

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Grosshadern der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K.-W. Jauch

**Die Verwendung eines Immunsuppressivums (Tacrolimus)
als Rinse-Solution zur Reduktion von Ischämie-
Reperfusionsschäden bei der experimentellen
Lebertransplantation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sebastian Pratschke

aus
Bad Reichenhall

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Rolf J. Schauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Manfred Thiel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. R.J. Schauer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	S. 5
1.1 Geschichte und aktuelle Probleme der Lebertransplantation	S. 5
1.2 Pathomechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens bei der Lebertransplantation	S. 6
1.3 Experimentelle Therapieansätze von Ischämie-Reperfusionsschäden	S. 7
1.4 Glutathion als Therapeutikum und Mediator des Ischämie- Reperfusionsschadens	S. 8
1.5 Überlegungen zur Wahl eines Therapeutikums des Ischämie- Reperfusionsschadens und dem Zeitpunkt seiner Anwendung	S. 11
1.6 Tacrolimus als Therapeutikum des Ischämie-Reperfusionsschadens	S. 12
1.7 Vorversuche im isoliert perfundierten Modell der Rattenleber	S. 14
1.8 Fragestellung	S. 15
 2. Material und Methoden	 S. 16
2.1 Isolierte Organperfusion der Leber	S. 16
2.1.1 Operative Technik	S. 16
2.1.2 Versuchsprotokoll	S. 17
2.2 Orthotope Lebertransplantation	S. 18
2.2.1 Operative Techniken	S. 18
2.2.2 Spenderoperation	S. 20
2.2.3 Kaltpräparation und Konservierung	S. 21
2.2.4 Empfängeroperation	S. 22
2.3 Versuchsprotokoll	S. 23
2.3.1 Explantation	S. 24
2.3.2 Transplantation	S. 24
2.4 Parameter und Meßmethoden	S. 25
2.4.1 Systemische Hämodynamik	S. 25
2.4.2 Transaminasen	S. 25
2.4.3 Lichtmikroskopie der Leber	S. 25
2.4.4 Hepatozelluläre Funktion/ Gallefluss	S. 26
2.4.5 GSH- und GSSG-Bestimmung im Plasma	S. 26
2.4.6 GSH- und GSSG-Bestimmung im Gewebe	S. 27
2.4.7 GSH- und GSSG-Bestimmung in der Galle	S. 28

2.5	Statistische Analyse	S. 28
3.	Ergebnisse	S. 29
3.1	Modell der isoliert perfundierten Rattenleber	S. 29
3.2	Orthotope Lebertransplantation	S. 32
4.	Diskussion	S. 44
4.1	Tacrolimus und Ischämie-Reperfusionsschaden	S. 44
4.2	Glutathion als Therapeutikum und Mediator hepatischer Ischämie-Reperfusionsschäden unter Berücksichtigung eigener Daten aus einem Schädigungsmodell der Fettlebertransplantation	S. 44
4.3	Verringerung von Ischämie-Reperfusionsschäden im isoliert-perfundierten Modell durch Tacrolimus	S. 47
4.4	Verbesserung der hepatozellulären Integrität durch Tacrolimus-Rinse nach Lebertransplantation	S. 48
4.5	Inverse Dosis-Wirkungsbeziehung der Tacrolimus-Rinse bei Lebertransplantation	S. 49
4.6	Veränderungen des Glutathion-Stoffwechsels nach Lebertransplantation als protektiver Wirkmechanismus von Tacrolimus	S. 49
4.7	Voruntersuchungen des p38 MAPK-pathways	S. 51
4.8	Glutathion-Freisetzung in die Galle	S. 52
4.9	Glutathion-Freisetzung in die Blutbahn	S. 52
4.10	Gallefluss	S. 53
4.11	Lichtmikroskopie	S. 53
5.	Zusammenfassung	S. 54
6.	Abkürzungsverzeichnis	S. 55
7.	Lebenslauf	S. 57
8.	Danksagung	S. 58
9.	Literaturverzeichnis	S. 59

1. Einleitung:

1.1 Geschichte und aktuelle Probleme der Lebertransplantation

Die Lebertransplantation ist bis heute die einzige kurative Therapiemöglichkeit terminaler Lebererkrankungen. Seit der ersten erfolgreichen Lebertransplantation am Menschen durch Starzl 1963 in Denver wurden weltweit etwa 100000 Lebern verpflanzt (7). Die beachtlichen Fortschritte auf diesem Gebiet zeigen sich heute in einer 5-Jahresüberlebensrate von knapp 70% nach Transplantation(17), ein weitaus besserer Wert als beispielsweise nach vielen Tumoroperationen.

Dennoch ist die Lebertransplantation noch immer mit ungelösten Problemen konfrontiert:

Trotz verbesserter Immunsuppression entwickeln 4-8% der Organe ein akutes- und innerhalb der ersten 5 Jahre nach Operation über 30% der Organe ein chronisches Transplantatversagen (72); (16).

Hinzu kommt, dass sich das Indikationsspektrum bei der Lebertransplantation in den letzten Jahren hin zu viral bedingten Hepatitiden beziehungsweise deren Zirrhosen verlagert hat. So stellen heute Patienten mit viralen Zirrhosen eine relevante Gruppe innerhalb der zur Lebertransplantation führenden Erkrankungen dar. Reinfektionen und Rezirrhosen unter Immunsuppression stellen hierbei ein zunehmendes Problem dar, da hier unter Umständen nur eine erneute Transplantation zur Heilung führt.

Darüber hinaus führt der in Deutschland herrschende Mangel an geeigneten Spenderorganen zum einen zum Tod von Patienten auf Wartelisten (derzeit 20-30%, Quelle: DSO 2006), zum anderen zwingt er zur Transplantation sogenannter marginaler Organe. Dies sind vorgeschädigte Organe, die beispielsweise eine Leberzellverfettung aufweisen, eine lange Ischämiezeit tolerieren mussten, deren Spender ein hohes Alter hatten oder an internistischen oder neurologischen Grunderkrankungen litten und an diesen verstorben sind. Ebenfalls negativ wirken sich auf die Organqualität Intensivstationsaufenthalte oder ein länger dauernder Katecholaminbedarf des Spenders aus(16;49).

Diese Transplantate und ihre Empfänger haben zum Teil eine kürzere Überlebenszeit sowie eine erhöhte postoperative Morbidität als Empfänger guter Organe - Mängel, die aber aufgrund der herrschenden Organknappheit akzeptiert werden. Die Aufgabe der Forschung besteht hier in der Entwicklung von Strategien, die eine optimale Nutzung des bestehenden Organpools ermöglichen beziehungsweise diesen durch Nutzbarmachung von marginalen Organen vergrößern.

1.2 Pathomechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens

Die Hauptursache für Organverlust innerhalb der ersten Wochen nach Transplantation ist bei gesunden wie marginalen Organen der sogenannte Ischämie-Reperfusionsschaden(29).

Unter den Sammelbegriff Ischämie-Reperfusionsschäden (IRS) fallen Schädigungen, die durch die hypotherme Konservierung des Organs entstehen und dann nach Wiederherstellung der Blutversorgung Pathomechanismen in Gang setzen, die zu schweren Komplikationen wie Initialer Transplantat-Dysfunktion oder Primärer Transplantat-Nonfunktion führen können. Diese treten in 15-20% bzw. 5-10% der Fälle auf(49), wobei diese Ereignisse bei Transplantation geschädigter Organe nochmals deutlich ansteigen(1;8;59). Klinisch sind Transplantat-Non- bzw. Dysfunktion charakterisiert durch signifikante Transaminasenanstiege auf über 6000-8000 beziehungsweise über 2500 U/l, Gerinnungsversagen, metabolische Entgleisungen und Störungen des Säure-Basen-Haushaltes(49). Während sich bei der initialen Transplantatdysfunktion die Organe in 70 % der Fälle wieder erholen, verlieren diese bei der Primären Transplantat-Nonfunktion ihre Funktion irreversibel und der Patient kann nur durch eine Retransplantation gerettet werden. Die Inzidenz des primären Transplantatversagens korreliert dabei nicht zuletzt mit der Dauer der Kaltlagerung(18).

Die Pathomechanismen von Ischämie-Reperfusionsschäden sind mittlerweile gut charakterisiert: Während der **Kaltlagerung** kommt es zur Verarmung der Zellen an energiereichen Phosphaten, was wiederum zum Stillstand von Ionenpumpen in Zellmembranen führt. Die Zellen schwellen durch den Einstrom von Natrium-Ionen an, wodurch während der Reperfusion u.a. die Mikrozirkulation behindert wird. Ansteigende intrazelluläre Kalzium-Spiegel aktivieren zusätzlich Matrix-Metalloproteinasen, die das Zytoskelett der Leber beschädigen(27;28).

Während der **Reperfusion** produzieren in einer initialen Phase Kupffer-Zellen über eine membranständige NADPH-Oxidase radikale Sauerstoffspezies (ROS)(25;30), die einerseits unspezifisch Lipide peroxidieren oder DNA schädigen, andererseits spezifisch über die Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie NF-kappaB oder AP-1 zur verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1(14;31;68) oder P-Selektin(21;39;70) führen, was zusammen mit der Aktivierung entsprechender Entzündungskaskaden(10) zu einer verstärkten Leukozytenadhärenz führt(30). Seinen Höhepunkt erreicht dieses Geschehen circa 6-8 Stunden nach Beginn der Reperfusion. Die eingewanderten Leukozyten sezernieren nun ihrerseits diverse Zytokine und ROS, was eine

lokale und systemische Entzündungsreaktion und Mikrozirkulationsstörungen bewirkt und damit in der Konsequenz zum Transplantatverlust führen kann. (s. Abb. 1)

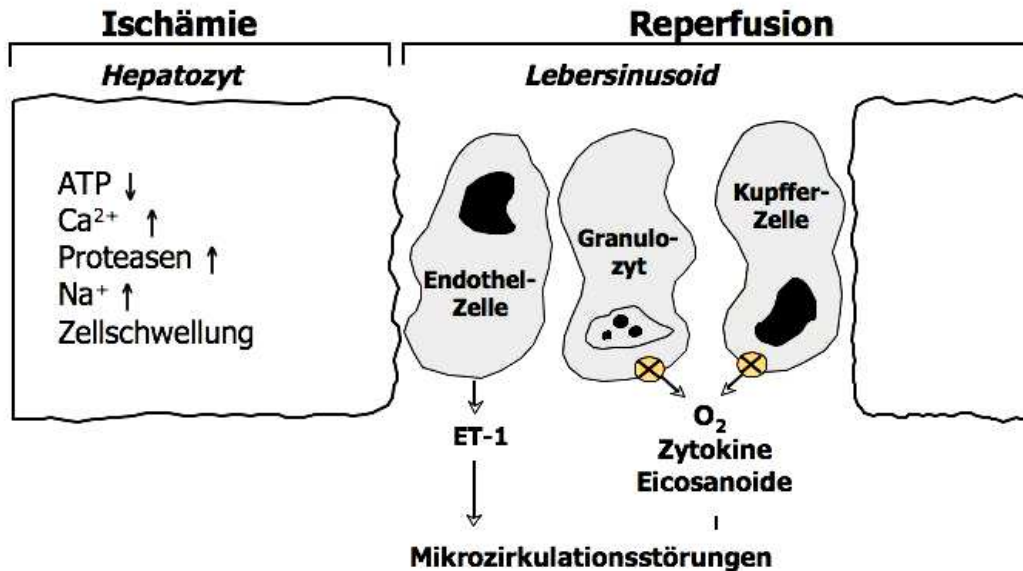


Abb.1. Pathomechanismen von Ischämie-Reperfusionsschäden

Neben der Organschädigung durch Nekrose spielen nach neuesten Erkenntnissen bei Ischämie-Reperfusionsschäden auch apoptotische Prozesse an Hepatozyten und Sinusendothelzellen eine bedeutende Rolle(24;32), die klinische Relevanz dieses Phänomens ist jedoch nicht abschließend geklärt.

1.3 Experimentelle Therapieansätze bei Ischämie-Reperfusionsschäden

Es handelt sich beim Ischämie-Reperfusionsschaden also um ein multifaktorielles Geschehen und entsprechend bieten sich – zumindest theoretisch – viele Ansätze an, diesen zu minimieren.

