendet, von denen 12 Tiere für die ANP-Dosisfindung benötigt wurden, je 12 Tiere dienten als Spender- bzw. Empfängertiere. Das Körpergewicht der Spendertiere betrug  $245 \pm 8$  g, das der Empfängertiere  $259 \pm 6$  g und das Gewicht der Tiere für die Konzentrationsbestimmungen  $241 \pm 3,9$  g. Alle Tiere wurden von der Versuchstierzucht Charles River Wiga, Sulzfeld, geliefert.

#### **1.2 Tierhaltung**

Die Versuchstiere wurden in Einzelkäfigen unter 12-stündigem Hell-, Dunkelzyklus bei freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Die autoregulierte Raumtemperatur lag bei  $21^{\circ}$  C, die Luftfeuchtigkeit bei  $60 \pm 5$  %. Die Zusammensetzung des Futters (Ssniff rat diet, Fa. ssniff Spezialdiäten, Soest) war wie folgt: 19 % Rohrprotein, 0,3 % Methionin, 1,0 % Lysin, 3,0 % Rohfett, 5,2 % Rohfaser, 6,7 % Rohasche, 1,1 % Calcium, 0,8 % Phosphor, 0,25 % Natrium und 0,2 % Magnesium. An Zusatzstoffen pro kg Futter waren enthalten: 18000 I.E. Vitamin A, 1280 I.E. Vitamin D<sub>3</sub> und 120 mg Vitamin E.

## 2. Experimentelle Gruppen

In der vorliegenden Studie wurden zwei Ansätze untersucht: Zum einen die ANP-Dosisfindung, zum anderen die Behandlung von Spendertieren mit ANP (Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg). Für die Dosisfindung wurden fünf Versuchsgruppen verwendet (Abb. 2):



**Abb. 2:** 12 Tiere wurden insgesamt für die Konzentrationsbestimmungen verwendet. 3 Tiere erhielten eine ANP-Dosis von 25 µg/min, 2 Tiere eine Dosis von 50 µg/min und 1 Tier 100 µg/min. Als Kontrolle dienten 3 Tiere, die keine Behandlung hatten sowie 3 Tiere, denen lediglich NaCl- Lösung infundiert wurde. Es wurden jeweils 4 Blutproben zu festgelegten Zeitpunkten abgenommen, an denen die Konzentrationsbestimmungen durchgeführt wurden.

Ziel war es herauszufinden, welche ANP-Menge appliziert werden muss, um über 20 Minuten die gleiche Konzentration zu erhalten, welche sich in den Versuchen an den isoliert perfundierten Rattenlebern als protektiv erwiesen hatte.

Nach Abschätzung der ungefähr benötigten ANP-Dosis um die gewünschte portalvenöse Konzentration zu erreichen wurden 6 Versuchstiere mit ANP behandelt. 3 Tiere erhielten eine Dosis von 25 µg/min, 2 Tiere eine Dosis von 50 µg/min und ein Tier 100 µg/min über jeweils 20 Minuten. Die jeweilige Dosis wurde über 20 Minuten kontinuierlich mit Hilfe eines Mikroperfusors (sp100i, WPI, USA) intravenös infundiert. Als Kontrolle zur Bestimmung der Basiskonzentration dienten 6 Tiere, von denen 3 keine Behandlung

erhielten und denen nur eine Blutprobe entnommen wurde. Die anderen 3 Tiere unterlagen demselben Versuchsablauf wie die ANP-Gruppen, erhielten aber nur eine volumengleiche Infusion mit NaCl-Lösung.

Die Messung der ANP-Plasmakonzentrationen wurde mittels Radioimmunoassay (RIA) analog der Methode von Arendt (Arendt RM, 1986; Gerbes AL, 1989) durchgeführt. Es wurde das polyklonale Antiserum Toni III verwendet, das gegen ein C-terminales und ein in der Ringstruktur lokalisiertes Epitop gerichtet ist. Die Plasmaproben wurden auf Adsorberharzsäulen (Amberlite XAD Adsorberharz, Serva, Heidelberg) aufgetragen und mit einer Mischung aus 55% Acetonitril-45% Essigsäure 0,1 M eluiert. Das Eluat wurde lyophilisiert und in Puffer zur Bestimmung im RIA aufgelöst.

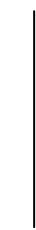
Im Rahmen des therapeutischen Ansatzes wurde dann die ANP-Dosierung mit 25 µg/min über 20 Minuten verabreicht, so dass es sich um insgesamt 2 Versuchsgruppen handelt (Abb. 3):

**Transplantierte  
Kontrollgruppe**

[=LTX Ko]

(n=7)

kein  
ANP



IVM  
Labor  
Histologie

**ANP - Behandlung  
der Spendertiere**

[=LTX ANP]

(n=5)

ANP  
(25 µg/min)



IVM  
Labor  
Histologie

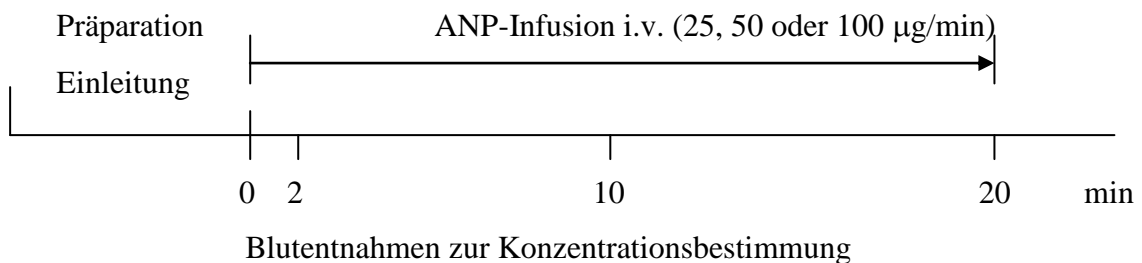
**Abb. 3:** 12 Tiere wurden transplantiert. 5 Spendertiere wurden mit ANP behandelt. Als Kontrolle dienten 7 Tiere, die keine spezifische Behandlung erhalten hatten. Die Untersuchung bestand aus intravitaler Fluoreszenzmikroskopie (IVM), laborchemischen Untersuchungen sowie lichtmikroskopischen Analysen.

Bei der Therapiegruppe wurde den Spendertieren über 20 Minuten unmittelbar bis zu Beginn der UW-Perfusion ANP, welches in steriler 0,9% NaCl-Lösung gelöst war, intravenös verabreicht. Sowohl die Infusionsspritze als auch der Infusionsschlauch waren mit Human-Albumin 5 % „gecoated“, um eine Adhärenz des ANP an der Oberfläche des Schlauchsystems zu verhindern. 5 Spendertiere erhielten ANP in einer Dosierung von 25 µg/min.

Die Kontrollgruppe mit unbehandelten Spender- und Empfängertieren bestand aus 7 Tieren. Die durchgeführten Untersuchungen sowohl der Kontrollgruppe als auch der Interventionsgruppen beinhaltete die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der sinusoidalen Perfusion und Leukozytenadhärenz, die Entnahme von arteriellen und venösen Blutproben für laborchemische Untersuchungen sowie die Gallesammlung während der Reperfusionzeit. Nach Abschluß einer zweistündigen Reperfusionphase wurden die Versuche mit der Entnahme von Lebergewebe für lichtmikroskopische Analysen beendet.

### 3. Experimentelles Protokoll

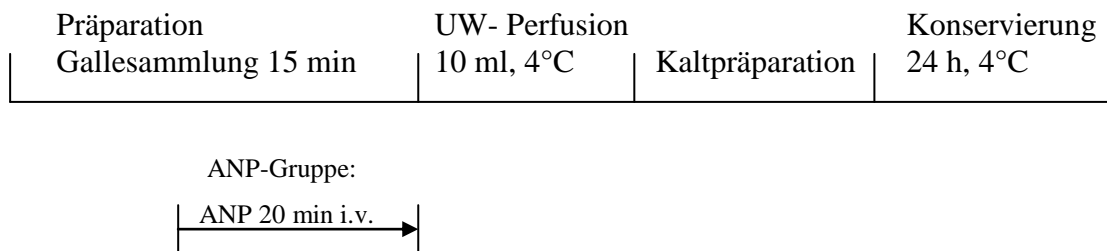
Bei der Studie zur ANP-Dosisfindung wurde den Versuchstieren nach Einleitung der Narkose, Platzierung des arteriellen und des venösen Katheters sowie Freilegung der Pfortader über 20 Minuten die jeweilige ANP-Dosis mit Hilfe eines Mikroperfusors intravenös verabreicht. Zu Beginn sowie 2, 10 und 20 Minuten nach Start der Infusion wurde den Tieren portalvenös und arteriell Blut abgenommen und das entnommene Volumen durch 0,9 % NaCl-Lösung substituiert (Abb. 5).



**Abb. 4:** Experimentelle Vorgehensweise bei den Versuchstieren zur Dosisfindung. Während der zwanzigminütigen ANP-Infusion erfolgten die portalvenösen sowie arteriellen Blutentnahmen zu den festgelegten Zeitpunkten.

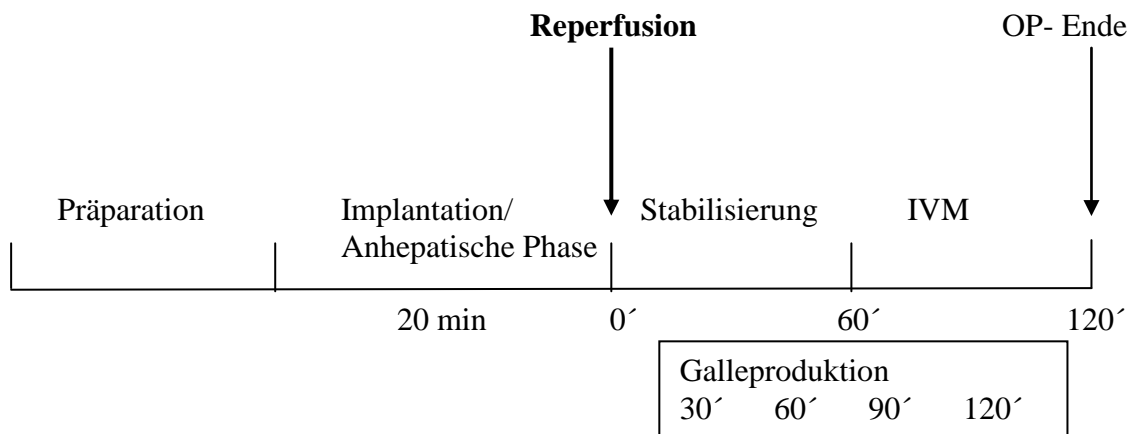


In den Transplantationsgruppen wurde abgesehen von der Spendervorbehandlung in der Therapiegruppe jeweils nach identischem experimentellem Protokoll operiert, überwacht und untersucht. Die Einleitung verlief wie bei den Versuchsgruppen der Dosisfindung. Bei den Spendertieren wurde während der Präparation nach Kanülierung des Ductus choledochus über einen Zeitraum von 15 Minuten die Galle gesammelt und für die Auswertung in  $\mu\text{g}$  Galle/min/g Leberfeuchtgewicht (LFG) angegeben. Kurz vor Beginn der UW-Perfusion wurde eine Heparinisierung mit 200 I.E. i.v. durchgeführt. Nach Hepatektomie wurde die Leber gewogen, anschließend erfolgte die Kaltpräparation und Konservierung in 50 ml UW-Lösung bei  $4^\circ\text{C}$ . Bei den behandelten Tieren wurde 20 Minuten vor Perfusionsbeginn die ANP-Infusion in der schon angegebenen Dosierung gestartet (Abb. 5).



**Abb. 5:** Experimentelle Vorgehensweise bei den Spendertieren, welche alle nach identischem experimentellem Protokoll operiert wurden. In der ANP-Gruppe wurde über 20 Minuten bis UW-Perfusionsbeginn ANP infundiert.

Bei den Empfängertieren wurde die Spenderleber kurz vor der Implantation mit 10 ml kalter Ringerlösung ausgespült. Nach der Reperfusion wurde bis Versuchsende, also über zwei Stunden, in 30-minütigen Abständen die Galleproduktion quantifiziert. Mit der Intravitalmikroskopie wurde nach einer ca. einstündigen Stabilisierungsphase des Empfängertieres begonnen. Während der Reperusionsphase wurden mehrere Blutgasanalysen durchgeführt und gegen Versuchsende erfolgten die Blutabnahmen für laborchemische Untersuchungen. Nach 120 Minuten Reperfusion wurden die Versuche mit der Entnahme von Lebergewebe für die lichtmikroskopischen Analysen beendet (Abb. 6).



**Abb. 6:** Experimentelle Vorgehensweise bei den Empfängertieren. Alle Empfängertiere wurden nach identischem experimentellem Protokoll operiert. Während der Reperfusionsphase wurde die Galleproduktion gemessen. Am Versuchsende erfolgten die Blutabnahmen und anschließend die Gewebeentnahmen.

## 4. Präparation

### 4.1 Anästhesie und Monitoring

Die Tiere aller Versuchsgruppen wurden nach präoperativer 12-stündiger Nahrungskarenz aber freiem Zugang zu Wasser im durchsichtigen Glas-Äthertopf (Äther für Narkose, Fa. Hoechst, Frankfurt) unter ständiger Kontrolle des Atmungs- und Bewegungsverhaltens narkotisiert. Anschließend subkutane Injektion von Atropinsulfat ( 0,2 mg/kg KG) zur Reduktion der narkosebedingten Hypersekretion und Prophylaxe eines Laryngospasmus. Nach Wiegen des Tieres folgte die Rasur des Bauchfells sowie des Halsbereiches. Zur Operation, die unter sauberen, aber nicht sterilen Bedingungen stattfand, wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Operationsplatte mit integriertem Heizteil (Fa. Effenberger, München) unter Verwendung speziell gefertigter Haltemagneten atraumatisch an den Extremitäten fixiert. Zur kontinuierlichen Messung der Körperkerntemperatur wurde rektal ein Thermometer eingeführt und durch Regulation der Heizplatte somit die Körpertemperatur während der Operation konstant zwischen 35,5° C und 37° C gehalten. Für die Narkose wurde ein offenes System gewählt mit Verwendung einer Atemmaske, die eine äthergetränkte Kompresse enthielt. Durch eine an die Maske angeschlossene, mit Äther gefüllte Spritze wurde nach Bedarf Narkosemittel nachgegeben. Die optimale

Oxygenierung der spontan atmenden Tiere wurde durch eine zusätzlich vor dem Kopf liegende Sauerstoffleitung mit einem Fluss von 1-2 l O<sub>2</sub> /min gewährleistet.

Nach Applikation der Äthermaske erfolgte die Einlage eines Polyethylenverweilkatheters (PE 50, Außen-/Innendurchmesser 0,96/0,58 mm, Fa. Portex, Hythe, England) in die linke Arteria carotis communis unter Verwendung eines Operationsmikroskops (M650, Fa. Wild, Heerbrugg, Schweiz). Dieser Katheter ermöglichte das kontinuierliche intraoperative Monitoring des mittleren arteriellen Druckes (MAP) und der Herzfrequenz sowie die Entnahme von arteriellen Blutgasproben. Der arterielle Mitteldruck wurde auf einen Druckwandler (DTX Plus, Becton Dickinson) übertragen und von einem nachgeschalteten Elektromanometer (Press.Ampl. 863 E154E, Siemens Medizinische Technik, München) digital angezeigt. Zur intravenösen Verabreichung von Pharmaka und Farbstoffen wurde ein weiterer Katheter (PE 50, Außen-/Innendurchmesser 0,80/0,40 mm) in die linke Vena iugularis interna gelegt. Die perioperative Infusionstherapie wurde mit steriler Vollelektrolytlösung (Tutofusin, Baxter, Unterschleißheim) und Human-Albumin Infusionslösung 5 % (Centeon Pharma GmbH, Marburg) entsprechend dem jeweiligen Blutverlust und Blutdruck durchgeführt. Durch mehrmalige intraoperative Durchführung von arteriellen Blutgasanalysen (pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pH, Standard Base Excess etc.) konnte der Säure-Basen-Haushalt der Tiere kontrolliert und bei Bedarf eine azidotische Stoffwechsellage durch Gabe von NaHCO<sub>3</sub> (Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4%, Fa. Delta-Pharm, Pfullingen) korrigiert werden. Durch die kontinuierliche Infusion von Vollelektrolytlösung (Tutofusin) über beide Katheter mit jeweils 2 ml/h wurden diese offen gehalten sowie der Laparotomie-bedingte Volumenverlust ausgeglichen.

#### **4.2 Operatives Vorgehen bei der ANP - Dosisfindung**

Die einzelnen Schritte der Präparation bei den Versuchsgruppen zur Dosisfindung waren folgende:

- Kanülierung der linken Arteria carotis communis und Vena jugularis interna.
- Quere Laparotomie, Einsetzen speziell entwickelter Hakenretraktoren mit Magnetfuß im Bereich beider Rippenbögen zur besseren Exposition des Operationssitus.

- Mobilisation und Hochklappen der Leber, Auslagerung des Darmes.
- Zum Schutz vor Austrocknung wurde die Leber mit Frischhaltefolie bedeckt, der Darm in eine feuchte Kompresse gehüllt und zusätzlich mit Frischhaltefolie bedeckt.
- Die Blutentnahmen erfolgten arteriell über den Katheter in der Arteria carotis communis, portalvenös über Punktion mit einer 1 ml Spritze zu den vorgegebenen Zeiten.
- Nach der letzten Abnahme wurden die Versuchstiere durch eine Ätherüberdosis und durch Entbluten mittels Schnitt durch die Vena cava inferior getötet.