Neben antioxidativen Ansätzen, wie beispielsweise der hoch wirksamen und in klinischer Erprobung stehenden postischämischen Glutathionbehandlung(56;58) oder der Gabe von Tocopherol(62) wurden auch interessante experimentelle Ansätze unternommen, den Ischämie-Reperfusionsschaden durch eine Veränderung der Genexpression im Transplantat zu vermindern. Hierzu zählen unter anderem die vektorielle Transfektion mit Superoxiddismutase(42), wiederum ein antioxidativer Ansatz, die Reduktion apoptotischer Prozesse mittels bcl-2-Transfektion(51) oder die Modulation von NFκB(46;64).

Medikamentös:

Chloroquin	Kayawake et al., 1982
Chlorpromazin	Chien et al., 1978; Churchill et al., 1995
Tocopherol	Soltys et al., 2001
Glutathion	Schauer et al., 2004
Allopurinol	Fernandez et al., 2002
Anti-TNF α Antikörper	Colletti et al., 1990
NO	Serafin et al., 2002
Anti-ICAM-1 Antikörper	Farhood et al., 1995
Anti-P-Selektin Antikörper	Peralta et al., 2001

Konservierungslösung:

UW+Adenosin	Busuttil, 2003
-------------	----------------

Transfektion:

SOD Transfektion (ROS-Scavenging)	Fan et al., 1999
Bcl-2 Transfektion (Apoptose-Inhibition)	Rentsch M., 2005
NFkB-Modulation	Okaya, 2005
Adenovirale SOD-Erhöhung	Lehmann et al., 2003

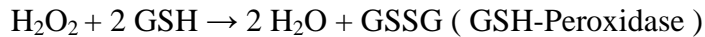
Tabelle 1: Experimentelle Therapieansätze von Ischämie-Reperfusionsschäden der Leber

1.4 Glutathion als Therapeutikum und Mediator des Ischämie-Reperfusionsschadens

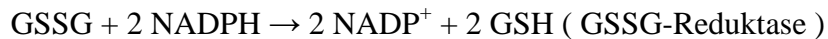
Unsere Arbeitsgruppe konnte die zentrale Rolle von ROS beim Ischämie-Reperfusionsschaden durch die hoch wirksame postischämische Gabe von Glutathion als Radikalfänger in Modellen der warmen und kalten Ischämie an normalen und verfetteten Lebern eindrucksvoll unter Beweis stellen: Exogen zugeführtes Glutathion entgiftet ROS im Sinusoidalraum, also am Ort ihrer Freisetzung durch Kupfferzellen und Granulozyten, und führt zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens. Während im Blut physiologisch geringe Konzentrationen an reduziertem Glutathion vorliegen, besitzen Hepatozyten um den Faktor 1000 höhere Mengen an intrazellulärem Glutathion zur Entgiftung von ROS(6).

Die enzymatisch von Glutathion katalysierten Reaktionen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Initial von Kupferzellen gebildetes O_2^- (Superoxidanion) wird über Superoxiddismutase (SOD) zu H_2O_2 umgebaut, welches enzymatisch über die GSH-Peroxidase und die Oxidation von GSH zu GSSG entgiftet wird:



GSSG wird wiederum NADPH-abhängig über die GSSG-Reduktase zu GSH reduziert:



Daneben reagiert Glutathion aber auch nicht-enzymatisch mit praktisch allen Formen von ROS, was es intrazellulär zu einem wirksamen endogenen- und extrazellulär bei therapeutischer Zufuhr zu einem ebenso wirksamen Radikalfänger macht(5;55).

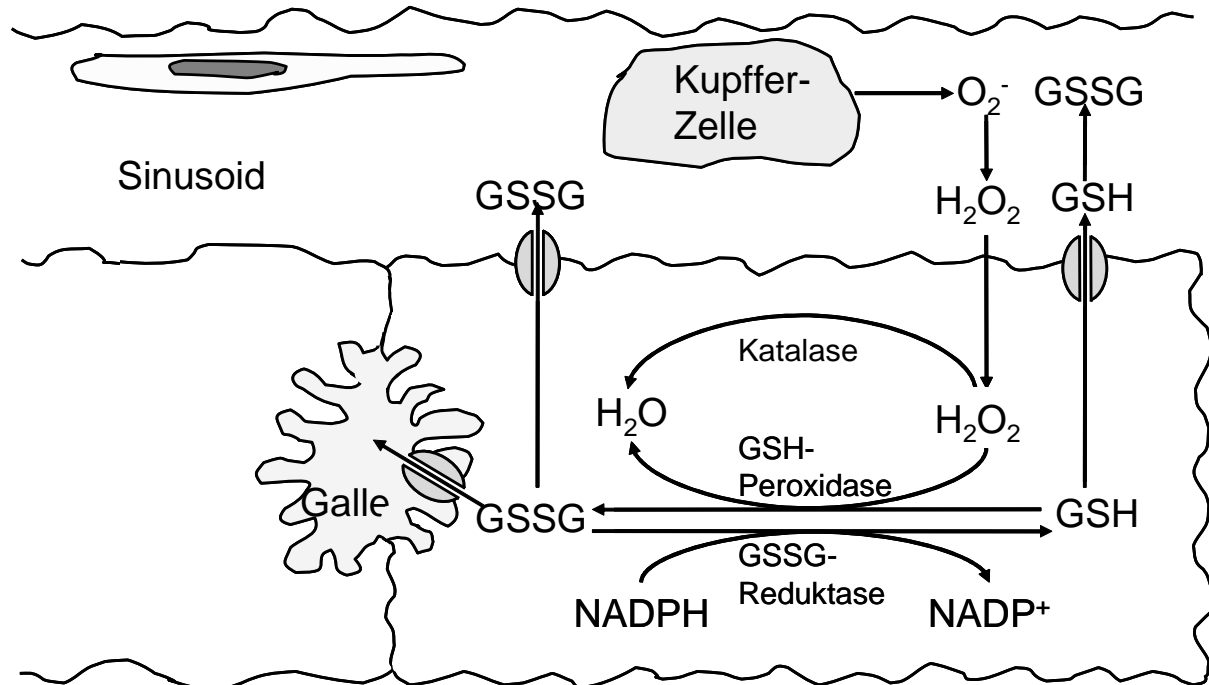


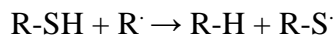
Abb.2. Glutathion-Stoffwechsel und ROS-Entgiftung der Leberzelle

In den letzten Jahren mehren sich dabei die Hinweise, dass es sich bei Glutathion nicht nur um ein potentes Antioxidans handelt, sondern dass der körpereigenen Glutathion-Homöostase

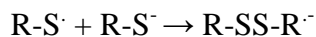
selbst eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Ischämie-Reperfusionsschäden zukommt(23).

Dabei können SH-Gruppen, deren größtes intrazelluläres Reservoir Glutathion darstellt, bei Anwesenheit hoher Konzentrationen von ROS - wie bei Ischämie und Reperfusion - über die Bildung toxischer *Thiylradikale* Radikalkettenreaktionen anstossen, in deren Verlauf toxisches Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 entstehen(12).

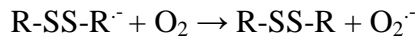
Thiolgruppen verschiedener Proteine (R-SH), deren größtes intrazelluläres Reservoir Glutathion darstellt, reagieren mit ROS (R^{\cdot}) unter Bildung hochreaktiver Thiylradikale ($R-S^{\cdot}$):



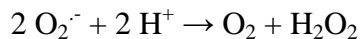
In einem weiteren Schritt reagieren Thiylradikale mit Thiolatanionen ($R-S^-$) zu Disulfid-Radikal-Anion ($RSSR^{\cdot-}$):



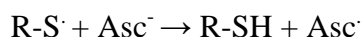
Disulfid-Radikal-Anion ($RSSR^{\cdot-}$) reagiert in einem weiteren Schritt mit O_2 zu Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$):



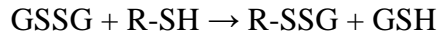
Vermittelt durch Superoxiddismutase (SOD) wird Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) zu H_2O_2 umgewandelt, welches anschließend wiederum durch Glutathionperoxidase unter Oxidation von GSH zu GSSG zu H_2O abgebaut wird (s.o.):



Darüberhinaus werden Thiylradikale ($R-S^{\cdot}$) unter Bildung toxischer Ascorbinsäureradikale entgiftet:



Das bei oxidativem Stress vermehrt entstehende GSSG bildet nach folgender Formel unspezifisch Disulfidbrücken mit SH-Gruppen verschiedener Proteine aus, die dadurch in ihrer Funktion verändert werden(12):



Außerdem spielt Glutathion eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von Medikamenten und Giftstoffen(38) sowie bei der Zellzyklusprogression(2).

1.5 Überlegungen zur Wahl eines Therapeutikums des Ischämie-Reperfusionsschadens und dessen Anwendung

Ziel unserer Arbeitsgruppe war immer die Entwicklung von Therapieformen des Ischämie-Reperfusionsschadens, die sich zeitnah und einfach vom Experiment in die Klinik übertragen lassen, was mit der postischämischen Glutathiongabe bereits gelungen ist, die sich zur Zeit in klinischer Erprobung befindet.

Um kurz- oder mittelfristig ein Medikament zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens routinemässig klinisch einsetzen zu können, sollte dieses neben seiner nachgewiesenen Wirksamkeit in irgendeiner Form in klinischem Einsatz stehen, bereits eine Zulassung, einen günstigen Preis sowie geringe Nebenwirkungen besitzen.

Darüber hinaus sollte das Agens erst während oder nach der Ischämie, d.h. *nach* der Explantation zum Einsatz kommen, was nachfolgend erläutert werden soll:

In vielen erfolgreichen tierexperimentellen Ansätzen wie beispielsweise dem Gentransfer von SOD oder bcl-2 beginnt die Präkonditionierung des Spenders zum Teil mehrere Tage vor der Explantation(26;51). Übertragen auf die klinische Situation würde dies die künstliche Verlängerung eines Intensivstationsaufenthaltes nach Feststellen des Hirntods bis zur Organentnahme erfordern, um die Behandlung überhaupt durchführen zu können, was somit nicht praktikabel ist. Die protektiven Effekte der verabreichten Substanz würden durch die zuvor beschriebenen schädigenden Wirkungen eines Intensivaufenthaltes oder einer länger dauernden Katecholamingabe auf die Organqualität(16;49) unter Umständen konterkariert werden. Um dieses Problem zu umgehen, müsste mit der Präkonditionierung der Patienten bereits vor Feststellen des Hirntodes „auf Verdacht“ begonnen werden, was selbstverständlich nicht möglich ist. Ein weiteres Problem bei einer systemischen Behandlung von Organspendern (auch nach festgestelltem Hirntod) entsteht aus der „Mitbehandlung“ der anderen zu explantierenden Organe, die die Zustimmung der beteiligten Transplantationsteams bezüglich „ihres“ Organs erfordert. Erschwerend kommt hinzu, dass alle Therapieansätze des Ischämie-Reperfusionsschadens zur Zeit nur im Rahmen von Studien zum Einsatz kommen, also der Genehmigung durch Ethikkommissionen und der Einhaltung regional unterschiedlicher administrativer Regularien bedürfen. Man stelle sich am Beispiel

von Eurotransplant die Folgen vor, die die systemische Konditionierung eines *Organspenders* hätte: Nach Entnahme der vorbehandelten Organe kämen unzählige Patienten an verschiedenen Orten als Empfänger der Organe in Frage. Im Prinzip müssten daher an allen Transplantationszentren entsprechende Studien etabliert werden, in die sämtliche Patienten, die auf ein Organ warten, aufgenommen werden müssten. Selbst Veränderungen der Perfusionslösung wären unter diesem Aspekt von fraglichem Nutzen. Der entstehende Aufwand wäre enorm und die Durchführbarkeit eines solchen Projektes unklar.

Die Behandlung des *Organempfängers* bzw. des explantierten Organs ist daher im Moment die wahrscheinlich einzig praktikable Option zur Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens. Eine Ausnahme hiervon bildet gegebenenfalls nur die Lebendspende.

1.6 Tacrolimus als Therapeutikum des Ischämie-Reperfusionsschadens

Diese Überlegungen lenkten unsere Aufmerksamkeit auf eine Substanz, deren hemmende Wirkung auf Ischämie-Reperfusionsschäden bereits bekannt ist, was jedoch in eben jenen Modellen gezeigt wurde, in denen ausschließlich Spender präkonditioniert wurden: FK 506 oder Tacrolimus verringert bei Gabe beim Spender Organschäden nach Transplantation(35-37;52). In zahlreichen Arbeiten konnte dieser Effekt gleichermassen für Leber, Lunge, Herz und Nieren gezeigt werden(40;67;71;73).

Tacrolimus ist in seiner eigentlichen Indikation ein Immunsuppressivum aus der Klasse der Calcineurin-Inhibitoren, das heute routinemässig nach Lebertransplantation eingesetzt wird. Tacrolimus wirkt als Immunsuppressivum über eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung. Es bindet intrazellulär über das FK-binding protein (FKBP) an den Calcineurin-Calmodulin-Komplex (s.Abb.3), der an der Calcium-abhängigen Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NF-AT (nuclear factor of activated T-cells) beteiligt ist. Sein Transkriptionsprodukt - IL 2 - ist massgeblich an der T-Zell-Aktivierung beteiligt(3;69).

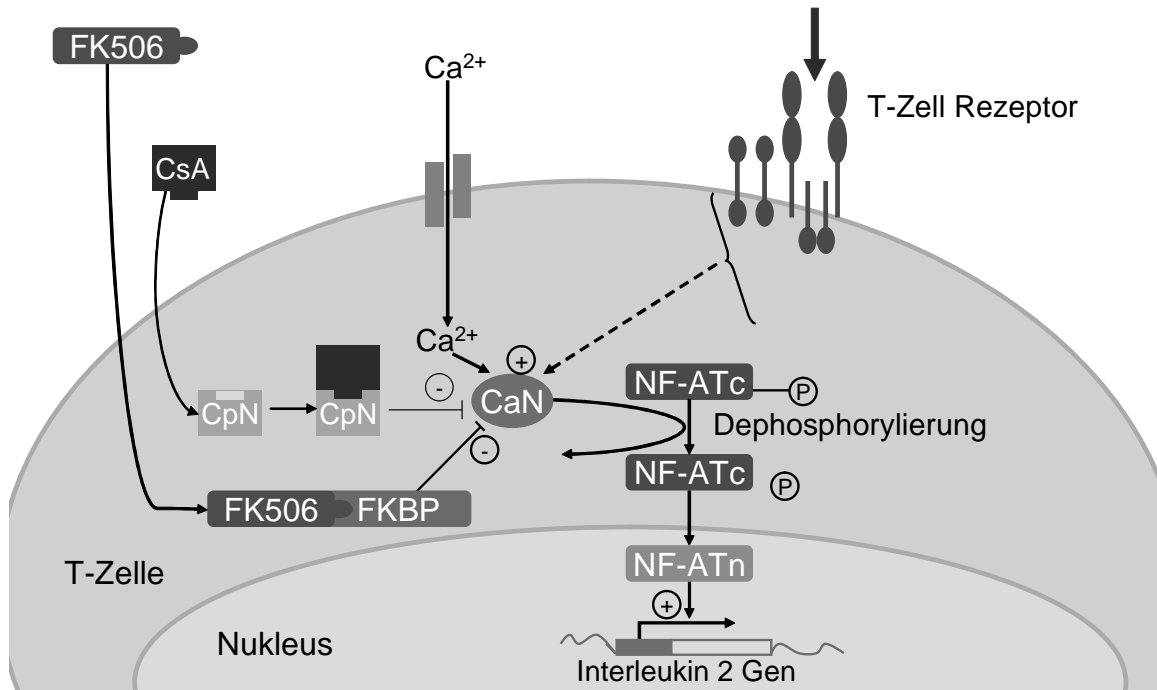


Abb.3: Wirkmechanismus von Tacrolimus/FK 506

Nach: *Expert Reviews in Molecular Medicine*; Cambridge University Press 2000

Als Ursache für die beschriebenen protektiven Wirkungen von Tacrolimus auf IRS wird u.a. eine Verbesserung der hepatischen Mikrozirkulation diskutiert(36), vermittelt durch eine verminderte Expression von Endothelin-1(61). Weiterhin konnten eine Erhöhung des intrazellulären ATP-Gehalts sowie eine verbesserte mitochondriale Funktion nach Ischämie und Reperfusion gezeigt werden(33). Wenngleich die Mechanismen nicht abschliessend geklärt sind, konnte eine Reduktion der ROS-Produktion nach kalter Ischämie und Reperfusion bei Tacrolimus-behandelten Lebern nachgewiesen werden(20;37). Diese Effekte wurden jedoch in experimentellen Modellen der Spenderpräkonditionierung untersucht.

Eine amerikanische Arbeitsgruppe konnte in einer klinischen Pilot-Studie zeigen, dass auch eine *postschämische* Tacrolimus-Behandlung protektive Wirkung auf den Ischämie-Reperfusionsschaden entfaltet. Dabei wurde der Spüllösung, mit der die kaliumhaltige und kardioplegische Perfusions- und Lagerungslösung ausgewaschen wird, Tacrolimus in einer Konzentration von 20 ng/ml zugefügt. Eine FK-Zufuhr über das übliche immunsuppressive Regime hinaus fand während der Reperfusion nicht statt. Bereits eine circa 10-minütige Kontaktzeit des Transplantats mit FK 506 unmittelbar vor Reperfusion reichte aus, um einen

signifikant niedrigeren Transaminasenanstieg zu erzielen. Die zugrunde liegenden Mechanismen blieben unklar und wurden nicht untersucht (63)(Abb.4).

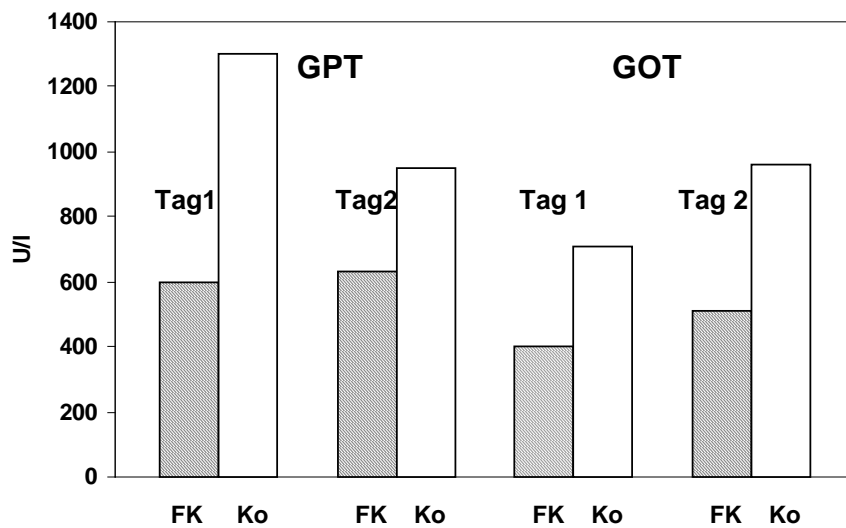


Abb.4. Reduktion des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens durch Tacrolimus-Rinse beim Menschen. Nach: St. Peter et al, Liver Transplantation 2003

Unser Ziel war daher, diese Ergebnisse in einem tierexperimentellen Modell zu prüfen und nach Ursachen für die protektive Wirkung der Tacrolimus-Rinse zu suchen.

Dazu benutzte unsere Arbeitsgruppe zwei Modelle: Die extrakorporale Perfusion der Rattenleber sowie die orthotope Lebertransplantation ebenfalls an der Ratte.

1.7 Vorversuche am isoliert perfundierten Modell der Rattenleber

Bei Vorversuchen in Zusammenarbeit mit PD Dr. Manfred Bilzer untersuchte unsere Arbeitsgruppe zunächst die Tacrolimus-Wirkung am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber. Dabei wurde dem Perfusat Tacrolimus über 10 Minuten in einer Konzentration von 10- bzw. 50 ng/ml zugesetzt. Nach weiteren 30 Minuten wurde dem Perfusat H_2O_2 in einer Konzentration von 0,5 mM beigemischt, um den während der Reperfusion herrschenden oxidativen Stress zu simulieren. Anschliessend wurde als Maß für den entstandenen zellulären Leberschadens die LDH im Effluat gemessen .

Die H_2O_2 -Perfusion führte zu einem massiven Anstieg der LDH, dieser wurde jedoch durch eine vorhergehende Perfusion mit Tacrolimus dosisabhängig verringert. (Abb.xyz).

Diese Ergebnisse deuteten auf eine Übertragbarkeit der klinischen Daten der amerikanischen Arbeitsgruppe in ein experimentelles Modell hin. Die Komplexität der während Ischämie und Reperfusion ablaufenden Prozesse wird jedoch in einem artifiziellen Modell wie der isolierten Organperfusion nur unzureichend wiedergegeben.

Daher war der nächste Schritt, die Tacrolimus-Rinse im Modell der experimentellen Transplantation an der Rattenleber zu untersuchen. Daher formulierten wir folgende

1.8 Fragestellung:

1. Verringert die postischämische Spülung der Leber mit Tacrolimus den Ischämie-Reperfusionsschaden in einem Modell der experimentellen Rattenlebertransplantation?
2. Besteht eine Dosisabhängigkeit der protektiven Wirkung in diesem Modell?
3. Können die der Protektion zugrunde liegenden Mechanismen abgeleitet werden?

2. Material und Methoden:

2.1 Isolierte Organperfusion der Leber

2.1.1 Operative Technik:

Männliche Sprague-Dawley-Ratten (200-250g) (Charles-River Wiga GmbH, Sulzfeld) wurden in einem klimatisierten Raum bei einem 12 Stunden hell-dunkel Zyklus gehalten. Bis zum Versuchsbeginn erhielten die Tiere uneingeschränkt Wasser und Standardfutter (Altromin, Lage). Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Pentobarbitalinjektion (50 mg Nembutal/ kg Körpergewicht) anästhesiert. Nach Injektion von 250 IU Heparin in die Vena femoralis erfolgte die Laparotomie zur Darstellung der Leberpforte und Vena cava inferior. Bei erhaltenem Blutkreislauf wurde die Pfortader mit einem Polyethylen-Tubus (16 G) kanüliert und die Leber umgehend mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert (30-33ml/min). Ein ausreichender Perfusatabfluss wurde durch Inzision der Aorta abdominalis sichergestellt. Danach erfolgte die Thorakotomie zur Kanülierung der Vena cava inferior über den rechten Herzvorhof. Anschließend wurde die Vena cava inferior oberhalb des Abganges der Nierenvenen und unterhalb der Lebervenen ligiert. Hierdurch wurde das venöse Leberperfusat ausschließlich über die in der Vena cava inferior platzierte Kanüle abgeleitet. Zur Ableitung der Galle wurde der Ductus choledochus mit einem Polyethylen-Katheter (Länge 5 cm, Innendurchmesser 0,4mm) kanüliert.

Die volumenkonstante, nicht rezirkulierende Perfusion erfolgte ausschließlich über die Pfortader (Abb.5). Der Perfusatdurchfluß durch die Leber betrug 3,0-3,5ml/ min/ g Leber. Zur Leberperfusion wurde ein Hämoglobin- und Albumin- freier Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) verwendet, der durch einen thermostatisierten Schlauchoxygenator mit Carbogen (O₂ 95%, CO₂ 5%) begast und auf eine Temperatur von 37° C erwärmt wurde. Der Schlauchoxygenator bestand aus einem 15m langen Silikonschlauch (Wandstärke 0,2mm, Innendurchmesser 2 mm), der um einen thermostatisierten Aluminiumblock gewickelt war. Diese Einheit befand sich in einer isolierten Plexiglaskammer, die mit Carbogen begast wurde. Substanzzugaben erfolgten über Infusionspumpen in das zufließende Perfusat vor Eintritt in eine Blasenfalle (Volumen 10 ml), die circa 20 cm vor der Pfortaderkanüle platziert war. Hierdurch wurde bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 200-400µl/min eine homogene Lösung der zugeführten Stammlösungen sichergestellt. Die Anordnung der verschiedenen Elemente der Perfusionsanlage ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Galle- und Perfusatproben

wurden in Eppendorf-Cups gesammelt und bis zur Analyse im Eisbad aufbewahrt. Am Ende der Experimente wurde das Feuchtgewicht der Leber bestimmt.