Der Eingriff zur Bestimmung der ANP-Basiskonzentration bei der Ratte ohne Operationstrauma wurde in einer Gruppe im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen ohne vorherige Narkose durchgeführt. Sofort nach Entnahme des Versuchstieres aus seinem Käfig wurde ihm ein letales Schädelhirntrauma zugefügt, anschließend das Abdomen mit einer Schere eröffnet und über Punktion der suprahepatischen Vena cava inferior die Blutprobe gewonnen.

#### **4.3 Operatives Vorgehen beim Spender und Konservierung der explantierten Leber**

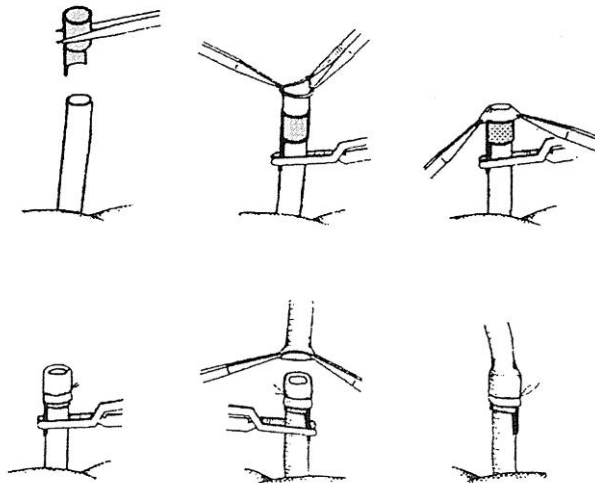
Entsprechend der Präparation der Versuchstiere zur ANP-Dosisfindung erfolgten die Kanülierung der linksseitigen Halsgefäße, die quere Laparotomie und das Einsetzen der Hakenretractoren bei den Spendern. Die anschließenden Schritte sind der Reihe nach aufgeführt:

- Mobilisation der Leber mit Durchtrennung aller ligamentärer Verbindungen und Koagulation einer regelhaft zwischen dem Ösophagus und dem linken Leberlappen verlaufenden Arterie sowie der Vena diaphragmatica und der rechten Vena suprarenalis.
- Die Leber wurde während des weiteren Operationsvorganges solange wie möglich mit Frischhaltefolie bedeckt, um sie vor Austrocknung zu schützen.

- Zur Erleichterung der Präparation wurde der Darm nach Mobilisation des Duodenums ausgelagert und zum Schutz vor Austrocknung in eine feuchte Kompresse sowie zusätzlich noch in Frischhaltefolie eingehüllt.
- Präparation des Ductus choledochus, distale Ligatur und Kanülierung mit einem Polyethylenkatheter (PE 50, Außen-/Innendurchmesser 0,80/ 0,40 mm, Fa. Portex, England); anschließend proximale Ligatur zur Sicherung des Katheters. Messung der basalen Gallesekretion während der weiteren Präparation über 15 Minuten. Der Gallengangskatheter verblieb während der Konservierung und bis Ende des Versuchs.
- Stumpfe Präparation der infrahepatischen Aorta und Vena cava inferior, sowie Präparation des Truncus coeliacus bis zu seinem Abgang.
- Minimalpräparation der Pfortader mit Darstellung der Vena lienalis sowie der Vena mesenterica inferior, anschliessend doppelte Ligatur und Durchtrennung der Vena coronaria ventriculi.
- Doppelte Ligatur und Durchtrennung der Arteria gastroduodenalis an ihrem Abgang von der Arteria hepatica.
- Systemische Heparinisierung über die Vena jugularis interna (200 IE).
- Distale Ligatur und retrograde Kanülierung der infrarenalen Aorta mit einer 18G Venenverweilkanüle (Durchmesser 1,3/ 0,9 mm, Fa. Abbott, Wiesbaden), Sicherung dieses Perfusionskatheters durch eine proximale Ligatur.
- Ligatur der rechten Vena renalis.
- Beginn der retrograden Perfusion der abdominalen Organe mit 4°C kalter University of Wisconsin (UW) Lösung (Fa. ViaSpan® Du Pont de Nemours, Bad Homburg) mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 100 ml/h über 10 Minuten.
- Unmittelbar nach Perfusionsstart wurde die Aorta abdominalis proximal des Truncus coeliacus abgeklemmt und anschließend die infrahepatische Vena cava inferior auf Höhe der linken Nierenvene durchtrennt.
- Während der Perfusion wurde die Leber mit 4° C kalter isotoner Lösung gekühlt
- Nach Abschluß der Perfusion erfolgte die Explantation der Leber.
- Durchtrennung der suprahepatischen Vena cava inferior am Zwerchfelleintritt, der rechten Nierenvene sowie möglichst leberfernes Absetzen der Pfortader.
- Exzision des Truncus coeliacus unter Mitnahme eines aortalen Segmentes.

Die Lebern wurden anschließend gewogen und dann für die Kaltpräparation in eine Schale mit 4°C kalter UW-Lösung gelegt. Diese Schale wiederum wurde in ein mit Eis angefülltes Behältnis gebettet, um so eine schnelle Erwärmung zu verhindern.

An der Pfortader wurden meist zwei weitere Zuflüsse ligiert, um für die Transplantation eine ausreichende Länge des Gefäßes zu erhalten. Auf arterieller Seite erfolgte die Ligatur der Gefäßstümpfe der Arteria lienalis sowie der Arteria gastrica sinistra. Das entnommene Aortensegment wurde zu einem Patch zurechtgeschnitten. An die suprahepatische Vena cava inferior wurden zwei Eckfäden (8-0 Prolene) für die Anastomose befestigt. Zur Vorbereitung der Anastomosierung der infrahepatischen Vena cava inferior sowie der Pfortader wurden diese nach der „Cuff-Technik“ von Steffen et al. (1989) präpariert. Die Cuffs wurden durch Zuschneiden einer Venenverweilkanüle (Größe 13 G für die Vena cava, 14 G für die Pfortader, Fa. Abbott, Wiesbaden) zu einem wenige Millimeter großen Ring, mit exzentrischer Verlängerung als Haltehilfe, hergestellt. Die Gefäße wurden dann durch den jeweiligen Cuff hindurchgezogen, nach außen umgestülpt und anschließend mit einer zirkulären Ligatur fixiert (104) (Abb. 7).



**Abb. 7:** Prinzip der nahtfreien Gefäßanastomose in der „Cuff“- Technik nach Steffen et al. (1989)

Die Lagerung der präparierten Leber erfolgte in einem verschlossenem, mit 50 ml UW-Lösung gefüllten Gefäß, das über 24 Stunden bis unmittelbar vor Ausspülung und Implantation in einem temperaturkontrolliertem Kühlschrank bei konstant 4° C

aufbewahrt wurde. Die für die Perfusion und Lagerung verwendete UW-Lösung (ViaSpan®) hatte folgende Zusammensetzung (auf 1000 ml): 100 mmol Kaliumhydrogenphosphat, 5 mmol Magnesiumsulfat, 100 mmol Kaliumlactobionat, 1 mmol Allopurinol, 3 mmol Glutathion, 5 mmol Adenosin, 30 mmol Raffinose, 50 g Hydroxyethylstärke.

#### **4.4 Operatives Vorgehen beim Empfänger**

Die Kanülierung der Halsgefäße, die quere Laparatomie, die Mobilisation der Leber sowie die Koagulation und Durchtrennung der zwischen Ösophagus und linkem Leberlappen gelegenen Arterie, der Vena suprarenalis dextra und der Vena diaphragmatica sinistra erfolgten identisch zum Vorgehen beim Spender (s.o.). Die für den Empfänger bzw. die Implantation spezifischen Eingriffe wurden folgendermaßen durchgeführt:

- Hilusnahe Koagulation und Durchtrennung des Ductus choledochus.
- Präparation der Pfortader bis zu ihrer Aufzweigung im Leberhilus.
- Präparation der infrahepatischen Vena cava inferior bis zur Einmündung der rechten Nierenvene
- Präparation der suprahepatischen Vena cava inferior, um eine sicheres Abklemmen zu ermöglichen.
- Zuletzt Darstellung, doppelte Ligatur und Durchtrennung der Arteria hepatica propria sowie der Arteria gastroduodenalis. Nach Abklemmen der Arteria hepatica communis mittels Microclip Längsinzision ihrer Aufgabelung in Arteria hepatica propria und Arteria gastroduodenalis. Anschließend wurde ein ca. 10 mm langes Stück eines Polyethylenverweilkatheters (PE 50) in das Lumen eingeführt und leicht herausstehend durch eine zirkuläre Ligatur fixiert. Die Arteria hepatica communis blieb bis zum Zeitpunkt der Reperfusion durch den Clip verschlossen.
- Um vor der Implantation die kaliumreiche UW-Lösung aus der Spenderleber zu spülen wurden über die Pfortader 10 ml kalte Ringer-Lösung (Delta-Pharma/Boehringer Ingelheim, Pfullingen) mit einem Druck von 10 cm H<sub>2</sub>O appliziert.

- Abklemmen der Pfortader sowie der infrahepatischen Vena cava durch Mikroclips und der suprahepatischen Vena cava inferior durch eine Satinsky-Klemme, anschließend Hepatektomie mit lebernahem Absetzen der Gefäße, um möglichst lange Gefäßstümpfe für die Implantation zu erhalten.
- Naht der suprahepatischen Vena cava-Anastomose mittels der bei der Kaltpräparation vorgelegten Eckfäden (8-0 Prolene).
- Nahtfreie Anastomosierung der Pfortader sowie der infrahepatischen Vena cava inferior mittels Cuff- Technik (s. Abb. 7).
- Überstreifen des Aortenpatches über das herausstehende Stück der Teflonverweilkanüle auf Seiten des Empfängers und Fixation durch Ligatur.
- Reperfusion des Transplantates: Lösen der Satinsky-Klemme von der suprahepatischen Vena cava inferior sowie der Mikroclips von Pfortader, Arteria hepatica communis und infrahepatischer Vena cava inferior .

Mit Beginn der anhepatischen Phase wurde die Äthermaske entfernt und dem Versuchstier die bereitliegende Sauerstoffleitung vor den Kopf gelegt (2 Liter Sauerstoff /Minute). Erst nach Reperfusion und wieder ansteigenden Blutdruck- und Pulswerten, welche als erste Anzeichen eines Nachlassens der Narkosetiefe durch wieder einsetzenden Abbau des noch im Blut physikalisch gelösten Äthers durch die transplantierte Leber zu werten sind, wurde die Narkosemaske wieder eingesetzt.

Aufgrund der erheblichen Sequestration intravasaler Flüssigkeit in das Interstitium während der Abklemmphase wurde kurz nach Reperfusion zur Kreislaufstabilisierung kristalline und kolloidale Flüssigkeit intravenös verabreicht: 1 - 2 ml Vollelektrolytlösung sowie max. 2 ml Humanalbuminlösung 5 %. Außerdem wurde die während dieser Phase entstandene metabolische Azidose, nach Bestimmung des Base Excess im Rahmen der arteriellen Blutgasanalyse, durch intravenöse Gabe von Natriumbicarbonat ausgeglichen.



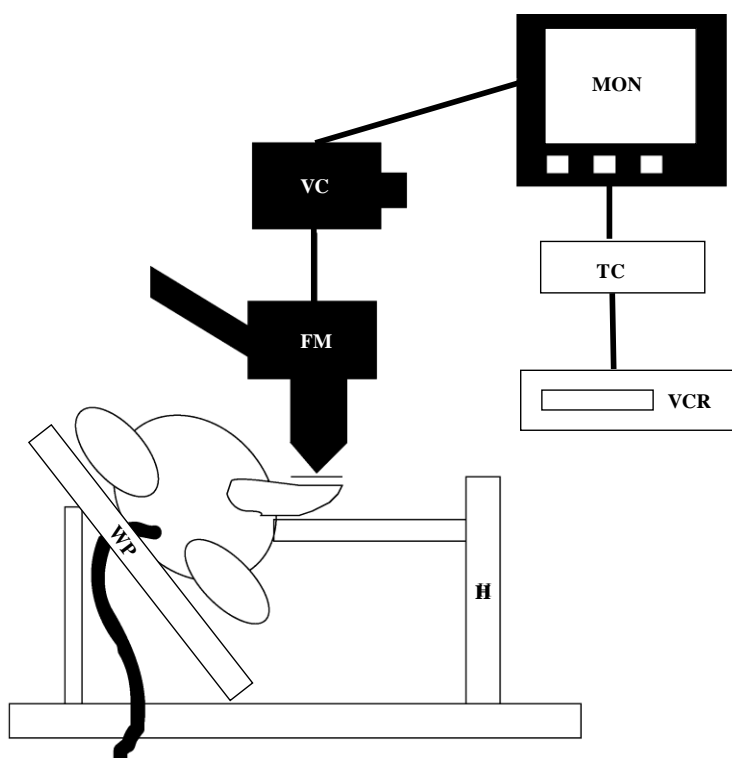
## 5. Parameter und Meßmethoden

### 5.1 Systemische Hämodynamik

Über einen Druckaufnehmer wurde kontinuierlich der arterielle Mitteldruck gemessen und auf einem Monitor als MAP in mmHg dargestellt. Anhand arterieller Blutentnahmen wurden  $p_aO_2$ ,  $p_aCO_2$ , Säure-Basen-Status, Lactat und Sauerstoffsättigung in einem Blutgasanalysator (860, Chiron Diagnostics) bestimmt.

### 5.2 Hepatische Mikrozirkulation

Mit Hilfe einer speziell dafür angefertigten Haltevorrichtung wurde der linke Leberlappen ausgelagert und mit einem runden Deckglas (Durchmesser 12 mm) vor Austrocknung geschützt. Der Halter bestand aus einem feinjustierbaren Schwenkarm mit einer 2 x 3 cm großen rechteckigen Grundplatte. Dieser Platte war eine ca. 1 cm dicke Schicht Modelliermasse aufgelagert, um sie dem ausgelagerten Leberlappen ideal anpassen zu können und so eine Gefäßobstruktion zu verhindern. Eine Stunde nach Reperfusion wurde unter weiterhin ständigem Monitoring aller Vitalparameter mit der Intravitalmikroskopie begonnen (Abb. 8).



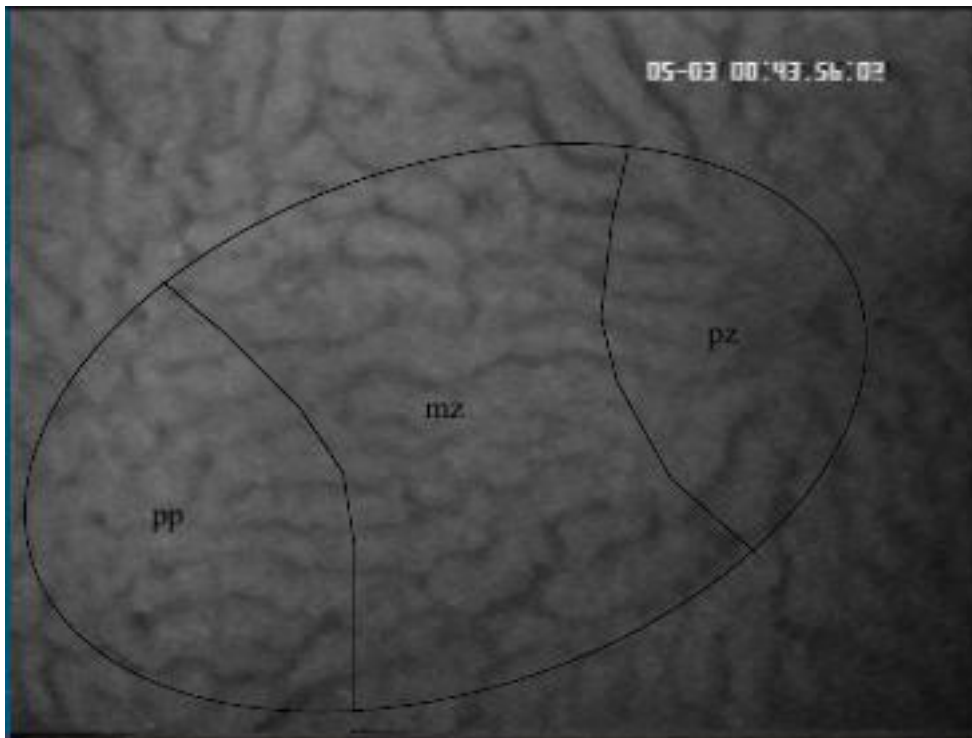
**Abb. 8:** Schematische Darstellung der Intravitalmikroskopie. Der linke Leberlappen des Versuchstieres wurde so aus dem Situs herausluxiert, dass die untere, ebenere Fläche oben lag und mikroskopiert werden konnte. Die übrigen Leberlappen verblieben in situ. WP= Wärmeplatte, H= Haltevorrichtung mit Schwenkarm, FM= Fluoreszenzmikroskop, VC= Videokamera, MON= Monitor, TC= Videozeitgenerator, VCR= Videorekorder

Für die Beurteilung der Perfusion in den Sinusoiden und den Venolen der Leber wurde den Tieren zur negativen Kontrastverstärkung unmittelbar vor Beginn der Mikroskopie Natrium-Fluoreszin (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) in einer Dosierung von 1  $\mu\text{mol/kg}$  intravenös verabreicht. Die leukozytären Blutelemente wurden durch intravenöse Injektion von Rhodamin-6 G-Phosphat (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) in einer Dosierung von 0,1  $\mu\text{mol/kg}$  angefärbt, um die Adhärenz in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen beurteilen zu können. Für die Intravitalmikroskopie wurde ein Leitz-Orthoplan Fluoreszenzmikroskop (Leitz, Wetzlar) mit einer Lichtquelle für die Auflichtbeleuchtung in Form einer 100 W Quecksilber Hochdrucklampe verwendet. Das Ploemo-Pak-Illuminatorsystem (Leitz, Wetzlar) war mit Filterblöcken des Typs I<sub>2/3</sub>, N<sub>2</sub> und L<sub>3</sub> bestückt. Das mit den Wellenlängen 450-490 nm für Natrium-Fluoreszin und 530-560 nm für Rhodamin angeregte und emittierte Licht wurde bei 525 nm bzw. 580 nm gefiltert.