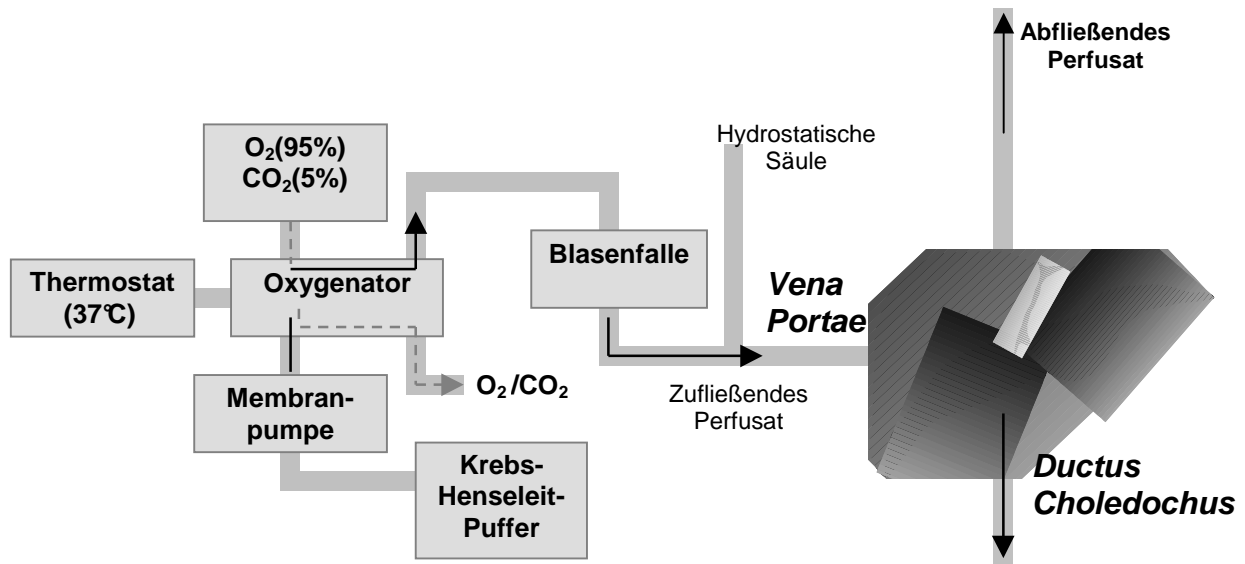


Abb. 5: Versuchsanordnung isoliert perfundiertes Modell der Rattenleber

2.1.2 Versuchsprotokoll:

Lebern wurden über 100 Minuten in der oben beschriebenen Weise in-situ perfundiert. In der Kontrollgruppe wurden die Lebern mit Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert, in den Interventionsgruppen wurde dem Perfusat über 10 Minuten Tacrolimus in einer Konzentration von 10- bzw. 50 ng/ml zugefügt. Nach weiteren 30 Minuten wurde dem Perfusat für 10 Minuten H₂O₂ in einer Konzentration von 0,5 mM beigemischt, um den während der Reperfusion herrschenden oxidativen Stress zu simulieren. Anschliessend wurde als Maß für den entstandenen zellulären Leberschadens die LDH im Effluat gemessen (Abb.6).

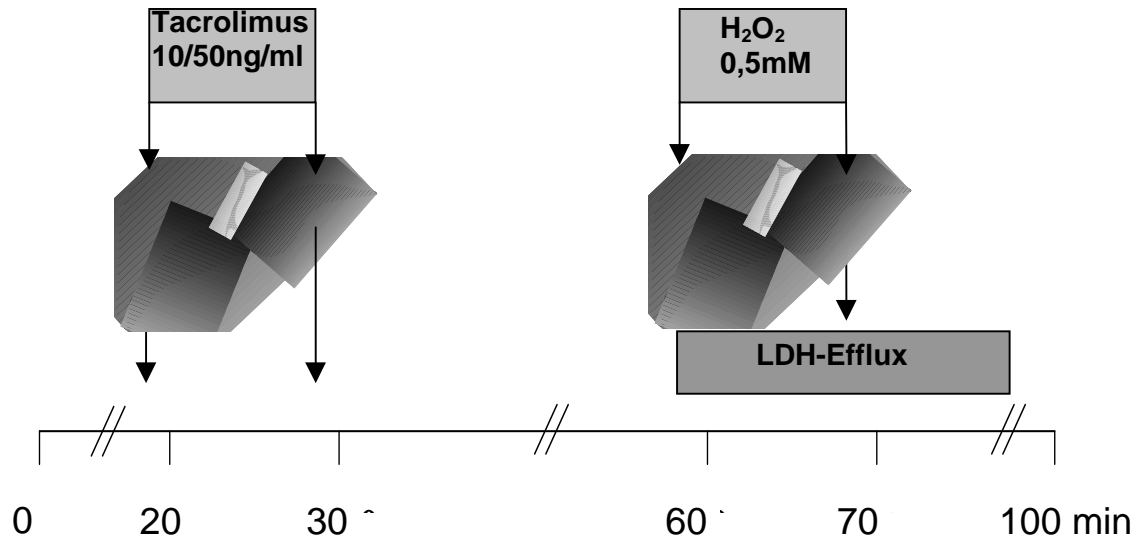


Abb. 6: Versuchsprotokoll isoliert perfundiertes Modell der Rattenleber

2.2 Orthotope Lebertransplantation

2.2.2 Operative Techniken

Die Durchführung der Versuche wurde von der Regierung von Oberbayern mit dem Aktenzeichen 89/05 genehmigt. Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden männliche Lewisratten mit einem Gewicht von 250-280g und einem Alter von 10-12 Wochen aus der Versuchstierzucht Charles-River Wiga, Sulzfeld, Deutschland, verwendet. Die Versuchstiere wurden in Doppelkäfigen bei zwölfstündigem Hell-Dunkelzyklus, einer autoregulierten Raumtemperatur von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Standarddiät wurde von der Firma Sniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland bezogen und enthielt folgende Inhaltsstoffe: Rohprotein (19%), Methionin (0,3%), Lysin (1,0%), Rohfett (3,0%), Rohfaser (5,2%), Rohasche (6,7%), Calcium (1,1%), Phosphor (0,8%), Natrium (0,25%), Magnesium (0,2%). Pro Kilogramm Futter waren an Zusatzstoffen enthalten: Vitamin A (18000IE), Vitamin D 3 (1280IE) und Vitamin E (120 mg). Bei den Empfänger-, nicht jedoch bei den Spendertieren wurde vor Operation eine zwölfstündige Nahrungskarenz bei freiem Zugang zu Wasser eingehalten. Die Transplantationen wurden modifiziert nach Kamada und Calne(34) durchgeführt.

Zunächst wurde den Tieren Atropinsulfat in einer Konzentration von 0,2mg/kg Körpergewicht zur Reduktion der narkosebedingten bronchialen Hypersekretion und zur Prophylaxe eines Laryngospasmus subcutan injiziert. Anschliessend wurde eine Äthernarkose (Äther für Narkose, Fa. Hoechst, Frankfurt) unter ständiger Kontrolle der Vitalfunktionen induziert. Am betäubten Tier erfolgte dann die Rasur des Bauchfells sowie des Fells am Hals mit nachfolgender alkoholischer Desinfektion. Die Operationen fanden unter sauberen, jedoch nicht aseptischen Bedingungen statt. Verwendet wurde dazu ein Operationsmikroskop der Firma Zeiss. Die Ratten wurden in Rückenlage auf einem speziell entwickelten Operationstisch mit integriertem Heizteil (Fa. Effenberger, München) unter Fixierung der vier Extremitäten an atraumatischen Haltemagneten gelagert. Die Körpertemperatur wurde über eine rektal eingeführte Thermosonde, die an das Wärmeaggregat mit einem Rückkoppelungs-Steuerungsmechanismus angeschlossen war, kontinuierlich gemessen und zwischen 36,5°C und 37,5°C konstant gehalten. Die Narkoseführung erfolgte im offenen System mit einer dem Kopf des Versuchstieres vorgelagerten Atemmaske, die mit einer Äther-getränkten Kompresse bestückt war. Zusätzlich erfolgte über eine getrennte Sauerstoffleitung die Zufuhr von 4 l O₂/min. Zum kontinuierlichen Monitoring des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz, sowie zur Entnahme von Blut und zur Injektion von Pharmaka wurde in die linke A. carotis communis ein Polyethylen-Verweilkatheter (PE 50, Aussen-/Innendurchmesser 0,96/0,58 mm, Fa. Portex, Hythe, England) platziert. Der Blutdruck wurde über einen Druckaufnehmer (Statham Gould, Verstärker Typ 864, Fa. Siemens, München) als MAP-Wert wiedergegeben. Ein weiterer Katheter (PE 50) wurde zur Applikation von Pharmaka und Farbstoffen in die linke Vena jugularis interna implantiert. Die perioperative Infusionstherapie orientierte sich an Blutverlust und MAP und wurde mit steriler Vollelektrolytlösung (Tutofusin, Fa. Baxter, Unterschleissheim, Deutschland) und 5-prozentiger Humanalbuminlösung (Humanalbumin, Fa. Baxter, Unterschleissheim, Deutschland) durchgeführt. Anhand der Blutgaswerte (arterieller pO₂, pCO₂, pH und Standard Base Excess) wurde der Säure-Basen-Haushalt der Tiere regelmäßig kontrolliert und, sofern nötig, durch Gabe von NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4%, Fa. Delta-Pharm, Pfullingen) korrigiert. Die Katheter wurden durch kontinuierliche Infusion von Vollelektrolytlösung (Tutofusin, Fa. Baxter, Unterschleissheim) mit jeweils 2 ml / Stunde während der gesamten Operation offen gehalten. Diese Infusion diente gleichzeitig der basalen Substitution des Volumenverlustes durch Verdunstung über die Laparotomie und die durchgeführten Blutentnahmen.

2.1.2 Spenderoperation:

Die Operationen wurden modifiziert nach Kamada et al. durchgeführt(34).

Nach alkoholischer Desinfektion wurde das Abdomen mit einer queren Oberbauchlaparotomie eröffnet und die epigastrischen Gefäße koaguliert. Das Operationsfeld wurde nach kranial durch Setzen eines Klemmchens auf den Processus xiphoideus offengehalten, nach lateral mit speziell gefertigten Haken-Retraktoren. Hierdurch ergab sich eine breite Exposition des gesamten Oberbauches. Anschließend wurde die Leber mobilisiert mit Durchtrennung aller ligamentären Verbindungen und Koagulation einer regelhaft zwischen Ösophagus und dem linken Leberlappen verlaufenden Arterie. Die linke Zwerchfellvene wurde durch Koagulation oder Ligatur versorgt, die rechte Vena suprarenalis wurde koaguliert. Bei sämtlichen weiteren Operationsschritten wurde die Leber zum Schutz vor unbeabsichtigten Läsionen sowie vor Austrocknung mit einer angefeuchteten Frischhaltefolie abgedeckt. Zur besseren Exposition des Leberhilus wurde das Duodenum mobilisiert und anschließend der gesamte Dünndarm ohne Zug am Mesenterium nach links-lateral ausgelagert und mit feuchter Frischhaltefolie bedeckt. Zur Messung der basalen Galleproduktion über 15 Minuten wurde der Ductus choledochus dargestellt, distal ligiert und zentral mit einem Polyethylenkatheter (PE 50, Aussen-/Innendurchmesser 0,80/0,40mm, Fa. Portex, England) kanüliert. Anschließend wurde die Arteria gastroduodenalis abgangsnah an der Arteria hepatica ligiert sowie eine Ligatur um den rechten Nierenstiel vorgelegt. Die Aorta wurde oberhalb des Abgangs des Truncus coeliacus unterfahren und eine Ligatur wiederum nur vorgelegt, jedoch noch nicht zugezogen, zusätzlich wurde eine systemische Heparinisierung mit 200 IE Heparin über eine Punktion der Vena cava inferior durchgeführt. Zur Perfusion der Leber wurde eine Venenverweilkanüle (18G, Fa Abboth, Wiesbaden) in die Aorta abdominalis eingeführt. Danach startete die retrograde aortale Perfusion der Bauchorgane mit 15ml 4°C kalter University-of-Wisconsin-Lösung (UW) (Fa. Via Span, Du Pont, Bad Homburg) mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 100 ml/h, wodurch annähernd physiologische mittlere arterielle Blutdruckwerte von 70-80 mmHg erreicht wurden. Unmittelbar nach Beginn der Perfusion wurden die vorgelegten Ligaturen um den rechten Nierenstiel sowie um die Aorta abdominalis zugezogen und die Vena cava unterhalb der Nierenvene sowie zwischen Leber und Zwerchfell durch eine breite Inzision eröffnet. Die Narkosetiefe wurde nun vertieft, sodass das Tier in tiefer Äthernarkose ausblutete. Während der UW-Perfusion wurde gleichzeitig die Leberoberfläche mit 4°C kalter Ringer-Laktat-Lösung gekühlt. Zur anschließenden Hepatektomie wurde die bei der Ratte innerhalb der

Leber verlaufende Vena cava inferior oberhalb der Leber am Zwerchfelldurchtritt, unterhalb der Leber auf Abgangshöhe der rechten Nierenvene durchtrennt. Von der Pfortader wurde ein möglichst langes Segment exzidiert, der arterielle Zufluss der Leber wurde inklusive Truncus coeliacus und dem entsprechenden Stück der Aorta entnommen.