Mit Hilfe einer CCD (charge coupled device)-Kamera (FK 6990, Prospective Measurement Inc., San Diego, CA, USA) wurden die intravitalmikroskopischen Bilder unter Einblendung eines Videozeitgenerators (VTG 33, For.A Company Ltd., Tokyo, Japan) auf Videoband aufgezeichnet. Für Übersichtsaufnahmen wurde als Objektiv ein Leitz Fluotar 10/0.30 (Vergrößerung/numerische Apertur) verwendet, zur Beurteilung der sinusoidalen Perfusion und der Leukozytenbewegungen das Wasserimmersionsobjektiv Fluotar 25/0.60 W, womit 280-fache bzw. 700-fache Vergrößerungen auf einem 330 mm Monitor (PVM 1442 QM, Sony, München) dargestellt werden konnten.

Für die spätere Auswertung wurden je 10 Azini und postsinusoidale Venolen aufgesucht und für jeweils 20 Sekunden aufgezeichnet. Die sinusoidale Perfusionsrate errechnet sich aus dem Quotienten aus den innerhalb des Azinus perfundierten Sinusoiden und allen dort sichtbaren Sinusoiden und wurde in Prozent angegeben. Bei

der Analyse der sinusoidalen Perfusion wurde die Aufgliederung der Azini in 3 Zonen berücksichtigt (Abb. 9).



**Abb. 9:** Intravitalmikroskopische Darstellung der hepatischen Mikrozirkulation. Die Schablone verdeutlicht die Aufteilung des Azinus in eine periportale (pp), midzonale (mz) und perizentrale (pz) Zone.

Neben der Perfusionsrate sind adhärenente Leukozyten in den Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen ein weiterer intravitalmikroskopischer Parameter für den Status der Mikrozirkulation der Leber. Es wurde die Anzahl der adhärenenten Leukozyten in einem Lobulus bestimmt und standardisiert als „Sticker/Lobulus“ (n/Lobulus) angegeben. Als sinusoidale Sticker wurden Leukozyten gewertet, die im Leberlobulus mindestens 20 Sekunden adhärenent waren. Die adhärenenten Leukozyten in den postsinusoidalen Venolen wurden quantifiziert, indem die Anzahl der Sticker auf  $\text{mm}^2$  Endothelfläche nach der Formel  $[\pi \times \text{Durchmesser} \times \text{Länge des Gefäßes}]$  berechnet und angegeben wurde (n/ $\text{mm}^2$ ).

## 5.3 Hepatozelluläre Integrität

### 5.3.1 Transaminasen

Als Parameter der hepatozellulären Integrität wurden die spezifischen Leberenzyme Glutamat-Oxalacetat (GOT) sowie Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) bestimmt. Die Blutproben wurden jeweils am Versuchsende, also nach 120 Minuten Reperfusion entnommen. Für die Bestimmungen wurde 1 ml arterielles Blut unter Verwendung eines EDTA-beschichteten Röhrchens entnommen. Nach Zentrifugation (Rotanda/K, Hettich, Tuttlingen) der Proben wurde das gewonnene Plasma bis zum Zeitpunkt der Bestimmung bei  $-80^{\circ}$  C eingefroren. Die Transaminasen wurden im Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der LMU München, bestimmt.

### 5.3.2 Lichtmikroskopie der Leber

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Leber wurde bei Versuchsende Gewebe aus allen Leberlappen entnommen und anschließend in PBS gepufferter Formalinlösung (4 %) gelagert. Die Proben wurden dann 30 Minuten lang fließend entwässert, 12 Stunden in Ethanol (70 %) aufbewahrt und anschließend mittels aufsteigender Ethanol-Reihe wieder entwässert. Daraufhin wurden sie in den Intermedien Methylbenzoat und Benzol für 4 Stunden inkubiert.

Nach Einlage in Paraffin für 24 Stunden erfolgte die Einbettung in Paraffin. Das Gewebe wurde mittels Schlittenmikrotom (Mod. Hn 40, Fa. Reichert-Jung/Leica, München) in 3  $\mu$ m dünne Schichten geschnitten, mit Hämatoxylin-Eosin (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt und anschließend auf Objektträgern fixiert. Die in dieser Arbeit vorgestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden am Fotomikroskop (Axiophot, Fa. Zeiss, Oberkochen) unter Verwendung verschiedener Rot- und Blaufilter bei 200- und 400-facher Vergrößerung. Die Begutachtung wurde von zwei unabhängigen Pathologen durchgeführt, ohne Kenntnis über die Zuordnung der Präparate zu den Versuchsgruppen.

## 5.4 Hepatozelluläre Funktion

Der Gallefluß gilt als guter Parameter der hepatozellulären Funktion (Sumimoto et al. 1988). Nach Implantation der Spenderleber wurde über den schon bei Explantation in den Ductus choledochus eingeführten Verweilkatheter die abfließende Galle gesammelt. Die Galleproduktion wurde in 30-minütigen Intervallen sowie die Gesamtmenge nach zwei Stunden Reperfusion gemessen und auf das Leberfeuchtgewicht (LFG) bezogen in  $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  LFG angegeben. Das Gewicht der Spenderleber wurde dazu bereits unmittelbar nach Explantation ermittelt.

## 6. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die Berechnung des Signifikanzniveaus erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Statistikprogramms SigmaStat (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA), die graphische Darstellung mit Microsoft Excel (Microsoft Corp., USA).

Mittelwerte zwischen 2 Gruppen wurden mit dem Student's t- Test und dem Mann Whitney U- Test verglichen. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

## C. ERGEBNISSE

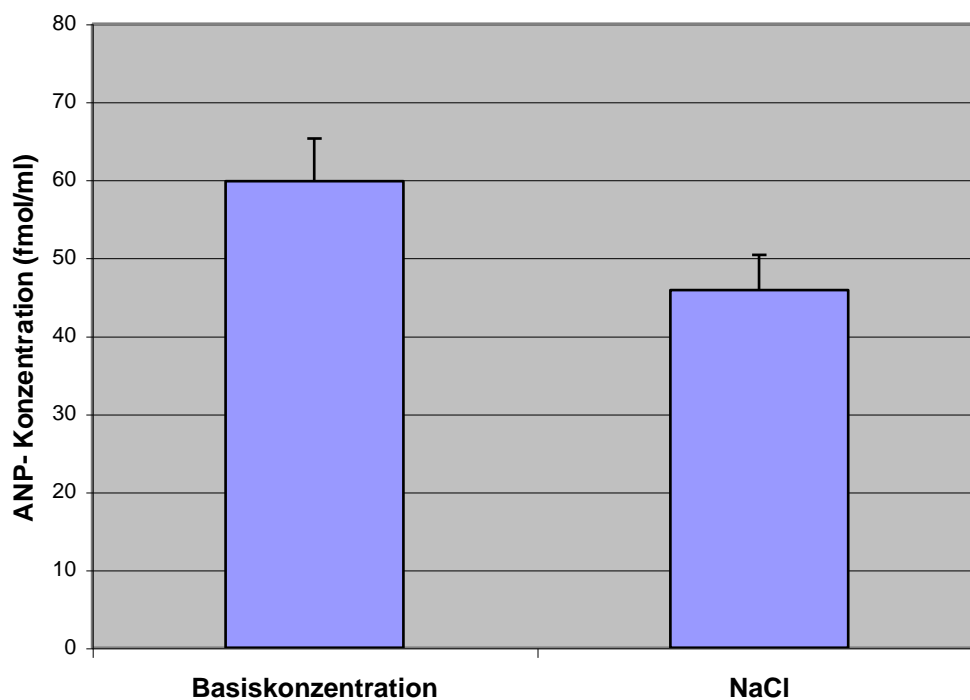
### *I. ANP- Konzentrationsbestimmungen*

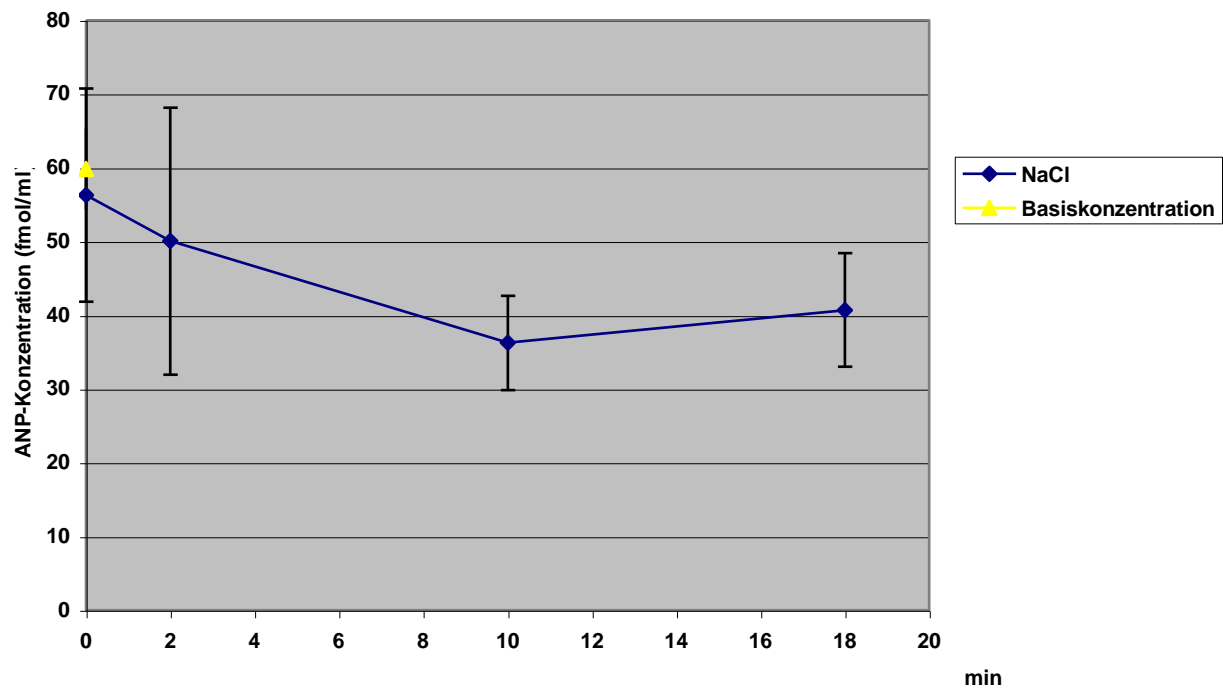
Im Folgenden sind die Ergebnisse der ANP-Dosisfindung sowie der Bestimmung der ANP- Basiskonzentration dargestellt.

#### **1. ANP- Basiskonzentration**

In der Versuchsgruppe mit nur einer Blutabnahme direkt nach Tötung der Tiere ergab sich eine ANP-Basiskonzentration von durchschnittlich  $59,8 \pm 5,5$  fmol/ml (Abb. 10 A). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in der Versuchsgruppe mit 20-minütiger Infusion von NaCl-Lösung, hier betrug die Basiskonzentration  $45,8 \pm 4,5$  fmol/ml (Mittelwert der Messungen über 20 Minuten). Die Werte blieben über die Infusionsdauer weitgehend konstant (Abb. 10 B).

**A**



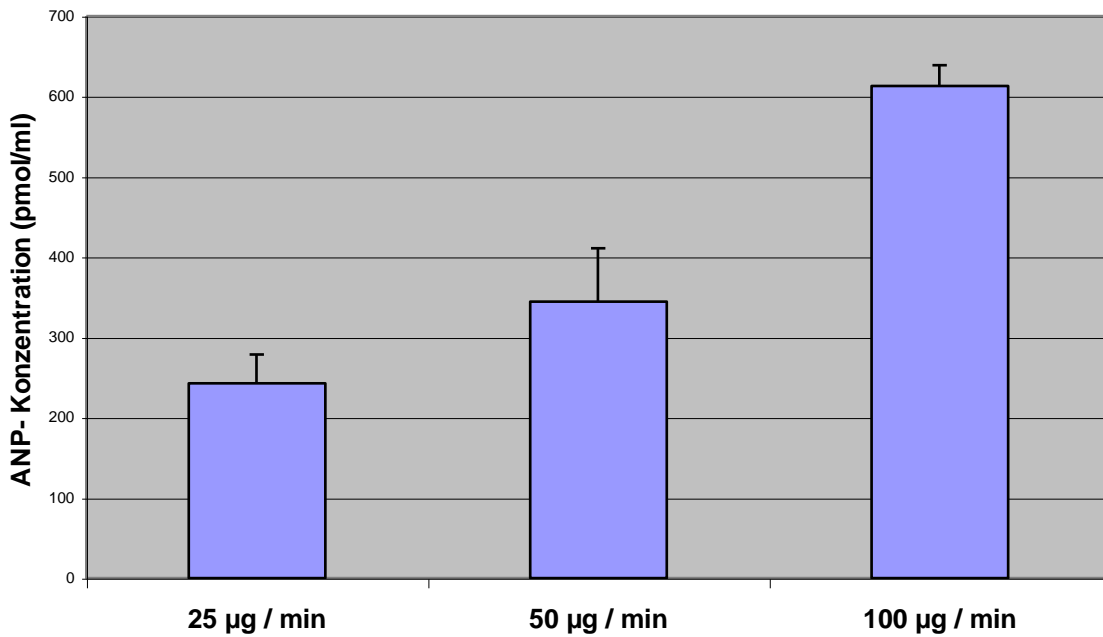
**B**

**Abb. 10:** Die gemessenen Konzentrationen in den Versuchsgruppen mit und ohne Infusion von NaCl-Lösung zur Bestimmung der ANP-Basiskonzentration ergaben keinen signifikanten Unterschied. Während der Infusion zeigten sich keine wesentlichen Konzentrationsänderungen.

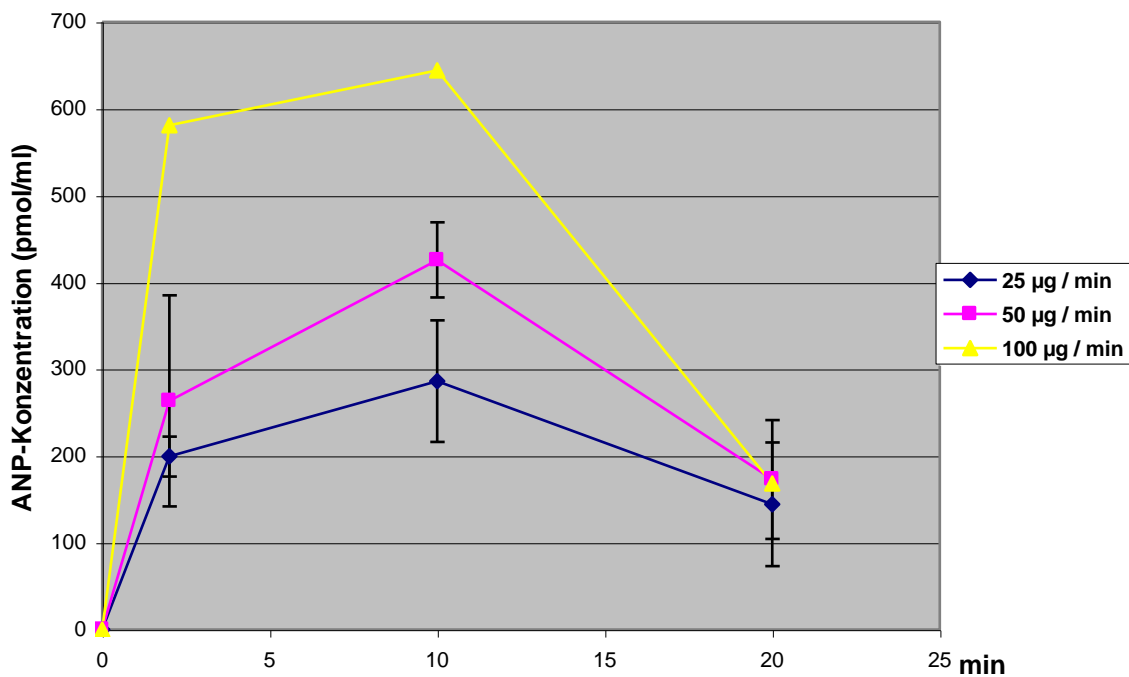
## 2. ANP- Dosisfindung

In der Gruppe mit einer ANP-Infusion von 25 µg/min über 20 Minuten ergab sich eine durchschnittliche ANP-Konzentration von  $243 \pm 35$  pmol/ml. Bei einer ANP-Gabe von 50 µg/min über 20 Minuten lag die Serumkonzentration bei  $344 \pm 66$  pmol/ml, bei einer Infusion mit 100 µg/min bei  $612 \pm 26$  pmol/ml. Die Durchschnittswerte wurden anhand der zu den Zeitpunkten 2 min und 10 min nach Infusionsbeginn gemessenen Konzentrationen errechnet, da die Blutabnahmen zum Zeitpunkt „20 min“ nach Stop der Infusion erfolgten und hier aufgrund der kurzen Halbwertszeit bereits ein deutlicher Konzentrationsabfall zu verzeichnen ist (Abb. 11).

A



B



**Abb. 11:** Serum ANP-Konzentration im Mittel (A) und Konzentrationsverlauf während der 20-minütigen ANP-Infusion (B). Bei einer intravenösen ANP-Infusion von 25 µg/min über 20 Minuten zeigte sich eine durchschnittliche Konzentration von  $243 \pm 35$  pmol/ml, in der Gruppe mit 50 µg/min von  $344 \pm 66$  pmol/ml, bei dem Versuch mit 100 µg/min von  $612 \pm 26$  pmol/ml. Nach Beenden der Infusion zeigt sich ein rascher Abfall des ANP-Spiegels.



## II. Einfluss der präischämischen ANP-Infusion auf den frühen IRS nach LTX

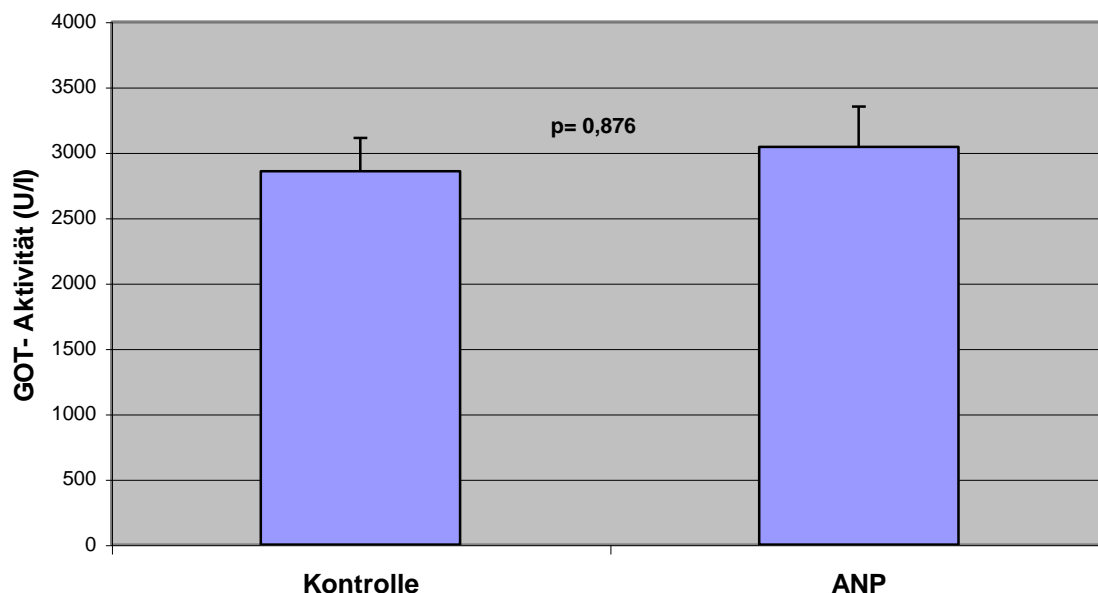
Im Folgenden sind die Ergebnisse der mit ANP behandelten Versuchgruppe jeweils im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt.

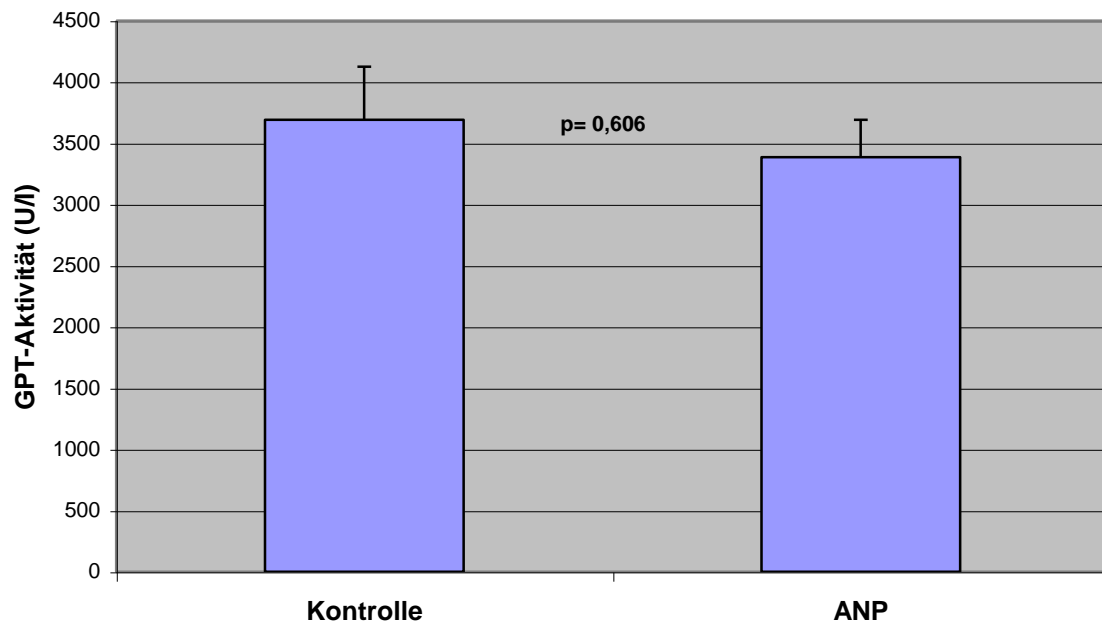
### 1. Hepatozelluläre Integrität

#### 1.1 Transaminasen

Die Messungen erfolgten am Ende der zweistündigen Reperfusionphase. In der unbehandelten transplantierten Kontrollgruppe ergab sich eine Aktivität der GOT von  $2854 \pm 256$  U/l, die Aktivität der GPT lag bei  $3691 \pm 432$  U/l. In der Gruppe mit den ANP behandelten Spendertieren zeigte sich eine GOT-Aktivität von  $3042 \pm 310$  U/l, die GPT lag bei  $3384 \pm 307$  U/l. Somit ist in der ANP-Gruppe eine geringe Erhöhung der GOT gegenüber der Kontrollgruppe zu verzeichnen (Abb. 12 A), die GPT (Abb. 12 B) ist jedoch tendenziell niedriger.

A



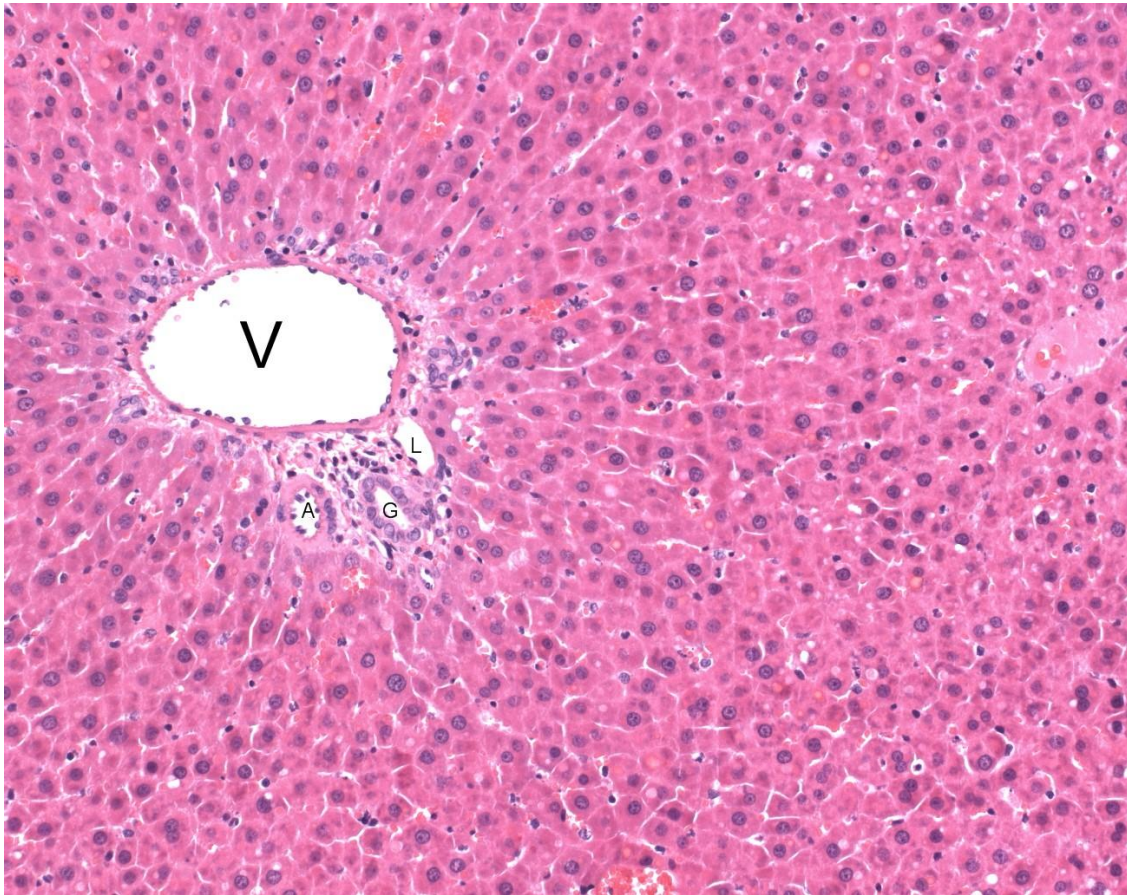
**B**

*Abb. 12: Serum GOT- (A) und GPT-Aktivität (B): Durch die Vorbehandlung der Spendertiere mit ANP konnten die Enzymaktivitäten nicht signifikant gesenkt werden.*

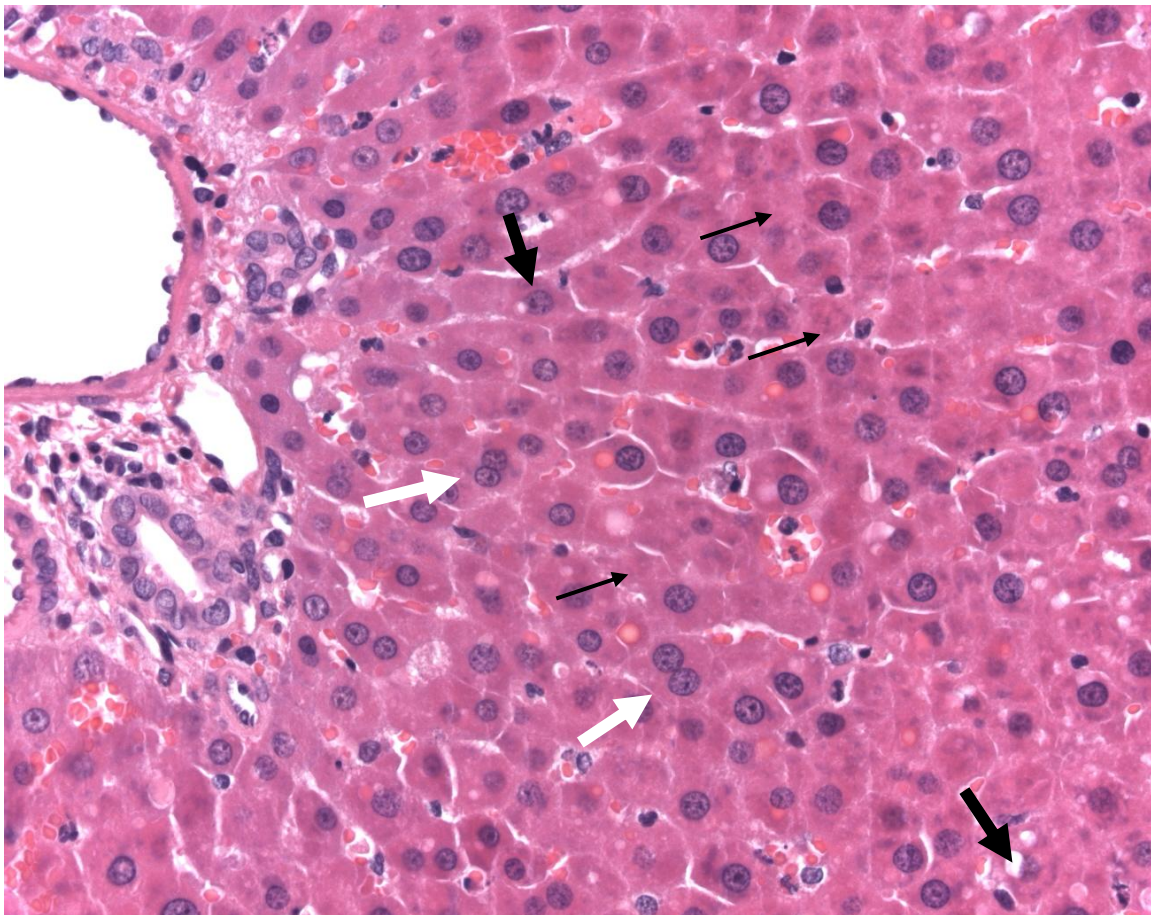
## 1.2 Lichtmikroskopische Befunde



Die am Versuchsende entnommenen Gewebeproben wurden in der Lichtmikroskopie nach folgenden Kriterien beurteilt: Verfettung, entzündliche Infiltration mit Granulozyten und Lymphozyten, Stauungszeichen sowie Zellnekrosen. Es konnten zwischen der Kontrollgruppe und der ANP-Gruppe keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 13).

**A**



**B**

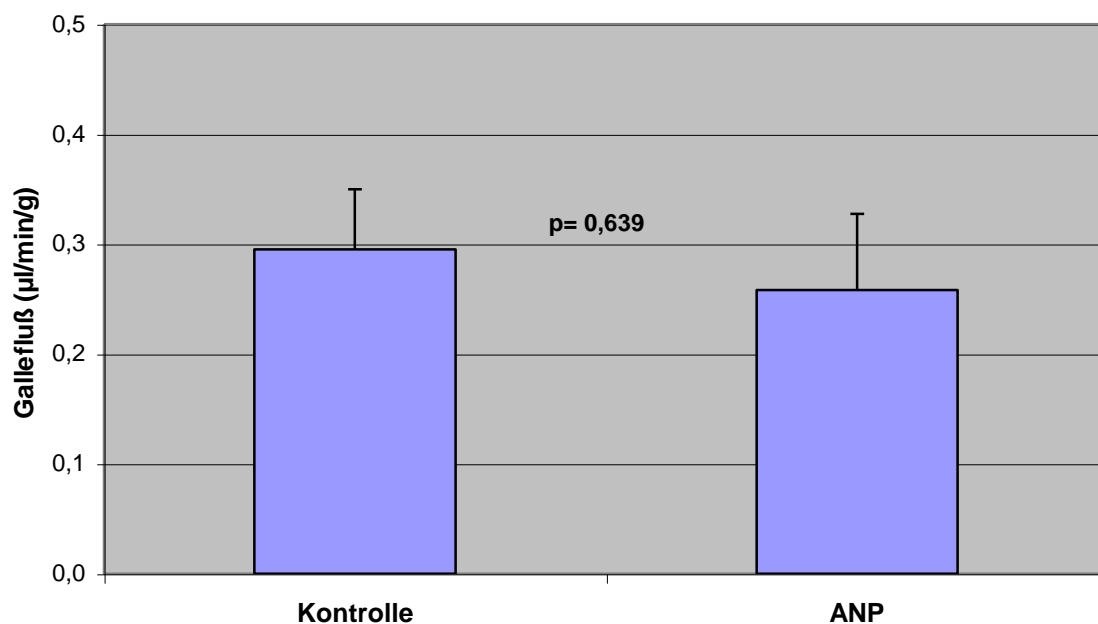


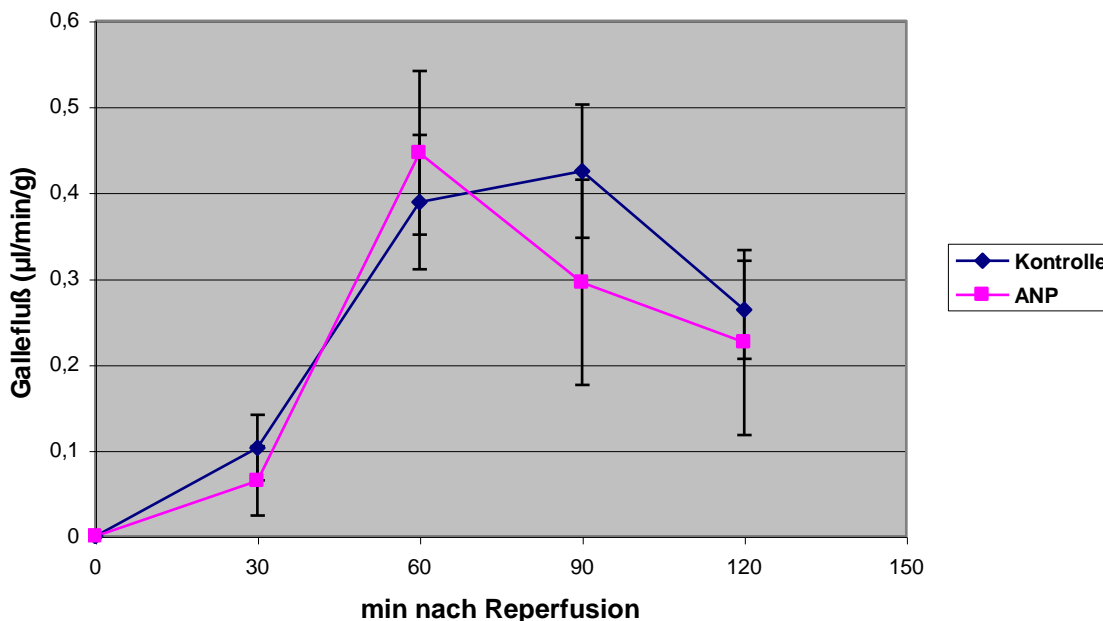
**Abb. 13:** Lichtmikroskopische Aufnahme einer Kontrolltier-Leber in 200- (A) und 400-facher (B) Vergrößerung (HE-Färbung). Es finden sich vereinzelt Fetteinlagerungen (  ) und Einzelzellnekrosen (  ). Als Regenerationszeichen weisen manche Hepatozyten zwei Zellkerne auf (weiße Pfeile). V= V. interlobularis, G= interlobulärer Gallengang, A= Ast der A. hepatica, L= Lymphgefäß

## 2. Hepatozelluläre Funktion

Der Gallefluß gilt als wichtiges Maß für die exkretorische Funktion der Leber und als Parameter für das Ausmaß des ischämischen Schadens (10). Der Gallefluß betrug in der Kontrollgruppe während der zweistündigen Reperfusionphase im Mittel  $0,295 \pm 0,055$   $\mu\text{l}$ /min/g LFG. Die mit ANP behandelten Spenderlebern produzierten nach Transplantation  $0,258 \pm 0,069$   $\mu\text{l}$ /min/g LFG und lagen damit geringfügig unter dem Wert der Kontrollgruppe (Abb. 14 A). Auch in der Dynamik des Galleflusses lassen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 14 B).