2.1.3 Kaltpräparation und Konservierung:

Sofort nach Hepatektomie wurde die Leber zunächst gewogen und anschließend zur Kaltpräparation in eine Schale mit 50 ml eisgekühlter UW-Lösung gelegt, die wiederum in einer Schale mit Eis zur Kühlung gelagert war. Mithilfe der Cuff-Technik (Abb.7) wurde der infrahepatischen Vena cava sowie der Pfortader ein jeweils auf wenige Millimeter zugeschnittenes zirkuläres Teilstück einer Venenverweilkanüle (Größe 13G beziehungsweise 14G, Fa. Abbott, Wiesbaden) mit exzentrischer Verlängerung als Haltehilfe angelegt, indem

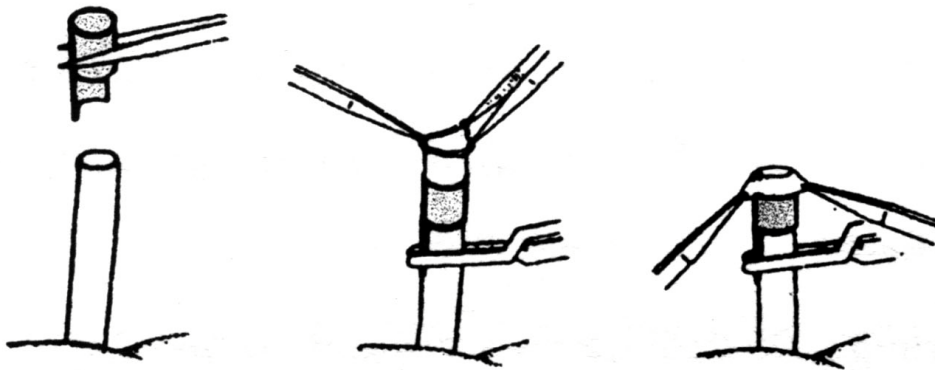


Abb.7. Anbringen der Gefäss-Cuffs auf Spenderseite

das Gefäß durch die Kanüle gezogen, nach außen umgestülpt und mit einer zirkulären Ligatur fixiert wurde.

Nach Abpräparation sämtlicher Bindegewebsanteile von der Leber wurden im Bereich des arteriellen Zuflusses die Gefäßstümpfe der Arteria lienalis und der Arteria gastrica sinistra ligiert sowie das aortale Segment als rechteckiger Patch zurechtgeschnitten. An der Pfortader wurden Vena coronaria ventriculi/pylorica, Vena lienalis und Vena mesenterica inferior mit Ligaturen versorgt und abgesetzt. Nach Abschluss der Kaltpräparation wurde die Leber in einer mit 50 ml frischer UW-Lösung gefüllten Schale in einem Temperatur-kontrollierten Kühlschranks bei konstant 4°C über 24h gelagert.

2.1.4 Empfängeroperation

Die Präparation und Kanülierung der Halsgefäße erfolgte wie bei der Spenderoperation, gefolgt von einer medianen Oberbauchlaparotomie. Als erster Präparationsschritt im Situs wurde der Ductus choledochus im Leberhilus dargestellt und hilusnah koaguliert. Arteria hepatica propria und Arteria gastroduodenalis wurden jeweils dargestellt, doppelt ligiert und durchtrennt, sodass sich zusammen mit der zuführenden Arteria hepatica communis eine Y-förmige Struktur ergab, deren Basis, die Arteria hepatica communis, unter besonders vorsichtiger Schonung der parallel verlaufenden Vena coronaria ventriculi, mobilisiert und unter dem Ligamentum hepatoduodenale nach kaudal-medial durchgezogen wurde. Die Arteria hepatica communis wurde nun mit einem Mikroclip verschlossen und die Aufzweigung von Arteria hepatica propria und Arteria gastroduodenalis längs eröffnet. Dieses zuvor beschriebene „Y“ wurde nun zur Einführung eines Polyethylen-Stents (PE 60 , Fa. Portex, England) folgendermaßen aufgespannt: Die Arteria gastroduodenalis wurde am Fadenende der sie verschließenden Ligatur mit einem Klemmchen, das auf einem Magnethalter befestigt war, fixiert. Die Arteria hepatica propria wurde mit einer in der linken Hand ruhenden Pinzette an der Ligatur gefasst und somit das „Y“ aufgespannt, sodass mit der rechten Hand der Polyethylenstent in die Arteria hepatica communis eingeführt werden konnte. Dieser wurde anschließend mit einer Ligatur fixiert. Es folgten das Unterfahren der Vena cava inferior zwischen Zwerchfell und Leber, die Präparation und Mobilisation der Pfortaderaufzweigung im Leberhilus sowie die Präparation und Mobilisation der infrahepatischen Vena cava bis zur Einmündung der rechten Nierenvene.

Die Spenderleber wurde nun mit 20 ml 4°C kalter 0,9-prozentiger NaCl-Lösung (Fa. B. Braun, Melsungen) und einem Perfusionsdruck von 10 cm Wassersäule ausgespült und die stark kaliumhaltige UW-Lösung ausgewaschen.

In den Interventionsgruppen wurde der Perfusionslösung Tacrolimus (Fa. Astellas Deutschland, München) in einer Konzentration von 10 oder 50 ng/ml zugegeben. Parallel dazu begann die anhepatische Phase durch Abklemmen der suprahepatischen Vena cava mit einer speziell gefertigten Satinsky-Klemme sowie der infrahepatischen Vena cava und der Pfortader mit einem Mikroclip. Aufgrund des hepatischen Metabolismus von Äther wurde die Äthermaske entfernt und die Tiere atmeten nun reinen Sauerstoff (4 l/min). Es folgte die Hepatektomie mit Erhaltung langer empfängerseitiger Gefäßstümpfe zur späteren Anastomosierung. Zunächst wurde die suprahepatische Cava-Anastomose mit fortlaufender

8,0 Prolenenaht bei zehnfacher Vergrößerung hergestellt. Es folgte die nahtfreie Cuff-Anastomosierung der Pfortader und der infrahepatischen Vena cava inferior, sowie der

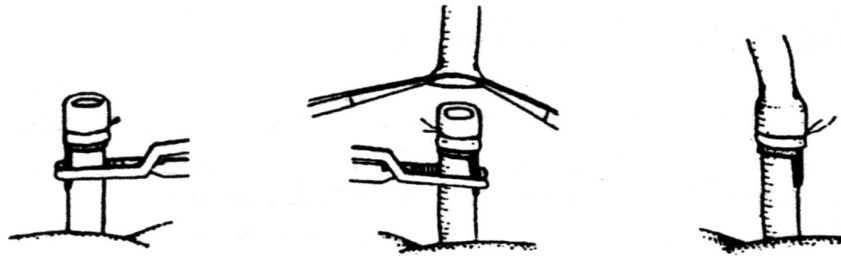


Abb.8. Schematische Darstellung der Cuff-Anastomosierung von Vena cava und Pfortader

arteriellen Anastomose durch Überstreifen des spenderseitigen aortalen Patches über den empfängerseitig bereits in die Arteria hepatica communis eingeführten Polyethylenstents.

Zu Beginn der Reperfusion wurde zunächst die auf der suprahepatischen Vena cava sitzende Satinsky-Klemme geöffnet, gefolgt von den Clips auf Pfortader und Arteria hepatica communis und zuletzt dem Clip auf der infrahepatischen Vena cava. Die Dauer der anhepatischen Phase lag dabei in allen Fällen unter 20 Minuten.

Zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten während der anhepatischen Phase wurden nach Reperfusion 1-2 ml 10-prozentiger Humanalbuminlösung (Fa. Baxter, Unterschleissheim) über die liegenden Katheter substituiert. Zum Ausgleich einer metabolischen Azidose wurde entsprechend den durchgeführten arteriellen Blutgasanalysen bilanziert Natriumbicarbonat zugeführt. Der intraoperative Blutverlust lag bei der Empfängeroperation maximal zwischen 0,5 und 1 ml. Bei ersten Zeichen des Erwachens des Tieres und entsprechenden Blutdruckanstiegen durch Wiedereinsetzen der Leberfunktion wurde die Äthermaske wieder vor der Schnauze des Tieres platziert.

2.2 Versuchsprotokoll

Wir verglichen eine Kontrollgruppe, die 20 ml 0,9% NaCl-Lösung als Rinse-Solution erhalten hatte, mit zwei Interventionsgruppen, bei denen der Rinse-Solution Tacrolimus in einer Konzentration von 10- oder 50 ng/ml zugesetzt worden war. Die Dauer der Spülung betrug circa 3 Minuten, der Perfusionsdruck lag bei 10 cm Wassersäule.

Die Gruppengröße betrug jeweils n=5. (Abb.9)

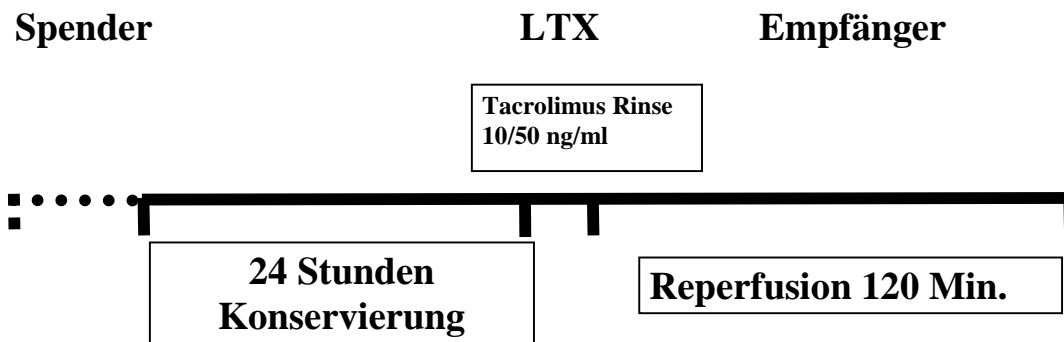


Abb. 9: Versuchsprotokoll Tacrolimus-Rinse und experimentelle Lebertransplantation

2.2.1 Explantation:

Nach Narkoseeinleitung wurde aus dem liegenden Katheter in der Arteria carotis communis Blut entnommen für Serumproben (Transaminasen, GSH, GSSG) und arterielle Blutgasanalysen. Nach Präparation und Kanülierung des Ductus choledochus des Spendertieres wurde die Galle über einen Zeitraum von 15 Minuten gesammelt und für die Auswertung angegeben. Kurz vor UW-Perfusion wurden 200 IE Heparin i.v. gegeben. Nach der Hepatektomie wurde die Kaltpräparation durchgeführt und die Leber für 24 Stunden in 50 ml UW-Lösung bei 4°C konserviert.

2.2.2 Transplantation:

Während der zweistündigen Reperfusionsphase wurde Blut für Serumproben (Transaminasen, GSH, GSSG) und Blutgasanalysen zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 Minuten entnommen, sowie zu denselben Zeitpunkten über den kanülierten Ductus choledochus Galle in gewogenen Behältern (Eppendorf-Tubes, Fa. Eppendorf, Hamburg) zur quantitativen Messung der Exkretionsleistung und für nachfolgende Analysen gesammelt.