A



**B**

**Abb. 14:** Der durchschnittliche Gallefluß nach Transplantation ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe (A). Auch die Dynamik zeigte einen ähnlichen Verlauf in beiden Gruppen, nach zunächst stetigem Anstieg kommt es nach einer Stunde Reperfusion zu einer nahezu gleichbleibenden bzw. leicht abfallenden Galleproduktion (B).

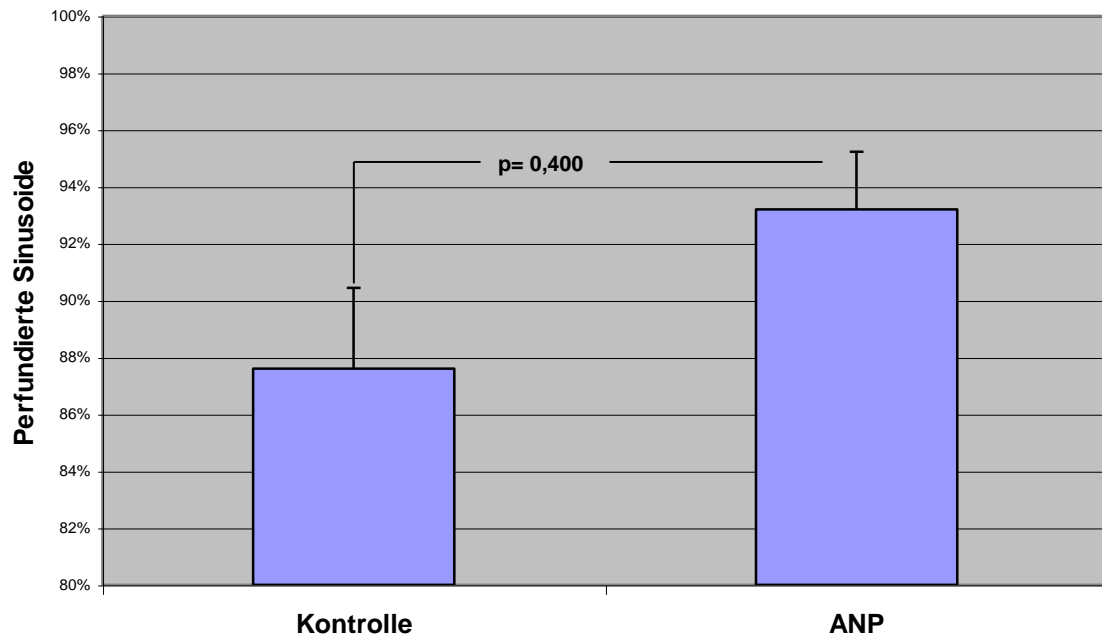
### 3. Hepatische Mikrozirkulation

#### 3.1 Sinusoidale Perfusionsrate nach ANP-Behandlung

Die sinusoidale Perfusionsrate diente als Maß für das Reperfusionsversagen in der frühen Phase nach Transplantation. Bei einer nicht ischämischen Leber beträgt sie ca. 98 - 100% (78).

In der unbehandelten Kontrollgruppe ergab sich eine Perfusionsrate von  $87,6 \pm 2,84\%$ , welche durch die ANP-Vorbehandlung der Spenderleber leicht gesteigert werden konnte. In der Versuchsgruppe betrug die sinusoidale Perfusionsrate  $93,2 \pm 2,03\%$  (Abb. 15).

A



B



**Abb. 15:** Durch Vorbehandlung der Spenderlebern mit ANP konnte die sinusoidale Perfusionsrate nach Transplantation nicht signifikant verbessert werden, es zeigt sich lediglich eine leichte Erhöhung der Perfusionsrate (A). Intravitalmikroskopische

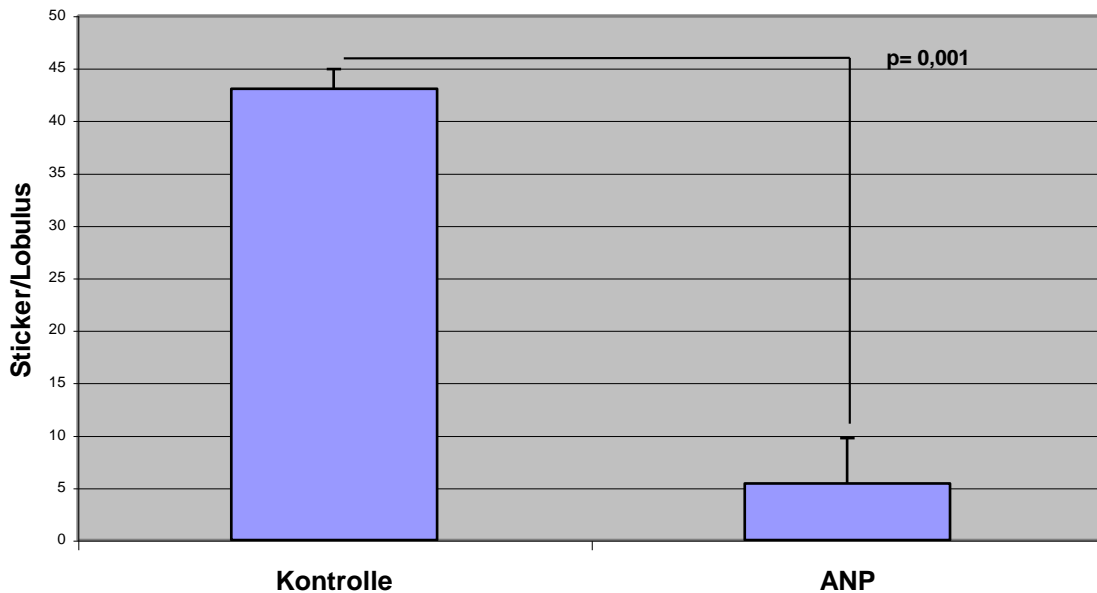
*Aufnahme (B): Mit den Pfeilen sind zwei nicht perfundierte Areale gekennzeichnet. Aufgrund der Übertragung der Videobilder auf den Computer entsteht leider ein deutlicher Qualitätsverlust, eine Identifizierung nicht perfundierter Areale ist selbstverständlich nur an der laufenden Aufnahme möglich.*

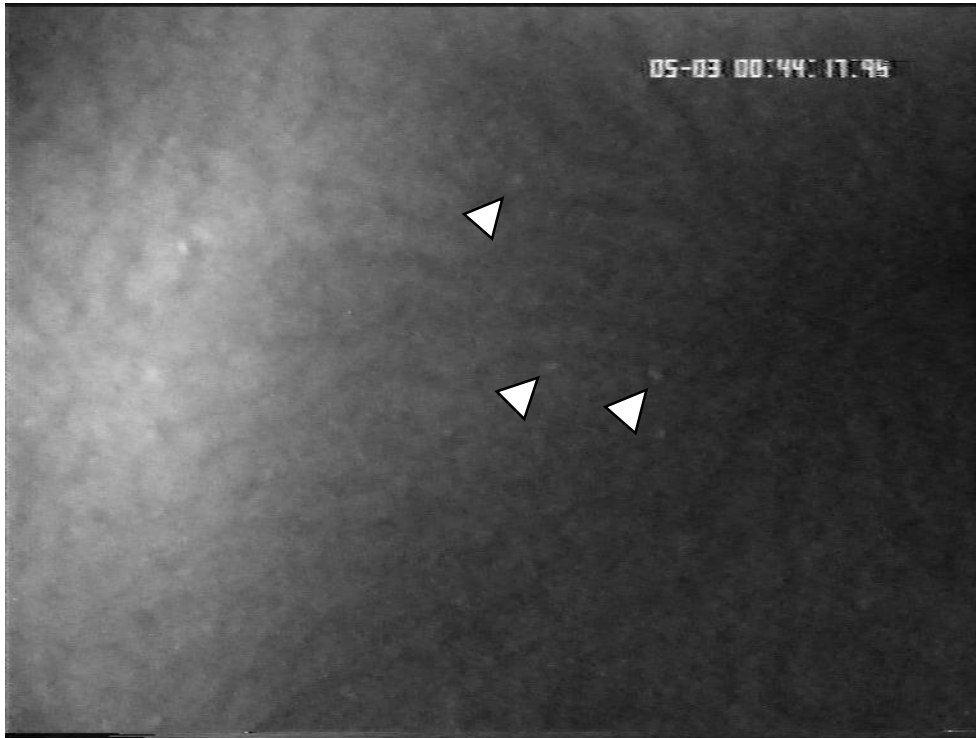
### 3.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion nach ANP-Behandlung

Bei der Entstehung von IRS ist die Leukozytenadhärenz an Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen von entscheidender Bedeutung (51;73;111).

Als sinusoidale Sticker wurden Leukozyten gewertet, die im Leberlobulus mindestens 20 Sekunden adhären waren. In der Kontrollgruppe ergaben sich  $43 \pm 2$  Sticker/Lobulus. In der ANP-Gruppe waren mit  $5 \pm 4$  Sticker/Lobulus signifikant weniger zu beobachten ( $p=0,001$ ) (Abb. 16).

**A**



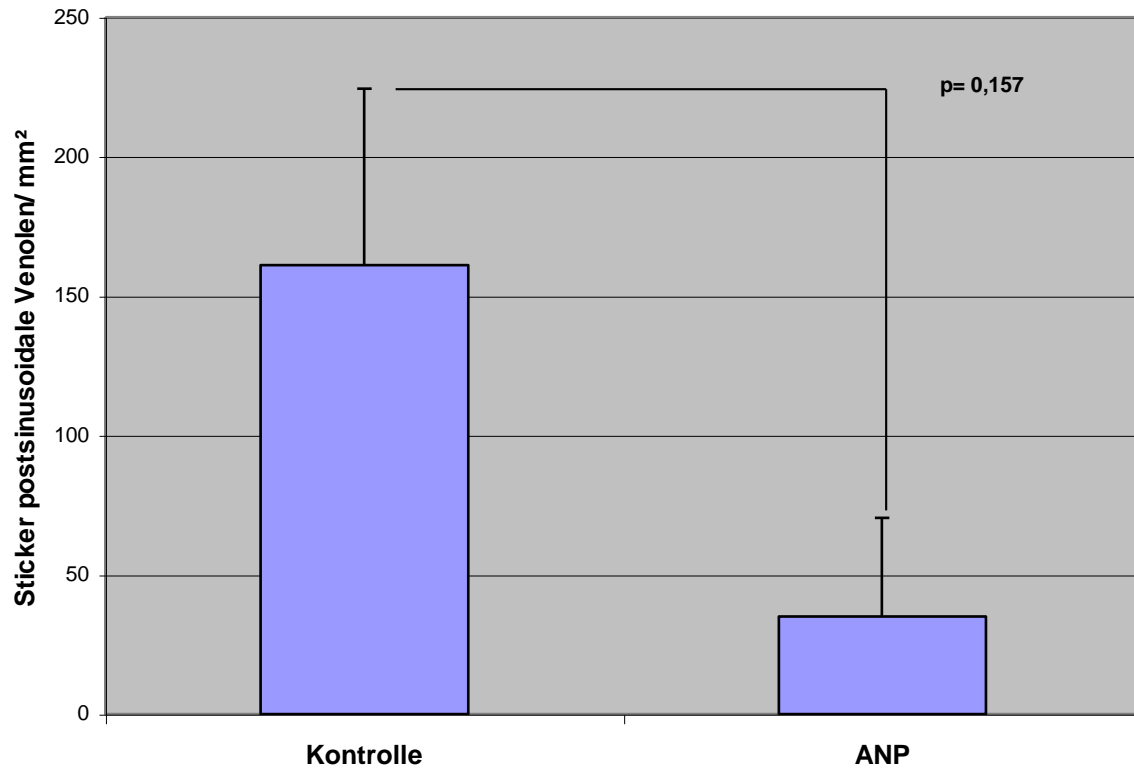
**B**

**Abb. 16:** *Durch die Vorbehandlung der Spenderlebern mit ANP konnte die Anzahl der sinusoidalen Sticker in den Lobuli im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesenkt werden (A). Beispiel einer IVM eines Kontrolltieres (B), einige Sticker sind markiert (weiße Pfeile).*

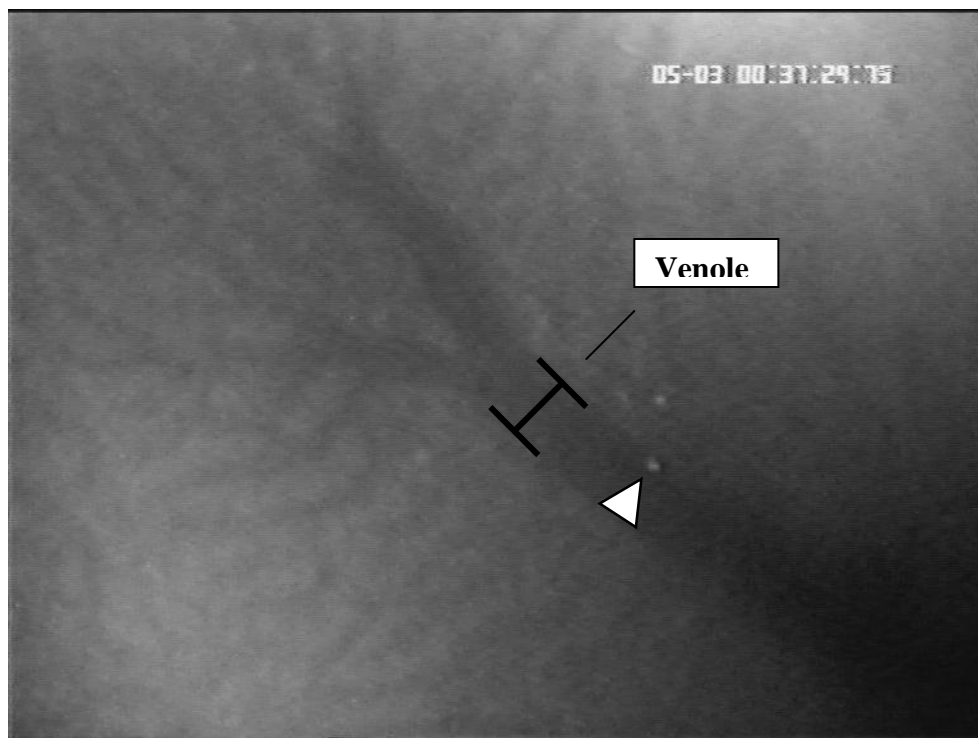
Auch die Zahl der Sticker in postsinusoidalen Venolen fiel in der ANP-Gruppe niedriger aus, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Während in der Kontrollgruppe durchschnittlich  $161 \pm 63$  Sticker/  $\text{mm}^2$  Endotheloberfläche auftraten, zeigten sich in der mit ANP behandelten Versuchsgruppe nur  $35 \pm 35$  Sticker (Abb. 17).



A



B



**Abb. 17:** Leukozytenadhärenz in postsinusoidalen Venolen: Durch die ANP-Infusion vor Explantation der Spenderleber konnte die Anzahl der Sticker in postsinusoidalen Venolen nach Reperfusion nicht signifikant verringert werden (A). Intravitalmikroskopische Aufnahme einer postsinusoidalen Venole, der Pfeil markiert einen Sticker (B).

## **D. DISKUSSION**

### **1. Modelle**

#### **1.1 Lebertransplantation bei der Ratte**

Zur Beantwortung der Frage, ob die zytoprotektiven Effekte des ANP auch in vivo nachvollziehbar sind, wurde in dieser Arbeit das Modell der orthotopen Lebertransplantation mit Rekonstruktion der arteriellen Strombahn gewählt.

Das Modell der Rattenlebertransplantation wurde erstmals 1973 publiziert (65). Seitdem gab es immer wieder verschiedene Modifikationen, insbesondere in der Durchführung der Gefäßanastomosen. Durchgesetzt hat sich die sogenannte Cuff-Technik, die eine relativ zügige Anastomosierung der V. cava inferior, der Pfortader und der A. hepatica ermöglicht (54). In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Anastomosierung der A. hepatica, wie im zweiten Teil beschrieben, etwas modifiziert, da diese Anastomose so noch zuverlässiger gelang. Die Notwendigkeit der zügigen Herstellung der Gefäßanastomosen ergibt sich daraus, dass ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Dauer der portalvenösen Stase und dem Überleben der Tiere besteht (116).

In manchen Arbeitsgruppen wird auf die Anastomose der A. hepatica verzichtet, mit der Begründung, dass sie auf die initiale Transplantatfunktion und das kurz- bis mittelfristige Überleben keinen entscheidenden Einfluss habe (55). Andere hingegen postulieren, dass arterialisierte Transplantatlebern verglichen mit nur portal perfundierten Transplantaten eine schnellere Erholung der Leberfunktion sowie histologisch geringere Schäden zeigen. Ebenso sei die postoperative Überlebensrate höher und die Komplikationen an den extra- und intrahepatischen Gallengängen seltener (104). Besonders hinsichtlich der Mikrozirkulation scheint die Rearterialisierung wichtiger Bestandteil eines physiologisch relevanten Transplantationsmodells, da ansonsten die Interpretation experimenteller Daten durch unspezifische Veränderungen aufgrund der arteriellen Ischämie erschwert wird (27;87).