Am Ende der Reperfusionsphase wurden die Tiere getötet. Am noch lebenden, tief narkotisierten Tier Gewebeproben von Leber, Niere und Lunge entnommen und in Formalin

fixiert beziehungsweise in flüssigem Stickstoff für die anschließende Kryokonservierung bei -80°C gelagert.

2.3 Parameter und Meßmethoden

2.3.1 Systemische Hämodynamik

Der arterielle Mitteldruck wurde über einen Druckaufnehmer gemessen und auf einem Monitor kontinuierlich als MAP in mmHg angezeigt. In arteriellen Blutproben wurden der pO₂, pCO₂, Säure-Basen-Status, Sauerstoffsättigung sowie der Hämoglobingehalt in einem Blutgasmessgerät (ABL 300, Radiometer Copenhagen, Dänemark) bestimmt.

2.3.2 Transaminasen

Als Maß der hepatischen Integrität diente die Bestimmung der spezifischen Leberenzyme Glutamat-Oxalacetat-Transferase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transferase (GPT).

Die Proben wurden jeweils 2 Stunden nach Reperfusion des Transplantats gewonnen. Dazu wurde je nach Körpergewicht des Tieres circa 1 ml arterielles Blut in speziellen Mikro-Serum-Röhrchen gesammelt. Nach halbstündiger Sedimentation wurden die Proben bei 4°C und 3000 Umdrehungen zentrifugiert (Eppendorf R2D2) und das gewonnene Serum bis zum Zeitpunkt der Bestimmung bei -70°C eingefroren. Die Aktivitäten der Enzyme wurden spektrophotometrisch (Eppendorf PCP 61212, Fa. Netheler und Hinz, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 334 nm im Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern der LMU München, bestimmt.

2.3.3 Lichtmikroskopie der Leber

Zur histologischen Beurteilung der Leber wurden am Versuchsende Gewebeproben aus verschiedenen Leberlappen entnommen und unmittelbar danach in 10-prozentiger Formalinlösung fixiert. Die Proben wurden anschließend 30 Minuten fließend entwässert und für 12 Stunden in Ethanol (70%) verbracht und mittels aufsteigender Ethanol-Reihe wieder

entwässert. Anschließend wurden die Proben für 4 Stunden in den Intermedien Methylbenzoat und Benzol inkubiert.

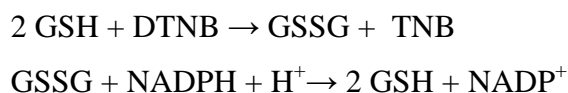
Nach 24-stündiger Einlage in Paraffin erfolgte die Endeinbettung der Proben ebenfalls in Paraffin. Am Schlittenmikrotom (Mod Hn 40, Fa. Reichert-Jung/Leica, München), wurde das Gewebe 3 µm dünn geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin (Fa. Merck, Darmstadt) gefärbt und auf einem Objektträger zur Mikroskopie fixiert. Die in dieser Arbeit vorgestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen entstanden unter Verwendung verschiedener Rot- und Blaufilter bei 40-facher Vergrößerung mittels Fotomikroskop (Axiophot, Fa. Zeiss, Oberkochen). Die Begutachtung erfolgte durch zwei unabhängige Pathologen ohne Kenntnis über die Zuordnung der Präparate zu den Versuchsgruppen.

2.3.4 Hepatozelluläre Funktion/ Gallefluss

Der Gallefluss gilt als geeigneter Parameter der hepatozellulären Funktion(65). Nach Laparotomie wurde ein Verweilkatheter (PE50) in den Ductus choledochus zur kontinuierlichen Ableitung der Galle implantiert und die abfließende Galle über 30-minütige Intervalle gesammelt. Die nach 2 Stunden Reperfusion gewonnene Gallenmenge wurde auf das Leberfeuchtgewicht bezogen und in µl/min/g angegeben. Die Leber der Versuchstiere wurde dazu am Versuchsende entnommen und gewogen.

2.3.5 GSH- und GSSG-Bestimmung im Plasma

Die Summe (GSH_t) des oxidierten (GSSG) und reduzierten (GSH) wurde durch einen kinetischen Test bestimmt(66), der auf folgender Reaktion basiert:



Die Geschwindigkeit der Extinktionszunahme während der nichtenzymatischen Reduktion von 5,5' Dithiobis(nitrobenzoesäure) (DTNB) durch GSH wurde bei 405 nm aufgezeichnet. Das bei dieser Reaktion entstandene GSSG wurde enzymatisch durch die Glutathionreduktase (GR) reduziert, so dass Reaktionsgeschwindigkeit der DTNB-Reduktion konstant blieb. Der verwendete Testansatz war wie folgt:

800 μ l Phosphat-Puffer (pH 7,4)
 50 μ l NADPH (5 nM)
 50 μ l DTNB (1mM)
 50 μ l Plasma
 20 μ l Glutathionreduktase (24 U / ml)
 50 μ l GSH-Standard (4 μ M)

Fünf Minuten nach Beginn der Reaktion wurden dem Testansatz 50 μ l GSH Standard (4 μ M) zugeführt, um Testhemmungen auszuschliessen. Das Verhältnis GSH / GSSG beträgt im Plasma von Ratten (und Menschen) ca. 10:1. Die Bestimmung der Plasma-GSSG Konzentration erfordert daher Maßnahmen zur Vermeidung einer spontanen GSH-Autooxidation zu GSSG. Zur Bestimmung der GSSG-Plasma-Konzentration wurde daher die von Lauterburg beschriebene Methode der GSH-Konjugation mit N-Ethylmaleimid (NEM) verwendet. 200 μ l Blut wurden unmittelbar nach der Abnahme mit 200 μ l NEM-Lösung (10 mM) versetzt. Durch die spontane Reaktion zwischen GSH und NEM zu einem Glutathion-Konjugat wurde GSH gebunden und eine GSH-Autooxidation zu GSSG verhindert. Überschüssiges NEM, das den kinetischen Test hemmt, wurde durch Trennung über Sep-Pak C₁₈-Kartuschen eliminiert. Sep-Pak C₁₈-Kartuschen wurden hierzu mit 10 ml absolutem Methanol und 10 ml Aqua-bidest konditioniert. Anschliessend wurden 200 μ l NEM-Plasma aufgetragen und 1 ml Phosphat-Puffer (pH 7,4) eluiert. Die GSSG-Konzentrationen der NEM-freien Eluate wurden mit dem o.g. kinetischen Test ermittelt. Die GSSG-Wiederfindung betrug 90 %. Die GSH-Plasma-Konzentration wurde aus der Differenz von GSH_t und GSSG berechnet.

2.3.6 GSH- und GSSG-Bestimmung im Gewebe

Präparation des Lebergewebes

Lebergewebe (1-1,5g) wurde mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Aluminium-Zange schockgefroren. Das Lebergewebe wurde anschliessend unter flüssigem Stickstoff pulverisiert und mit Perchlorsäure (1,0 M) im Verhältnis 3 ml / g Leber versetzt. Die Säureextrakte wurden 5 min bei 5000 x g zentrifugiert und (4°C) und der Protein-freie Überstand zur Bestimmung intrazellulärer Metabolite verwendet.

Gesamt-Glutathion-Gehalt

Die Protein-freien Säureextrakte wurden in Phosphat-Puffer (pH 7,4) 1:1000 verdünnt. 50 μ l dieser Verdünnungen wurden anschliessend im kinetischen Test zur Glutathionbestimmung (s.o.) eingesetzt.

2.3.7 GSH- und GSSG-Bestimmung in der Galle

Die Summe des oxidierten und reduzierten Glutathions in der Galle wurde durch den oben beschriebenen kinetischen Test bestimmt. Die Galleproben wurden vor der Bestimmung im Verhältnis 1:1000 mit Phosphat-Puffer (pH 7,4) verdünnt.

Die GSSG-Bestimmung erfolgte durch Registrierung der NADPH-Oxidation im Doppelwellenlängenverfahren bei 340-400 nm nach Starten des Testansatzes mit Glutathionreduktase.

Testansatz: 1000 μ l Phosphatpuffer
 5 μ l NADPH
 10 μ l Galle
 2 μ l Glutathionreduktase (40 U / ml)

Der Extinktionskoeffizient $e_{340}=6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ wurde zur Berechnung der GSSG-Konzentration verwendet.

Die GSH-Konzentration wurde aus der Differenz zwischen Gesamt-Glutathion nach oben beschriebenem Verfahren berechnet.

2.4 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde computergestützt durchgeführt (Sigma Stat 3.0, Jandel Scientific, Erkrath). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (STABW) angegeben. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen benutzten wir den Rank - Sum - Test (Mann - Whitney -Test). Vergleiche mehrerer Gruppen wurden mittels einer Varianzanalyse (ANOVA on ranks) verglichen. Ein p - Wert von unter 0,05 wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Modell der isoliert perfundierten Rattenleber (Dr. Bilzer)

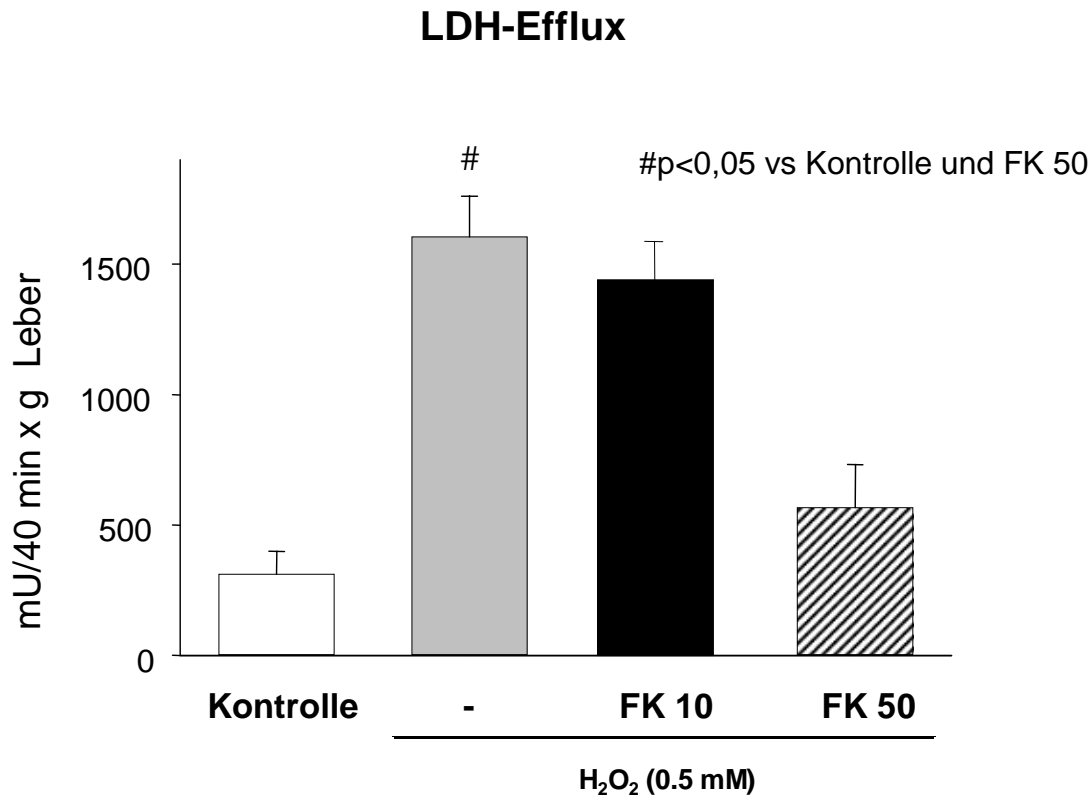


Abb. 10: LDH-Konzentration im Effluat bei H₂O₂-Perfusion und FK-Präkonditionierung

Nach H₂O₂-Perfusion (0,5mM) kam es zu einer signifikanten Zunahme des kumulativen LDH-Efflux (mU/40min x g Leber) ($p < 0,05$): Kontrolle 300 ± 40 vs. 1605 ± 157 . Die Perfusion mit Tacrolimus in einer Konzentration 50 ng/ml führte zu einer signifikanten Reduktion des LDH-Efflux auf 565 ± 167 mU/40min x g Leber. (Abb.10).

Intrazellulärer GSSG-Gehalt

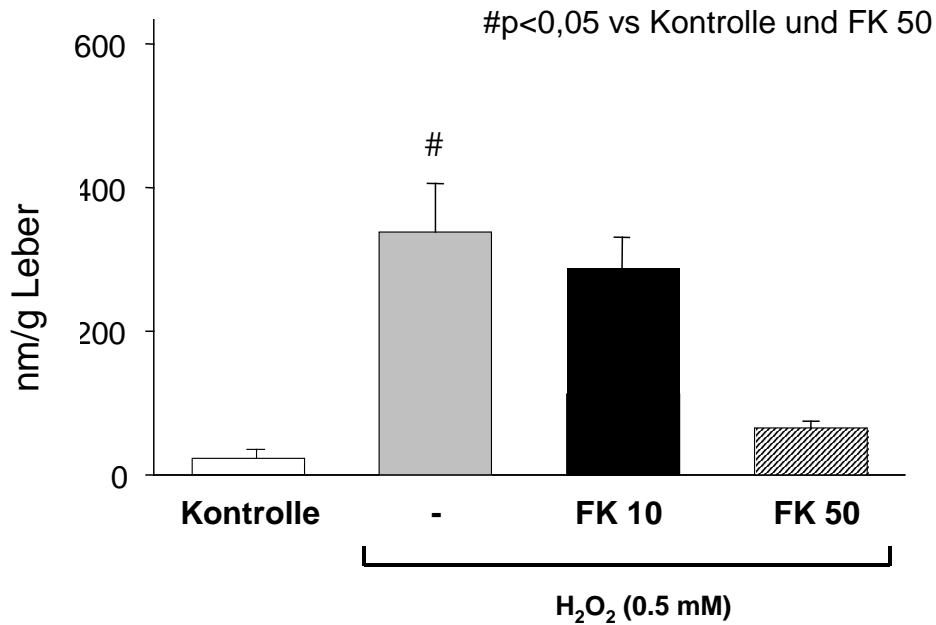


Abb. 11: Intrazellulärer GSSG-Gehalt nach H₂O₂-Perfusion und FK-Präkonditionierung

Nach Perfusion mit H₂O₂ kam es in den unbehandelten Lebern zu einem signifikanten Anstieg des oxidierten Glutathions (GSSG). Ko 18_±3 vs - 399_±67 nmol/g Leber. Die Behandlung mit Tacrolimus führte zu einer Reduktion der intrazellulären GSSG-Konzentration, wobei in der 50ng-Gruppe (65_±10 nmol/g Leber) statistische Signifikanz erreicht wurde. (Abb.11).

Intrazellulärer GSH-Gehalt

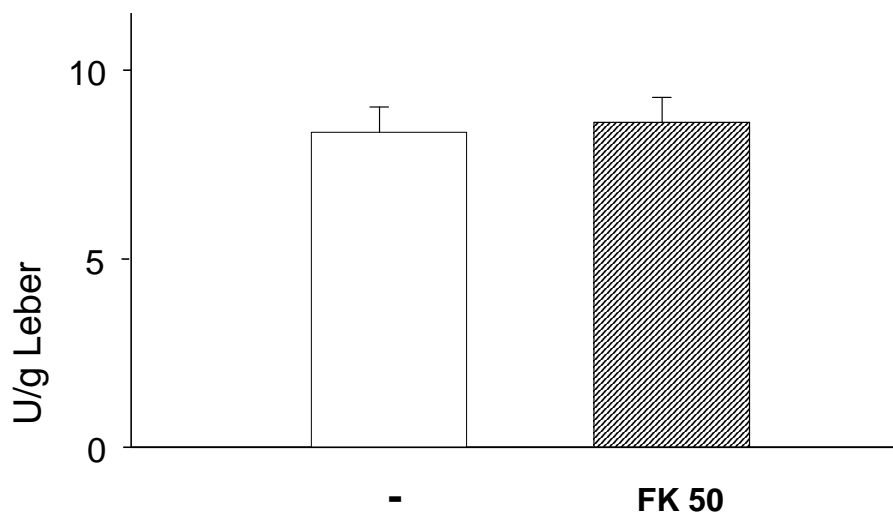


Abb. 12: Intrazellulärer GSH-Gehalt nach H₂O₂-Perfusion und FK-Präkonditionierung

Demgegenüber bewirkte die Tacrolimus-Präkonditionierung vor H_2O_2 -Perfusion keine Veränderung der intrazellulären GSH-Konzentration gegenüber den ausschliesslich mit H_2O_2 perfundierten Lebern (Abb.12).

GSH-Peroxidase Aktivität

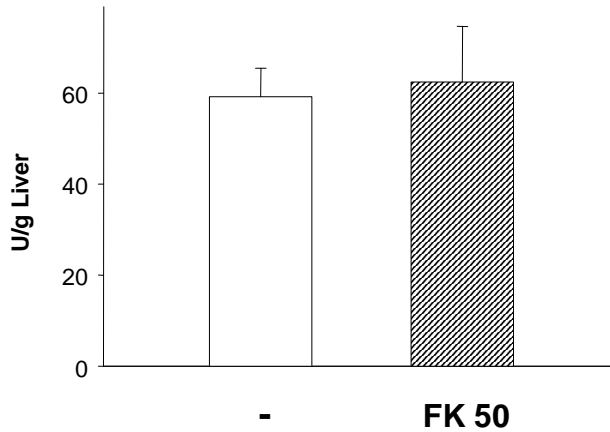


Abb. 13: GSH-Peroxidase Aktivität nach H_2O_2 -Perfusion und FK-Präkonditionierung

GSH-Reduktase Aktivität

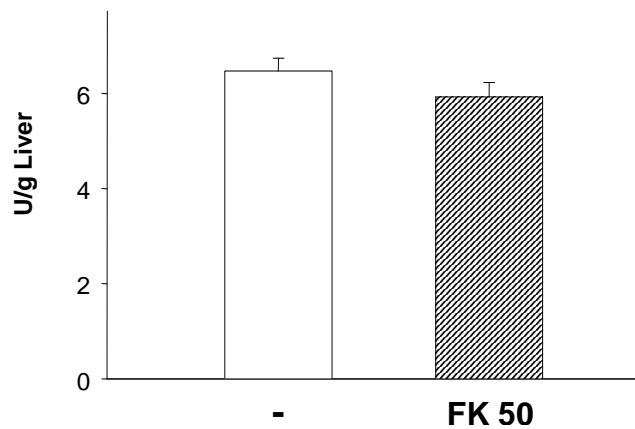


Abb. 14: GSH-Reduktase Aktivität nach H_2O_2 -Perfusion und FK-Präkonditionierung

Katalase Aktivität

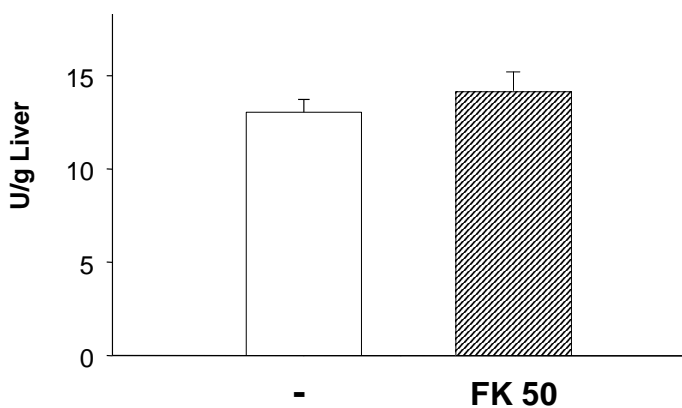


Abb. 15: Katalase Aktivität nach H_2O_2 -Perfusion und FK-Präkonditionierung

Die FK-Präkonditionierung zeigte ebenfalls keine Wirkung auf die Aktivität der an Oxidation und Reduktion von intrazellulärem Glutathion beteiligten Enzyme GSH-Peroxidase (Abb.13), GSH-Reduktase (Abb.14) und Katalase (Abb.15).

3.2 Orthotope Lebertransplantation

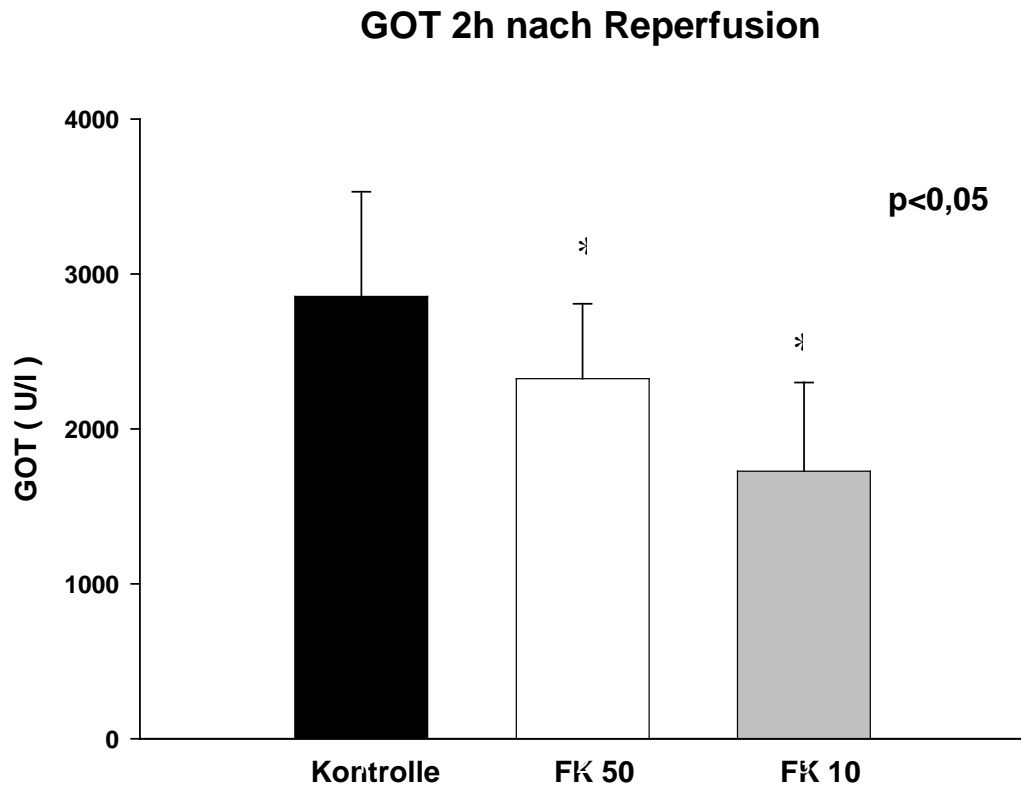


Abb. 16: GOT 2h nach Lebertransplantation, n=5

Zwei Stunden nach Reperfusion kam es bei den Versuchsgruppen, in denen der Rinse solution FK 506 in einer Konzentration von 50- beziehungsweise 10 ng/ml zugefügt worden war, zu einer signifikanten Reduktion der GOT gegenüber der Kontrollgruppe ($2854,3 \pm 676$ U/l). Im Gegensatz zu den Versuchen im isoliert-perfundierten Modell war die Tacrolimus-Wirkung bei der orthotopen Lebertransplantation nicht dosisabhängig, im Gegenteil: Die GPT als Maß für die hepatozelluläre Integrität war in der 10 ng-Gruppe zwei Stunden nach Reperfusion niedriger (1470 ± 812 U/l) als in der 50 ng-Gruppe (2324 ± 484 U/l). Der Unterschied zwischen den Interventionsgruppen war dabei jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb.16).