Eine Beeinträchtigung der Ergebnisse durch Abstoßungsreaktionen wurde durch die Wahl eines syngenens Transplantationsmodells umgangen. Es wurden Lewis Ratten verwendet, da aufgrund der Größe der Tiere die mikrochirurgische Präparation und in vivo Mikroskopie gut durchführbar sind. Außerdem kann man ihnen relativ viel Blut entnehmen (95) und laborchemische Bestimmungen sind ausreichend etabliert.

## 1.2 ANP- Konzentrationsbestimmung

Bevor mit den Transplantationsgruppen begonnen wurde, wurden zunächst die Konzentrationsbestimmungen durchgeführt. Ziel war, eine ANP-Dosis zu finden, durch die bei intravenöser Gabe eine portalvenöse Konzentration von 200 nM ANP erreicht wird, da am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber sich diese Konzentration, verabreicht über 20 Minuten, als protektiv erwiesen hat (9). Geschätzt wurde eine Dosis zwischen 25 – 100 µg ANP/min über 20 Minuten. Nach Durchführung der Bestimmungen anhand einer Gruppe mit 25 µg ANP/min und einer Gruppe mit 50 µg ANP/min zeigte sich, dass bereits in der niedriger dosierten Gruppe konstante Spiegel über 200nM erreicht wurden, daher wurde nur noch ein Versuchstier mit einer Dosis von 100 µg ANP/min behandelt.

Die ANP-Basiskonzentration wurde zum einen über eine Versuchsgruppe ermittelt, die in gleicher Weise wie die ANP-Gruppe behandelt wurde, nur dass anstatt der ANP- Infusion eine äquivalente Menge Kochsalzlösung infundiert wurde. Zum anderen, um eine Beeinflussung der ANP-Basiskonzentration durch den durch die Narkose und das Operationstrauma verursachten Stress ausschließen zu können, wurde den Tieren einer Gruppe direkt nach Entnahme aus dem Käfig ein Genickbruch zugefügt und unmittelbar eine Blutprobe entnommen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, auch blieb die Basiskonzentration in der Gruppe mit Kochsalzinfusion über die Versuchsdauer von 20 Minuten konstant.

In der ANP-Gruppe erfolgte die letzte Blutabnahme nach Beendigung der ANP-Infusion, hier konnte ein sehr rascher Abfall des ANP-Spiegels beobachtet werden. Dies verdeutlichte die Notwendigkeit, dass unmittelbar nach Beendigung der ANP-Infusion die Perfusion der Leber mit UW-Lösung beginnen muss. Dadurch ergab sich in der ANP-Transplantationsgruppe eine etwas längere Explantationszeit für die Spenderlebern von durchschnittlich ca. 10 Minuten, da bis zum Beginn der ANP-Infusion etwas Zeitabstand eingehalten wurde. Hier ist allerdings von keiner relevanten Beeinflussung des Ergebnisses nach Transplantation auszugehen bzw. müssten die Vorteile der ANP-Infusion diesen Nachteil aufwiegen, damit die Prävention von IRS durch ANP Einzug in die Transplantationschirurgie beim Menschen finden kann.

## 2. Ischämie-/Reperfusionsschäden nach Lebertransplantation

Charakteristisch für den postischämischen Reperfusionsschaden sind Perfusionsausfälle in den Sinusoiden. Anhand intravitalmikroskopischer Analysen konnte zwischen zwei Phänomenen nach Reperfusion differenziert werden. Zum einen das „no-reflow“-Phänomen, welches ein initiales Versagen der nutritiven Perfusion der mikrovaskulären Strombahn nach Freigabe der Organdurchblutung bedeutet und somit zu einer Verlängerung der lokalen Hypoxie führt. Auf der anderen Seite steht eine initial erfolgreiche Reperfusion mit anschließender sekundärer Mikrozirkulationsstörung durch Akkumulation und Adhärenz von PMN, wodurch es zum Ausschluss von Kapillaren von der Perfusion und zum Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität kommt („reflow-paradox“) (78).

Die sinusoidale Perfusion wiederum ist von größter Bedeutung für die Versorgung der Leber mit Stoffwechselfaktoren. Durch eine Störung bzw. Reduktion der Perfusion kommt es zur Unterversorgung und in Folge zum Zelltod von Hepatozyten. Eine Schwellung der Hepatozyten verursacht eine Lumeneinengung der Sinusoide, wodurch der sinusoidale Widerstand ansteigt und die mikrovaskuläre Perfusion zusätzlich eingeschränkt wird.

Mittels intravitalmikroskopischer Analysen konnte gezeigt werden, dass PMN sowohl nach warmer als auch nach kalter Ischämie an sinusoidalen und venulären Endothelzellen adhären. Dabei fielen zwei Formen der Leukozyten-Endothel-Interaktion nach Reperfusion auf. Zum einen eine temporäre Adhärenz am mikrovaskulären Endothel („Roller“), zum anderen eine permanente Adhärenz der Leukozyten („Sticker“). Als Roller werden diejenigen PMN bezeichnet, die aufgrund von Margination und Endothelkontakt eine gegenüber dem Zentralstrom deutlich reduzierte Fließgeschwindigkeit zeigen. Als Sticker wiederum werden Leukozyten definiert, die länger als 20 Sekunden dem Endothel anhaften, ohne ihre Position zu ändern (79). Die Adhäsion am venulären Endothel läuft in mehreren Schritten ab. Nach initial lockerer Interaktion zwischen Endothel und PMN („rolling“) kommt es zur Aktivierung der PMN mit konsekutiver fester Bindung („sticking“), anschließend kommt es dann zur Emigration ins perivaskuläre Gewebe. Verantwortlich hierfür sind verschiedene Rezeptoren an der Endothel- und Leukozytenoberfläche (39;45;130). Das Ausmaß der Leukozyten-Endothel-Interaktionen nach Reperfusion bestimmt dabei entscheidend das Ausmaß der hepatischen Mikrozirkulationsstörungen.

Das Rolling als primäre Form der Leukozyten-Endothel-Interaktion wird an der Leber nur in den postsinusoidalen Venolen, jedoch nicht in den hepatischen Sinusoiden beobachtet. Als Erklärung hierfür dürfte dienen, dass das Rolling über das P-Selektin der Endothelzellen vermittelt wird und dieses von den sinusoidalen Endothelzellen nicht exprimiert wird (105;119).

Auch bei der Vermittlung der permanenten Leukozytenadhärenz gibt es Unterschiede zwischen dem Endothel der postsinusoidalen Venolen und der hepatischen Sinusoide. Während bei den postsinusoidalen Venolen das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 als Ligand dient (60), werden beim Sinusendothel andere Mechanismen für die Leukozytenadhärenz vermutet, wie z.B. die Veränderungen der mikrovaskulären Bedingungen, der physiologisch gewundene Aufbau der Sinusoide, sowie die postischämische Schwellung der Hepatozyten und Endothelzellen (62;119;121).

Die Freisetzung bestimmter Mediatoren bei der Reperfusion spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung lokaler und systemischer vaskulärer Effekte und bei der Rekrutierung von Entzündungszellen (66;68). Insbesondere nach einer Lebertransplantation lässt sich eine drastische Freisetzung von Mediatoren nachweisen, was zum einen an der relativ großen Organmasse, zum anderen an der hohen Dichte aktivierbarer lokaler Makrophagen liegt (88). In den ersten Minuten nach Reperfusion setzen aktivierte Kupferzellen viele inflammatorische Mediatoren wie  $\text{TNF-}\alpha$ , Interleukine, Prostaglandine und ROS frei. Dadurch kommt es zur Aktivierung von PMN (6;40;130). Die Folge ist eine Akkumulation und Adhärenz von PMN in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen (52;67;121).

Während der Reperfusion werden weitere Mediatoren wie Leukotriene, Thromboxan  $\text{A}_2$  und Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt. Über diese kann es durch ein Ungleichgewicht vasodilatatorischer und vasokonstriktorischer Wirkungen zu einer mikrovaskulären Perfusionsstörung kommen (40;51)). Auch Platelet activating Factor (PAF) und Leukotrien  $\text{B}_4$  werden während der Reperfusion freigesetzt (69;108) und bewirken eine PMN-Adhärenz am Endothel (39).

Sowohl aktivierte PMN als auch ROS fördern die Freisetzung dieser Mediatoren, die wiederum die Chemotaxis für Leukozyten erhöhen. Dadurch kommt es zu einem Circulus vitiosus, der zu einer weiteren Verschlechterung der kapillären Perfusion führt (77).

### 3. Zytoprotektion durch ANP in vitro/ ex vivo

Zytoprotektive Eigenschaften wurden dem ANP erstmals im Zusammenhang mit der Prävention von renalen Ischämie-Reperfusionsschäden zugeschrieben (80;96). Die protektiven Eigenschaften wurden auf vasorelaxierende Effekte und eine dadurch verbesserte Nierenperfusion zurückgeführt. Auf eine Wirksamkeit des Hormons an der Leber wiesen Versuche an kultivierten Hepatozyten, hier konnte eine Protektion vor Hypoxie-Reoxygenierungsschäden nachgewiesen werden (122), und es wurde erstmals ein Wirkmechanismus über eine cGMP-Erhöhung und Absenkung des intrazellulären  $Ca^{2+}$  diskutiert.

In den folgenden Jahren wurde dann am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber auch eine Reduktion hepatischer Ischämie- Reperfusionsschäden durch ANP beschrieben, sowohl nach warmer (9) als auch nach kalter Ischämie (36). Als protektiv erwies sich eine präischämische ANP-Gabe mit einer Konzentration von 200 nM bei einer Perfusionsdauer von 20 Minuten, geringere Konzentrationen, eine kürzere oder postischämische Gabe zeigten keinen Effekt. Diese Konzentrationsabhängigkeit entsprach auch den Versuchen an der perfundierten Rattenniere, hier wurde eine Reduktion renaler Ischämie-Reperfusionsschäden erst bei Konzentrationen von 300 nM beobachtet (80).

Die von Bilzer ursprünglich durchgeführten Untersuchungen waren mit einer GC-A-Rezeptor/cGMP vermittelten Zytoprotektion vereinbar. Es wurde aber bei diesen Untersuchungen auch eine Expression des GC-A-Rezeptors in Kupffer- Zellen und Sinusendothelzellen nachgewiesen, so dass eine Protektion über nicht-parenchymale Zellen möglich schien und für die Kupffer-Zellen schließlich auch bewiesen werden konnte. ANP (200nM) reduzierte am Modell der perfundierten Rattenleber den durch Kupffer-Zellen induzierten oxidativen Schaden, ebenso wurde eine Reduktion oxidativer Schäden, die durch  $H_2O_2$ - Infusion verursacht wurden, beobachtet (8).

Die Beeinflussung der Kupffer-Zellen durch ANP wurden anhand eines Modells, bei dem isolierte Kupffer-Zellen mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) stimuliert wurden, weitergehend charakterisiert. Es wurde demonstriert, dass ANP die LPS-induzierte Sekretion von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) signifikant senkt, begleitet von einem erhöhten zellgebundenen TNF- $\alpha$ . (58). Außerdem wurde eine Steigerung der phagozytotischen Aktivität der Kupffer-Zellen beobachtet. Da IRS der Leber von nekrotischen und apoptotischen Zellschäden begleitet werden (31) und auch postuliert wird, dass eine Inhibierung der Phagozytose den IRS steigern kann (123), wird die

Beeinflussung der Phagozytose als mitursächlich für die hepatoprotektiven Eigenschaften des ANP diskutiert.

Dass eine Präkonditionierung mit ANP sowohl den apoptotischen als auch den nekrotischen Zelltod vermindert, wurde an isoliert perfundierten Rattenlebern inzwischen nachgewiesen (37).

Als weiteren Mechanismus der Hepatoprotektion des ANP wurde am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber eine cGMP-vermittelte Reduktion der Aktivität von NF- $\kappa$ B und AP-1 mit konsekutiver Verminderung der mRNA Expression von TNF- $\alpha$  durch präischämische ANP-Perfusion beschrieben (59). Außerdem stellte sich heraus, dass ANP cGMP-vermittelt Hitzeschock-Proteine aktiviert (58), welche durch Protektion gegen Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle beim Schutz gegen IRS spielen sollen (94;127).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass immer mehr Details über das Ausmaß und die Mechanismen der hepatoprotektiven Eigenschaften des ANP bekannt werden. Bisher fehlten aber jegliche in vivo Experimente, die das beschriebene protektive Potential des ANP bestätigen konnten. Dieser Schritt ist natürlich vor einer klinischen Erprobung unbedingt erforderlich. Aufgrund der Einbeziehung zahlreicher extrahepatischer Faktoren, die am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber und insbesondere bei Zellkulturen nicht berücksichtigt werden, war eine direkte Übertragung der positiven Ergebnisse auf die in vivo Situation nicht zwangsläufig zu erwarten.

#### **4. Beurteilung hepatozellulärer Schäden und des Mikrozirkulationsschaden**

Zur Quantifizierung des hepatozellulären Schadens in vivo wurde zum einen die Bestimmung der Leberenzyme GOT und GPT herangezogen, da die Serumaktivitäten dieser Enzyme als zuverlässige Parameter der frühen Leberläsion gelten (23). Zum anderen wurden noch morphologische bzw. lichtmikroskopische Untersuchungen des Lebergewebes durchgeführt, da Transaminasenerhöhungen und parenchymale Desintegration des Lebergewebes zeitlich verschoben auftreten können (63).

Als Maß für die Leberfunktion diente die Messung der Galleproduktion, da der Gallefluss als am besten geeigneter klinische Parameter zur Beurteilung der hepatozellulären Funktion angesehen wird (10). Die Galle wurde ab Beginn der Reperfusion über einen bereits bei der Kaltpräparation in den Ductus choledochus eingeführten Katheter

gesammelt und der Gallefluss in Abhängigkeit des Leberfeuchtgewichtes berechnet. Auf eine Bestimmung der Gerinnungsfaktoren wurde verzichtet, da bei einem Aktivitätsabfall nicht zwischen erhöhtem Faktorenverbrauch und mangelnder Synthese unterschieden werden kann (46).

Dass es nach Transplantation kalt konservierter Lebern zu einem deutliche Anstieg der Leberenzyme und einer verminderten Leberfunktion kommt, ist in früheren Arbeiten beschrieben z.B. (2;89). Dass bei der Prävention von IRS auch schon in der frühen Phase der Reperfusion Verbesserungen dieser Parameter erhoben werden können, ist am Beispiel einer antioxidativen Therapie mit Glutathion zu sehen (93).

Die bereits beschriebenen Mikrozirkulationsstörungen im Rahmen der Reperfusion wurden mittels Intravitalmikroskopie beurteilt. Nach Gabe von fluoreszenzverstärkenden Farbstoffen ist eine quantitative Untersuchung der mikrovaskulären Perfusion möglich (78;120). Das Ausmaß der Mikrozirkulationsstörungen in der frühen Phase der Reperfusion wird, zumindest am warmen Ischämie-Reperfuionsmodell der Ratte, als zum Zellschaden korrelierend beschrieben (22;121). Außerdem wurde mittels der IVM die Adhärenz von Leukozyten in Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen quantifiziert.

## **5. Zytoprotektion durch ANP in vivo**

Bei der Lebertransplantation kommt es sowohl zu hypothermen als auch normothermen IRS, von denen parenchymale und nicht-parenchymale Leberzellen unterschiedlich stark betroffen sind. Nach hypothermer Konservierung der Leber stehen vor allem Sinusendothelzellschäden im Vordergrund (15;75). Nach warmer Ischämie, die im Rahmen der Lebertransplantation bei der Anastomosierung entsteht, überwiegen Schäden an den Hepatozyten (50).

Die Reduktion von IRS durch ANP wurde am Modell der isoliert perfundierten Rattenlebern für beide Ischämieformen nachgewiesen (9;36).

In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals überprüft, ob die hepatoprotektiven Eigenschaften des ANP am in vivo Modell einer orthotopen Rattenlebertransplantation nachvollzogen werden können.

Durch die präischämische Vorbehandlung mit 25 µg ANP/min über 20 Minuten ließ sich die hepatische Mikrozirkulation zwar tendenziell verbessern, bei einer durchschnittlichen



Perfusionsrate von 93,2 % in der Versuchsgruppe im Vergleich zu 87,6 % in der Kontrollgruppe ist der Unterschied jedoch nicht signifikant. Hier muss allerdings auch angemerkt werden, dass die hier untersuchte Kontrollgruppe einen relativ geringen Perfusionsausfall aufweist, in vergleichbaren Arbeiten wird bei den Kontrollgruppen meist ein Ausfall perfundierter Sinusoide von ca. 25 % angegeben (2;89;90;93).

Ein signifikanter Unterschied konnte aber bezüglich der Leukozytenadhärenz erhoben werden. Sowohl in den Sinusoiden als auch in den postsinusoidalen Venolen konnte die Anzahl leukozytärer Sticker deutlich gesenkt werden, in den postsinusoidalen Venolen war der Unterschied jedoch nicht signifikant.

Dieses positive Ergebnis korreliert allerdings nicht mit den Parametern des hepatozellulären Schadens. An den Messungen der Transaminasen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, der durchschnittliche GOT-Wert war in der Versuchsgruppe geringfügig höher als in der Kontrollgruppe, die GPT war tendenziell etwas niedriger. Auch in den lichtmikroskopischen Untersuchungen konnte nach keinem der beschriebenen Untersuchungskriterien eine Verbesserung in der mit ANP vorbehandelten Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe bestätigt werden.

Ebenso verhält es sich hinsichtlich der hepatozellulären Funktion, gemessen an der Galleproduktion während der zweistündigen Reperfusionphase. Weder in der Dynamik der Galleproduktion noch in der Gesamtmenge konnte ein Vorteil der vorbehandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ausgemacht werden.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu anderen Arbeiten zur Prävention hepatischer IRS, z.B. mit Hilfe von ACE-Hemmern (2) oder Glutathion (93), bei denen eine signifikante Reduktion der Leukozytenadhärenz auch mit einer signifikanten Reduktion der Transaminasen und einer gesteigerten Galleproduktion einherging. Auch in den Versuchen an der isoliert perfundierten Rattenleber wurde eine Reduktion des hepatozellulären Schadens bei gleichzeitiger Verbesserung der hepatozellulären Funktion beschrieben (9).

Die Diskrepanz in den Ergebnissen dieser Arbeit könnten darauf hinweisen, dass die Reduktion der Leukozytenadhärenz in den Sinusoiden und postsinusoidalen Venolen sowie eine Verbesserung der sinusoidalen Perfusion in der frühen Reperfusionphase nach Lebertransplantation nicht die entscheidenden Parameter sind bzw. dass die Mikrozirkulationsstörungen in dieser Phase nicht mit dem Zellschaden korrelieren, obwohl dies für das warme Ischämie- Reperusionsmodell der Rattenleber postuliert wird (22;121).

Ob die Reduktion der Leukozytenadhärenz durch eine Vorbehandlung mit ANP für den Ischämie- Reperfusionsschaden tatsächlich relevant ist, muss wohl durch weitere Untersuchungen, die die Leberfunktion nach längeren Beobachtungszeiten beurteilen, geklärt werden. Für die Wirksamkeit des ANP zur Prävention des frühen Ischämie-Reperfusionsschadens nach Lebertransplantation konnte in dieser Arbeit kein Beweis erbracht werden.

Durch welche Faktoren die Diskrepanz der Ergebnisse am in vivo Modell zum Modell der isoliert perfundierten Rattenleber bedingt ist, ist unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass an der isoliert perfundierten Rattenleber mit Krebs-Henseleit-Puffer ein zellfreies Medium zur Perfusion verwendet wird. Durch die intravenöse Verabreichung des ANP im Transplantationsmodell wird die Wirkung eventuell durch Bindung an Rezeptoren von Blutzellen, die nicht an der Entstehung des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens beteiligt sind, abgeschwächt. Hier könnte möglicherweise eine Dosiserhöhung dann den erwarteten Erfolg bringen.

Andererseits führt ANP zu einer Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität, wie in mehreren Studien bereits nachgewiesen wurde. (1;42;49;131). Die Mechanismen sind bisher jedoch noch weitgehend ungeklärt. Bruegger et al. zeigten am Modell isoliert perfundierter Schweineherzen eine Erhöhung der Extravasation und Transsudation und somit der Ödembildung durch ANP an den Koronararterien, die sie auf einen dramatischen Abbau der Glykokalix des Gefäßendothels zurückführen konnten (14). Dieser Effekt ist für andere Organe noch nicht nachgewiesen, aber vermutlich auch auf die Lebergefäße übertragbar.

Auch denkbar wäre, dass durch die in anderen Studien beschriebene Stimulation des „respiratory burst“, also der Produktion reaktiver Sauerstoffradikale, von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen durch ANP bzw. Vermittlung durch cGMP (56;118;125;128) sogar oxidative Schäden während der ANP-Infusion entstehen.

Durch o.g. Mechanismen würden dann die protektiven Eigenschaften des ANP nach Transplantation nivelliert, und sie relativieren die Möglichkeit durch eine Dosiserhöhung eine Prävention von IRS zu erreichen.

Zur Überprüfung der angeführten Thesen wäre eine Modifikation des Modells möglicherweise beweisend. Statt einer intravenösen Gabe des ANP könnte die Spenderleber vor Explantation mit einer zellfreien Lösung, die 200 nM ANP enthält, portalvenös über 20 Minuten perfundiert werden, bevor die übliche Perfusion mit UW-Lösung erfolgt. Dadurch würde das Modell allerdings komplizierter in der Handhabung und die Explantationszeit würde sich verlängern.

## E. Zusammenfassung

Konservierungsschäden spielen seit den Anfängen der Transplantationsmedizin eine entscheidende Rolle hinsichtlich des Erfolges von Organtransplantationen. Durch ausführliche Untersuchung der zugrundeliegenden Pathomechanismen konnte die Organkonservierung in den letzten Jahren durch Spülung und hypotherme Lagerung in speziellen Lösungen deutlich verbessert werden. Für die Leber hat sich als Perfusions- und Konservierungslösung die UW-Lösung durchgesetzt. Trotz dieser Verbesserung werden auch heute noch schwerwiegende Komplikationen wie das primäre Transplantatversagen, die primäre Transplantatdysfunktion und Nicht-Anastomosenstenosen der Gallenwege auf Konservierungs- bzw. Ischämie-Reperfusionsschäden zurückgeführt. Folgen sind eine dadurch erhöhte Morbidität und Mortalität bei den transplantierten Patienten sowie eine immer noch vergleichsweise hohe Rate an Retransplantationen.

Bisherige Maßnahmen zur Verminderung des Ischämie-Reperfusionsschadens zielten zumeist auf eine postischämische Therapie ab, z.B. mit antioxidativen Substanzen zur Reduktion von Schäden, die durch reaktive Sauerstoffspezies verursacht werden.

In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob eine *präischämische Therapie* der Spenderleber mit atrialem natriuretischen Peptid zu einer Reduktion von IRS führt und somit ein völlig neuer Therapieansatz in die Transplantationsmedizin Einzug erhalten könnte. Am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber wurde eine ANP-Konzentration von 200 nM, verabreicht über 20 Minuten, als hepatoprotektiv beschrieben. Um die Wirksamkeit dieser Konzentration am Transplantationsmodell überprüfen zu können, mussten zunächst Dosis-Konzentrationsbestimmungen durchgeführt werden, da eine intravenöse Applikation angestrebt wurde.

### Modell

Insgesamt wurden für die Studie 35 männliche Lewis-Ratten verwendet, von denen 11 Tiere für die ANP-Dosisfindung benötigt wurden, je 12 Tiere dienten als Spender- bzw. Empfängertiere. Zur Dosisfindung wurden den Versuchstieren unterschiedliche ANP-Dosierungen (25 µg/min und 50 µg/min) über 20 Minuten verabreicht und die portalvenöse ANP-Konzentration durch Blutabnahmen direkt aus der Pfortader zu mehreren Zeitpunkten bestimmt. Die ANP-Basiskonzentration der Ratten wurde durch zwei verschiedene Versuchgruppen ermittelt. Die eine wurde analog der ANP-Gruppen behandelt, erhielt nur statt der ANP-Infusion eine Kochsalzlösung gleicher Menge

infundiert. Die Tiere der anderen Gruppe erhielten keine Narkose und Infusion, hier erfolgte nur eine Blutabnahme unmittelbar nach Zufügen eines letalen Schädelhirntraumas. Dadurch sollte eine Beeinflussung der ANP-Basiskonzentration durch die Narkose und das Operationstrauma untersucht werden.

Nach Abschluss der Dosisfindung wurden dann schließlich zwei Transplantationsgruppen gebildet, eine Kontrollgruppe mit unbehandelten Spender- und Empfängertieren sowie die Therapiegruppe, in der die Spendertiere eine 20-minütige präischämische ANP-Infusion erhielten. Während der Reperfusion wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der sinusoidalen Perfusion sowie der Leukozytenadhärenz durchgeführt. Gegen Versuchsende erfolgten dann die Blutentnahmen für laborchemische Untersuchungen, beendet wurden die Versuche nach zwei Stunden Reperfusion durch die Entnahme von Lebergewebe für die lichtmikroskopische Analyse.

### Ergebnisse

Bei den Untersuchungen zur Dosisfindung zeigte sich schließlich, dass bereits bei einer Gabe von 25 µg ANP/min die gewünschte portalvenöse Konzentration von 200 nM ANP erreicht wird. Es konnte beobachtet werden, dass die gewünschte Konzentration rasch erreicht wird und es nach Beendigung der Infusion zu einem ebenso schnellen Abfall der ANP-Konzentration kommt. Es wurde weiterhin gezeigt, dass es durch die Narkose bzw. den Operationsstress beim Spender zu keinen Schwankungen der ANP-Basiskonzentration kommt.

Anhand der daraufhin durchgeführten Transplantationsgruppen konnte gezeigt werden, dass durch Vorbehandlung der Spender mit ANP die Leukozytenakkumulation sowohl in den Sinusoiden als auch in den postsinusoidalen Venolen signifikant verringert werden konnte. Die Mikrozirkulation nach Transplantation erschien in der Therapiegruppe ebenfalls verbessert, aufgrund der geringen Fallzahl ist der Unterschied aber nicht signifikant. Die positiven Ergebnisse der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie spiegelten sich jedoch nicht in den zusätzlich erhobenen Untersuchungsparametern wider. Morphologisch konnte mittels Lichtmikroskopie kein wesentlicher Unterschied zwischen den Versuchsgruppen gesehen werden. Auch anhand der Leberenzyme und des Galleflusses nach Transplantation konnten keine hepatoprotektiven Effekte bzw. eine Korrelation zu den Ergebnissen der Intravitalmikroskopie festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Arbeiten.

**F. Abkürzungen**

ANP:	Atriales Natriuretisches Peptid
ATP:	Adenosin-5'-triphosphat
BNP:	brain natriuretic peptide
cGMP:	Guanosin 3':5' zyklisches Monophosphat
CNP:	C-type Natriuretisches Peptid
GOT:	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT:	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Wasserstoffperoxid
IDF:	Initiale Transplantatdysfunktion
I.E.:	Internationale Einheiten
IRS:	Ischämie-Reperfusionsschaden
i.v.:	Intravenös
IVM:	Intravitalmikroskopie
KG:	Körpergewicht
LFG:	Leberfeuchtgewicht
LTX:	Lebertransplantation
MAP:	Mittlerer arterieller Druck
NO:	Stickstoffmonoxid
p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub> :	Kohlendioxidpartialdruck, arteriell
p <sub>a</sub> O <sub>2</sub> :	Sauerstoffpartialdruck, arteriell
PMN:	Polymorphkernige Neutrophile
PNF:	Primäre Nichtfunktion
RIA:	Radioimmunoassay
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
TNF- $\alpha$ :	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
UW-Lösung:	University of Wisconsin-Lösung

## **G. LITERATURVERZEICHNIS**

- (1) Ando S, Imaizumi T, Harada S, Hirooka Y, Takeshita A. Atrial natriuretic peptide increases human capillary filtration and venous distensibility. *J Hypertens* 1992; 10(5):451-457.
- (2) Anthuber M, Farkas S, Rihl M, Menger MD, Schildberg FW, Jauch KW et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition by enalapril: a novel approach to reduce ischemia/reperfusion damage after experimental liver transplantation. *Hepatology* 1997; 25(3):648-651.
- (3) Ar'Rajab A, Ahren B, Bengmark S. Improved liver preservation for transplantation due to calcium channel blockade. *Transplantation* 1991; 51(5):965-967.
- (4) Bachmann S, Peng XX, Currin RT, Thurman RG, Lemasters JJ. Glycine in Carolina rinse solution reduces reperfusion injury, improves graft function, and increases graft survival after rat liver transplantation. *Transplant Proc* 1995; 27(1):741-742.
- (5) Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45(4):673-676.
- (6) Bienvenu K, Granger DN. Leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion. *Blood Cells* 1993; 19(2):279-288.
- (7) Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000; 32(3):508-515.
- (8) Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1999; 276(5 Pt 1):G1137-G1144.
- (9) Bilzer M, Witthaut R, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of ischemia/reperfusion injury in the rat liver by atrial natriuretic peptide. *Gastroenterology* 1994; 106(1):143-151.
- (10) Bowers BA, Branum GD, Rotolo FS, Watters CR, Meyers WC. Bile flow--an index of ischemic injury. *J Surg Res* 1987; 42(5):565-569.
- (11) Brecht M, Brecht C, De Groot H. Late steady increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> preceding hypoxic injury in hepatocytes. *Biochem J* 1992; 283(Pt 2):399-402.
- (12) Brecht M, De Groot H. [Changes in cytosol Ca(2+)-, Mg(2+)-, H(+)-, N(+)-, and K(+)-concentrations in cultivated hepatocytes in hypoxic conditions]. *Zentralbl Chir* 1994; 119(5):341-346.

- (13) Bronk SF, Gores GJ. pH-dependent nonlysosomal proteolysis contributes to lethal anoxic injury of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1993; 264(4 Pt 1):G744-G751.
- (14) Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P et al. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289(5):H1993-H1999.
- (15) Caldwell-Kenkel JC, Thurman RG, Lemasters JJ. Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers. *Transplantation* 1988; 45(4):834-837.
- (16) Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 1979; 2(8151):1033-1036.
- (17) Calne RY, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978; 2(8104-5):1323-1327.
- (18) Chavez-Cartaya RE, Pino DG, Ramirez-Romero P, Calne RY, Jamieson NV. Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. *J Surg Res* 1996; 60(1):199-206.
- (19) Cheng S, Ragsdale JR, Sasaki AW, Lee RG, Deveney CW, Pinson CW. Verapamil improves rat hepatic preservation with UW solution. *J Surg Res* 1991; 50(6):560-564.
- (20) Chien KR, Abrams J, Pfau RG, Farber JL. Prevention by chlorpromazine of ischemic liver cell death. *Am J Pathol* 1977; 88(3):539-557.
- (21) Chien KR, Abrams J, Serroni A, Martin JT, Farber JL. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem* 1978; 253(13):4809-4817.
- (22) Chun K, Zhang J, Biewer J, Ferguson D, Clemens MG. Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock* 1994; 1(1):3-9.
- (23) Clary JJ, Groth DH, Stokinger HE. Comparative changes in serum enzyme levels in beryllium- or carbon tetrachloride-induced liver necrosis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 143(4):1207-1210.
- (24) Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 1991; 40(6):923-931.

- (25) Currin RT, Caldwell-Kenkel JC, Lichtman SN, Bachmann S, Takei Y, Kawano S et al. Protection by Carolina rinse solution, acidotic pH, and glycine against lethal reperfusion injury to sinusoidal endothelial cells of rat livers stored for transplantation. *Transplantation* 1996; 62(11):1549-1558.
- (26) De Carlis L, Sansalone CV, Rondinara GF, Colella G, Slim AO, Rossetti O et al. Is the use of marginal donors justified in liver transplantation? Analysis of results and proposal of modern criteria. *Transpl Int* 1996; 9 Suppl 1:S414-7.:S414-S417.
- (27) Engemann R, Ulrichs K, Thiede A, Muller-Ruchholtz W, Hamelmann H. Value of a physiological liver transplant model in rats. Induction of specific graft tolerance in a fully allogeneic strain combination. *Transplantation* 1982; 33(5):566-568.
- (28) Ferguson DM, Gores GJ, Bronk SF, Krom RA. An increase in cytosolic protease activity during liver preservation. Inhibition by glutathione and glycine. *Transplantation* 1993; 55(3):627-633.
- (29) Flaherty JT, Weisfeldt ML. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1988; 5(5-6):409-419.
- (30) Furukawa H, Todo S, Inventarza O, Casavilla A, Wu YM, Scotti-Foglieni C et al. Effect of cold ischemia time on the early outcome of human hepatic allografts preserved with UW solution. *Transplantation* 1991; 51(5):1000-1004.
- (31) Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27(6):1652-1660.
- (32) Garbers DL. Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 1992; 71(1):1-4.
- (33) Gasbarrini A, Borle AB, Farghali H, Bender C, Francavilla A, Van Thiel D. Effect of anoxia on intracellular ATP, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and cytotoxicity in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1992; 267(10):6654-6663.
- (34) Geeraerts MD, Ronveaux-Dupal MF, Lemasters JJ, Herman B. Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and proteolysis in lethal oxidative injury in endothelial cells. *Am J Physiol* 1991; 261(5 Pt 1):C889-C896.
- (35) Gerbes AL, Vollmar AM. Processing and clearance of atrial natriuretic factor (ANF). In: Henriksen JH, ed. *Degradation of bioactive substances: physiology and pathophysiology*. Boca Raton: CRC Press, 129-141. 1991.

Ref Type: Magazine Article

- (36) Gerbes AL, Vollmar AM, Kiemer AK, Bilzer M. The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver. *Hepatology* 1998; 28(5):1309-1317.



- (37) Gerwig T, Meissner H, Bilzer M, Kiemer AK, Arnholdt H, Vollmar AM et al. Atrial natriuretic peptide preconditioning protects against hepatic preservation injury by attenuating necrotic and apoptotic cell death. *J Hepatol* 2003; 39(3):341-348.
- (38) Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ. Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP-depleted hepatocytes. *Am J Physiol* 1988; 255(3 Pt 1):C315-C322.
- (39) Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994; 55(5):662-675.
- (40) Granger DN, Kvietys PR, Perry MA. Leukocyte--endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71(1):67-75.
- (41) Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR et al. Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E1. *Transplantation* 1989; 48(3):447-453.
- (42) Groban L, Cowley AW, Jr., Ebert TJ. Atrial natriuretic peptide augments forearm capillary filtration in humans. *Am J Physiol* 1990; 259(1 Pt 2):H258-H263.
- (43) Harrison DC, Lemasters JJ, Herman B. A pH-dependent phospholipase A2 contributes to loss of plasma membrane integrity during chemical hypoxia in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174(2):654-659.
- (44) Herman B, Gores GJ, Nieminen AL, Kawanishi T, Harman A, Lemasters JJ. Calcium and pH in anoxic and toxic injury. *Crit Rev Toxicol* 1990; 21(2):127-148.
- (45) Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, Arfors KE, Harlan JM, Granger DN. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987; 253(3 Pt 2):H699-H703.
- (46) Himmelreich G, Jochum M, Bechstein WO, Machleidt W, Neuhaus P, Slama KJ et al. Mediators of leukocyte activation play a role in disseminated intravascular coagulation during orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1994; 57(3):354-358.
- (47) Hirata M, Chang CH, Murad F. Stimulatory effects of atrial natriuretic factor on phosphoinositide hydrolysis in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1010(3):346-351.
- (48) Hisanaga M, Nakajima Y, Wada T, Kanehiro H, Fukuoka T, Horikawa M et al. Protective effect of the calcium channel blocker diltiazem on hepatic function following warm ischemia. *J Surg Res* 1993; 55(4):404-410.
- (49) Huxley VH, Tucker VL, Verburg KM, Freeman RH. Increased capillary hydraulic conductivity induced by atrial natriuretic peptide. *Circ Res* 1987; 60(2):304-307.

- (50) Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K. Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992; 16(2):454-461.
- (51) Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *FASEB J* 1990; 4(15):3355-3359.
- (52) Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, Ganey PE, Roth RA. Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 139(2):213-226.
- (53) Kalayoglu M, Stratta RJ, Sollinger HW, Hoffmann RM, D'Alessandro AM, Pirsch JD et al. Clinical results in liver transplantation using UW solution for extended preservation. *Transplant Proc* 1989; 21(1 Pt 2):1342-1343.
- (54) Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979; 28(1):47-50.
- (55) Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93(1 Pt 1):64-69.
- (56) Kaplan SS, Billiar T, Curran RD, Zdziarski UE, Simmons RL, Basford RE. Inhibition of chemotaxis by N<sup>G</sup>-monomethyl-L-arginine: a role for cyclic GMP. *Blood* 1989; 74(6):1885-1887.
- (57) Keeffe EB. Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology* 2001; 120(3):749-762.
- (58) Kiemer AK, Gerbes AL, Bilzer M, Vollmar AM. The atrial natriuretic peptide and cGMP: novel activators of the heat shock response in rat livers. *Hepatology* 2002; 35(1):88-94.
- (59) Kiemer AK, Vollmar AM, Bilzer M, Gerwig T, Gerbes AL. Atrial natriuretic peptide reduces expression of TNF- $\alpha$  mRNA during reperfusion of the rat liver upon decreased activation of NF- $\kappa$ B and AP-1. *J Hepatol* 2000; 33(2):236-246.
- (60) Kishimoto TK, Rothlein R. Integrins, ICAMs, and selectins: role and regulation of adhesion molecules in neutrophil recruitment to inflammatory sites. *Adv Pharmacol* 1994; 25:117-69.:117-169.
- (61) Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 1991; 252(5002):120-123.
- (62) Komatsu H, Koo A, Guth PH. Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation. *Microvasc Res* 1990; 40(1):1-13.

- (63) Korsrud GO, Grice HG, Goodman TK, Knipfel JE, McLaughlan JM. Sensitivity of several serum enzymes for the detection of thioacetamide-, dimethylnitrosamine- and diethanolamine-induced liver damage in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 26(2):299-313.
- (64) Kraus-Friedmann N. Hormonal regulation of cytosolic calcium levels in the liver. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28(3):275-284.
- (65) Lee S, Charters AC, Chandler JG, Orloff MJ. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1973; 16(6):664-669.
- (66) Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver Transpl Surg* 1995; 1(2):124-138.
- (67) Lemasters JJ, Peng XX, Bachmann S, Currin RT, Gao W, Thurman RG. Dual role of Kupffer cell activation and endothelial cell damage in reperfusion injury to livers stored for transplantation surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10 Suppl 1:S84-7.:S84-S87.
- (68) Lemasters JJ, Thurman RG. Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37:327-38.:327-338.
- (69) Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1988; 82(6):2045-2055.
- (70) Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J* 1993; 7(2):328-338.
- (71) Maack T, Suzuki M, Almeida FA, Nussenzveig D, Scarborough RM, McEnroe GA et al. Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. *Science* 1987; 238(4827):675-678.
- (72) Mak IT, Weglicki WB. Antioxidant activity of calcium channel blocking drugs. *Methods Enzymol* 1994; 234:620-30.:620-630.
- (73) Marzi I, Walcher F, Buhren V. Macrophage activation and leukocyte adhesion after liver transplantation. *Am J Physiol* 1993; 265(1 Pt 1):G172-G177.
- (74) Mauger JP, Claret M. Calcium channels in hepatocytes. *J Hepatol* 1988; 7(2):278-282.
- (75) McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation* 1988; 46(2):178-191.
- (76) Mees N, Southard JH, Belzer FO. Inhibition of ischemic induced cellular swelling in kidney cortex tissue by lactobionate anions. *J Trauma* 1982; 22(2):118-120.

- (77) Menger MD, Lehr HA, Messmer K. Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury. *Klin Wochenschr* 1991; 69(21-23):1050-1055.
- (78) Menger MD, Marzi I, Messmer K. In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 1991; 23(3-4):158-169.
- (79) Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 1992; 263(6 Pt 2):H1892-H1900.
- (80) Nakamoto M, Shapiro JI, Shanley PF, Chan L, Schrier RW. In vitro and in vivo protective effect of atriopeptin III on ischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 1987; 80(3):698-705.
- (81) Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992; 32:449-70.:449-470.
- (82) Nicotera P, Hartzell P, Baldi C, Svensson SA, Bellomo G, Orrenius S. Cystamine induces toxicity in hepatocytes through the elevation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> and the stimulation of a nonlysosomal proteolytic system. *J Biol Chem* 1986; 261(31):14628-14635.
- (83) Nicotera P, Hartzell P, Davis G, Orrenius S. The formation of plasma membrane blebs in hepatocytes exposed to agents that increase cytosolic Ca<sup>2+</sup> is mediated by the activation of a non-lysosomal proteolytic system. *FEBS Lett* 1986; 209(1):139-144.
- (84) Pella R. The protective effect of atrial natriuretic peptide (ANP) on cells damaged by oxygen radicals is mediated through elevated CGMP-levels, reduction of calcium-inflow and probably G-proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174(2):549-555.
- (85) Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM et al. Malfunction of the liver after transplantation: an analysis of potential risk factors. *Transplant Proc* 1993; 25(1 Pt 2):1659-1661.
- (86) Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55(4):807-813.
- (87) Post S, Menger MD, Rentsch M, Gonzalez AP, Herfarth C, Messmer K. The impact of arterialization on hepatic microcirculation and leukocyte accumulation after liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1992; 54(5):789-794.
- (88) Post S, Messmer K. [The role of reperfusion damage]. *Chirurg* 1996; 67(4):318-323.

- (89) Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzalez AP, Menger MD. Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology* 1993; 18(6):1490-1497.
- (90) Post S, Rentsch M, Palma P, Gonzalez AP, Menger MD. Assessment of microhemodynamics after liver transplantation by in vivo microscopy in the rat. *Transplant Proc* 1993; 25(4):2597-2598.
- (91) Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Buckel EG, Steers JL et al. Diagnostic features and clinical outcome of ischemic-type biliary complications after liver transplantation. *Hepatology* 1993; 17(4):605-609.
- (92) Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Wahlstrom HE, Moore SB et al. Ischemic-type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1992; 16(1):49-53.
- (93) Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Meissner H, Schildberg FW et al. Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2004; 10(6):864-870.
- (94) Schlesinger MJ. Heat shock proteins. *J Biol Chem* 1990; 265(21):12111-12114.
- (95) Seifert J, Messmer K. Validity of blood volume determinations in hemorrhagic shock in rats. *Eur Surg Res* 1971; 3(5):306-316.
- (96) Shaw SG, Weidmann P, Hodler J, Zimmermann A, Paternostro A. Atrial natriuretic peptide protects against acute ischemic renal failure in the rat. *J Clin Invest* 1987; 80(5):1232-1237.
- (97) Southard JH, Belzer FO. Control of canine kidney cortex slice volume and ion distribution at hypothermia by impermeable anions. *Cryobiology* 1980; 17(6):540-548.
- (98) Southard JH, Belzer FO. The University of Wisconsin organ preservation solution: Components, comparisons, and modifications. *Transplant Rev* 1993; 7(4):176-190.
- (99) Starzl TE. Liver transplantation. *Johns Hopkins Med J* 1978; 143(3):73-83.
- (100) Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D. Liver transplantation (1). *N Engl J Med* 1989; 321(15):1014-1022.
- (101) Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D. Liver transplantation (2). *N Engl J Med* 1989; 321(16):1092-1099.
- (102) Starzl TE, Giles G, Lilly JR, Takagi H, Martineau G, Schroter G et al. Indications for orthotopic liver transplantation: with particular reference to hepatomas, biliary atresia, cirrhosis, Wilson's disease and serum hepatitis. *Transplant Proc* 1971; 3(1):308-312.

- (103) Starzl TE, Marchioro TL, Faris TD. Liver transplantation. *Ann Intern Med* 1966; 64(2):473-477.
- (104) Steffen R, Ferguson DM, Krom RA. A new method for orthotopic rat liver transplantation with arterial cuff anastomosis to the recipient common hepatic artery. *Transplantation* 1989; 48(1):166-168.
- (105) Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, Duijvestijn AM, Wonigeit K. Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. Lack of ELAM-1 and CD62 inducibility on sinusoidal endothelia and distinct distribution of VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2, and LFA-3. *Am J Pathol* 1993; 142(2):481-488.
- (106) Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988; 332(6159):78-81.
- (107) Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168(2):863-870.
- (108) Sumimoto H, Takeshige K, Minakami S. Superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes stimulated by leukotriene B<sub>4</sub>. *Biochim Biophys Acta* 1984; 803(4):271-277.
- (109) Sumimoto R, Kamada N. Lactobionate as the most important component in UW solution for liver preservation. *Transplant Proc* 1990; 22(5):2198-2199.
- (110) Sundberg R, Ar'Rajab A, Ahren B, Bengmark S. Improvement of liver preservation quality with UW solution by chlorpromazine pretreatment of the donor in an experimental model. *Transplantation* 1989; 48(5):742-744.
- (111) Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez F, Lopez F. Role of Kupffer cells in neutrophil activation and infiltration following total hepatic ischemia and reperfusion. *Circ Shock* 1994; 42(4):204-209.
- (112) Takei Y, Marzi I, Kauffman FC, Currin RT, Lemasters JJ, Thurman RG. Increase in survival time of liver transplants by protease inhibitors and a calcium channel blocker, nisoldipine. *Transplantation* 1990; 50(1):14-20.
- (113) Thomas CE, Reed DJ. Current status of calcium in hepatocellular injury. *Hepatology* 1989; 10(3):375-384.
- (114) Todo S, Nery J, Yanaga K, Podesta L, Gordon RD, Starzl TE. Extended preservation of human liver grafts with UW solution. *JAMA* 1989; 261(5):711-714.
- (115) Trump BF, Berezesky IK. The role of cytosolic Ca<sup>2+</sup> in cell injury, necrosis and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4(2):227-232.
- (116) Urata K, Nguyen B, Brault A, Lavoie J, Rocheleau B, Huet PM. Decreased survival in rat liver transplantation with extended cold preservation: role of portal vein clamping time. *Hepatology* 1998; 28(2):366-373.

- (117) van der Vusse GJ, van Bilsen M, Reneman RS. Ischemia and reperfusion induced alterations in membrane phospholipids: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 723:1-14.:1-14.
- (118) Vollmar AM, Forster R, Schulz R. Effects of atrial natriuretic peptide on phagocytosis and respiratory burst in murine macrophages. *Eur J Pharmacol* 1997; 319(2-3):279-285.
- (119) Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995; 117(2):195-200.
- (120) Vollmar B, Glasz J, Senkel A, Menger MD, Messmer K. Role of leukocytes in the initial hepatic microvascular response to endotoxemia. *Zentralbl Chir* 1993; 118(11):691-696.
- (121) Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994; 267(5 Pt 1):G786-G793.
- (122) von Ruecker AA, Wild M, Rao GS, Bidlingmaier F. Atrial natriuretic peptide protects hepatocytes against damage induced by hypoxia and reactive oxygen. Possible role of intracellular free ionized calcium. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989; 27(9):531-537.
- (123) Wanner GA, Mica L, Wanner-Schmid E, Kolb SA, Hentze H, Trentz O et al. Inhibition of caspase activity prevents CD95-mediated hepatic microvascular perfusion failure and restores Kupffer cell clearance capacity. *FASEB J* 1999; 13(10):1239-1248.
- (124) Warner L, Skorecki K, Blendis LM, Epstein M. Atrial natriuretic factor and liver disease. *Hepatology* 1993; 17(3):500-513.
- (125) Wiedermann CJ, Niedermuhlbichler M, Braunsteiner H, Wiedermann CJ. Priming of polymorphonuclear neutrophils by atrial natriuretic peptide in vitro. *J Clin Invest* 1992; 89(5):1580-1586.
- (126) Wiedermann CJ, Wiedermann FJ, Herold M, Tilg H, Moes N, Muhlberger V et al. Plasma levels of atrial natriuretic peptide and tumor necrosis factor-alpha during transient myocardial ischemia in patients with stable angina. *Klin Wochenschr* 1991; 69(20):944.
- (127) Wong HR, Wispe JR. The stress response and the lung. *Am J Physiol* 1997; 273(1 Pt 1):L1-L9.
- (128) Wyatt TA, Lincoln TM, Pryzwansky KB. Regulation of human neutrophil degranulation by LY-83583 and L-arginine: role of cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 1993; 265(1 Pt 1):C201-C211.

- (129) Yoshida Y, Sun HT, Cai JQ, Imai S. Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. *J Biol Chem* 1991; 266(29):19819-19825.
- (130) Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72(1):65-83.
- (131) Zimmerman RS, Trippodo NC, MacPhee AA, Martinez AJ, Barbee RW. High-dose atrial natriuretic factor enhances albumin escape from the systemic but not the pulmonary circulation. *Circ Res* 1990; 67(2):461-468.



## H. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. R.J. Schauer, zu Beginn meiner Arbeit noch Oberarzt und Leiter der Lebertransplantationsgruppe der Chirurgischen Klinik am Universitätsklinikum Großhadern der LMU München, inzwischen Chefarzt der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie am Klinikum Traunstein, für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in sein Team. Er stand uns außerdem bei der erneuten Etablierung des Modells stets mit Rat und Tat zur Seite.

Besonders möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Dr. med. U. Grützner bedanken. Unter seiner geduldigen Anleitung lernte ich wissenschaftliches Arbeiten von der Durchführung der Experimente bis hin zur Auswertung und kritischen Interpretation der Ergebnisse. In dieser Zeit entwickelte sich ein freundschaftliches Verhältnis, wie es sich ein jeder Doktorand vermutlich wünscht, und trotz vieler Rückschläge während des experimentellen Teils machte die gemeinsame Arbeit immer Spaß.

Mein Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. med. M. Bilzer aus der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Großhadern, dessen Arbeiten am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber die Vorlage zu dieser Arbeit darstellen und der uns mit seinem fachkundigem Wissen stets unterstützte und bei der Interpretation der Ergebnisse half. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei seiner Mitarbeiterin Fr. I. Liß bedanken, die die aufwendigen ANP-Konzentrationsbestimmungen ermöglichte.

Für die Auswertung und Präsentation der lichtmikroskopischen Schnitte bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Dr. med. Frigga Roggel und Herrn Dr. med. H. Meißner aus dem Institut für Pathologie.

Mein besonderer Dank gilt außerdem der Leitung sowie allen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Chirurgische Forschung, die letztendlich alle durch viele Gespräche und Diskussionen sowie praktische Tipps am Gelingen dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Mein Dank gilt nicht zuletzt auch allen Mitarbeitern des Instituts für klinische Chemie, die für uns die laborchemischen Bestimmungen durchgeführt haben.

**I. LEBENSLAUF**

Name:	Michael Bach
Geburtstag und -ort:	24.06.1978, München
Schulbildung:	Abitur am Kurt-Huber-Gymnasium, Gräfelfing
Zivildienst:	1997 - 1998 Herzchirurgische Poliklinik - Großhadern
Berufsausbildung:	05/1999 Beginn des Medizinstudiums LMU München
	03/2001 Ärztliche Vorprüfung
	03/2002 Erstes Staatsexamen
	04/2004 Zweites Staatsexamen
	05/2005 Drittes Staatsexamen
Bisherige Tätigkeiten:	05/99 – 08/05 Perfusionist für Herz- und Lungen- explantationen bei der DSO München
	08 – 09/01 Famulatur in der Inneren Medizin (KH Barmherzige Brüder, München)
	09/02 Famulatur in der Allgemein-, Thorax- und Gefäßchirurgie (KH Barmh. Brüder, Regensburg)
	03 – 04/03 Famulatur in der Anästhesie (Dr. Pauli, Paracelsus-Klinik, München)
	08 – 10/03 Famulatur in der Allgemeinchirurgie und Chirurgische Nothilfe Princess-Margret-Hospital, Morant Bay/Jamaica
	04 – 08/04 1. Terial in der Inneren Medizin Krankenhaus Neuperlach
Praktisches Jahr:	08 – 11/04 2. Terial in der Orthopädie im Kantonsspital Aarau (Schweiz)
	11/04 – 03/05 3. Terial in der Chirurgie im Klinikum Großhadern
Berufstätigkeit:	10/05- jetzt Assistenzarzt in der Allgemein- und Viszeralchirurgie, Uniklinik Freiburg