GPT 2h nach Reperfusion

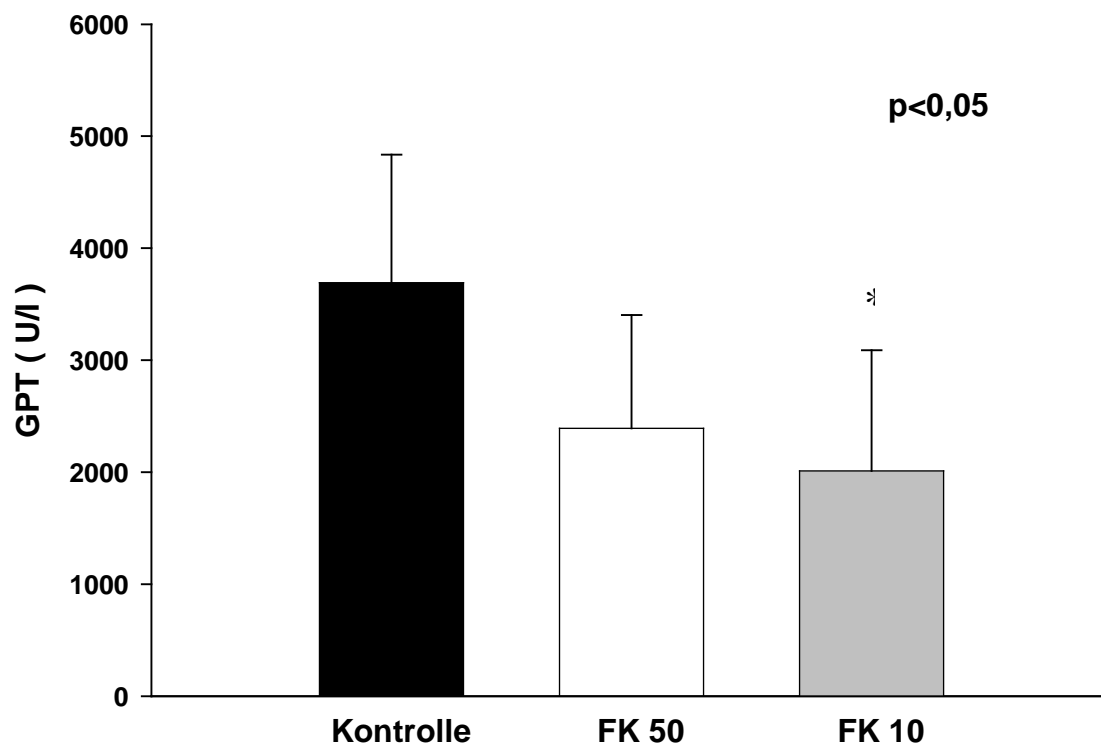


Abb. 17: GPT 2h nach Lebertransplantation, $n=5$

Auch bei der GPT, ebenso wie die GOT ein Marker für die hepatozelluläre Integrität, zeigte sich eine inverse Dosis-Wirkungs-Beziehung. Es zeigte sich eine statistische Signifikanz zwischen Kontrolle (3691 ± 1144 U/l) und der 10ng-Gruppe (1740 ± 1169 U/l), während die Unterschiede zwischen Kontrolle und der FK 50-Gruppe (2390 ± 1013 U/l) keine statistische Signifikanz erreichten (Abb.17).

LDH 2h nach Reperfusion

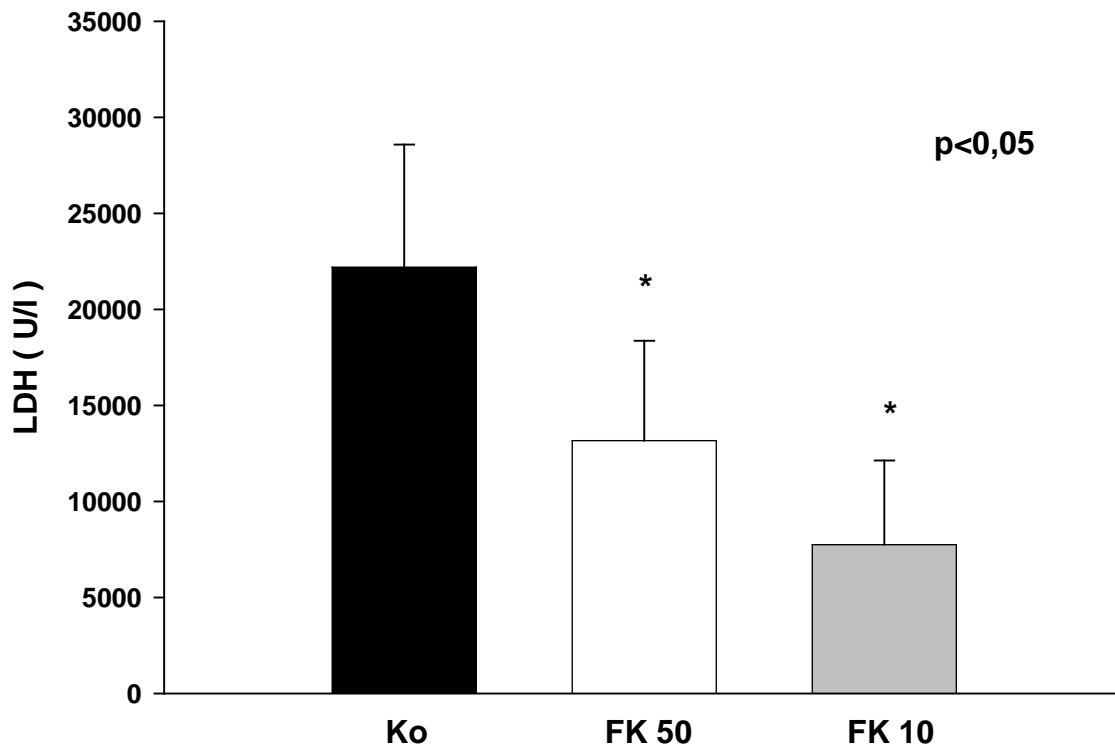


Abb. 18: LDH 2h nach Lebertransplantation, n=5

Besonders ausgeprägt zeigte sich die Tacrolimus-Wirkung bei der LDH, einem Organunspezifischem Marker der Zellintegrität. Gegenüber Kontrolle (22200 ± 6375 U/l) kam es zwei Stunden nach Reperfusion bereits bei den mit Tacrolimus in einer Konzentration von 50 ng/l gespülten Lebern zu einer Reduktion der LDH auf (13154 ± 5196 U/l). Bei den Organen, die mit Tacrolimus in einer Konzentration von 10 ng/ml gespült worden waren, lag die LDH bei 6777 ± 4566 U/l, was einer Reduktion auf beinahe ein Drittel des Wertes der Kontrollen gleichkommt (Abb.18).

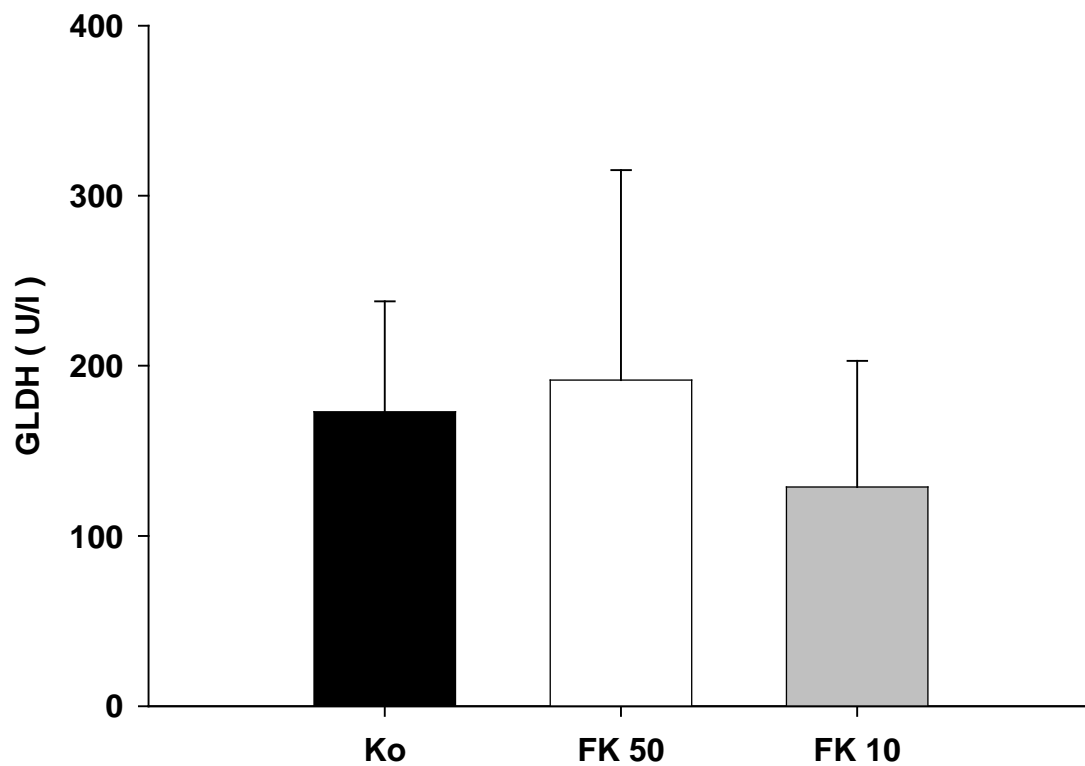
GLDH 2h nach Reperfusion

Abb.19: GLDH 2h nach Lebertransplantation, n=5

Ein widersprüchliches Bild zeigt sich dagegen bei der GLDH, ein ebenso wie die LDH Organ-unspezifischer Marker der Zellintegrität. Während die GLDH in der Kontrollgruppe bei 172 ± 64 U/l lag, stieg sie bei den mit Tacrolimus in einer Dosis von 50 ng/ml gespülten Lebern auf 191 ± 123 U/l an. In der mit 10 ng/ml behandelten Gruppe fiel die LDH auf 114 ± 74 U/l ab. All diese Werte waren jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb.19).

Intrazelluläres GSH 2h nach Reperfusion

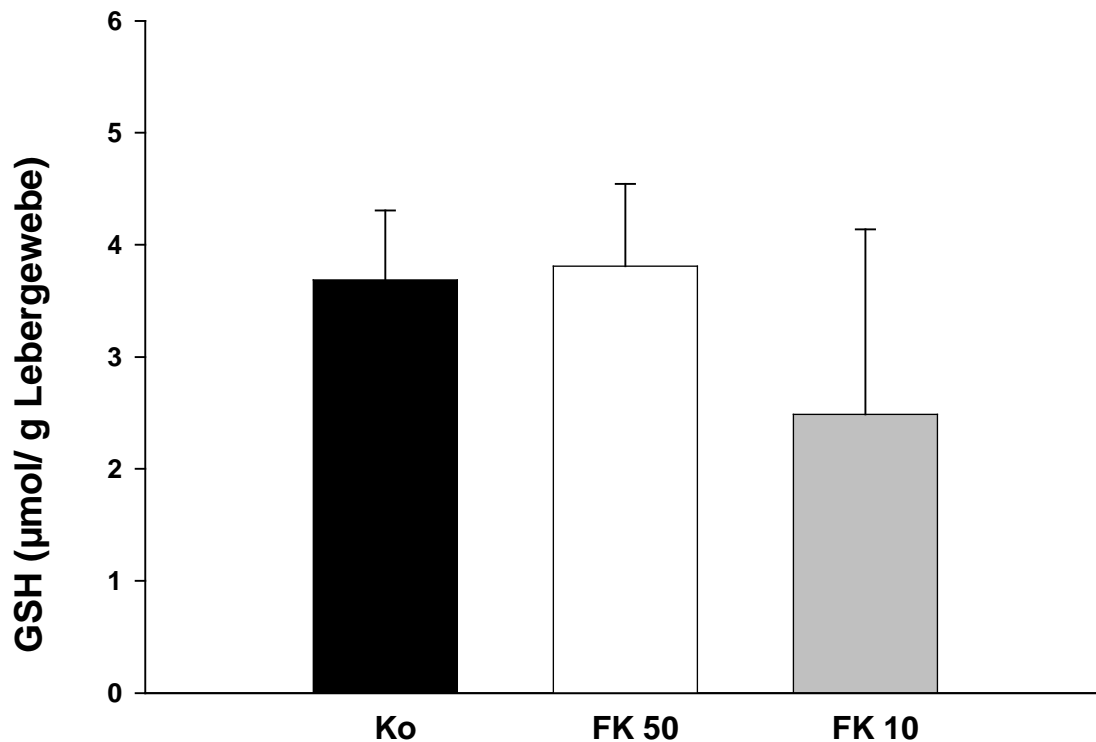


Abb.20: Intrazelluläres GSH 2h nach Lebertransplantation, n=5

Keine Signifikanzen zeigten sich beim Vergleich intrazellulären Gesamt-GSH-Gehalte. Dabei ist wichtig zu beachten, dass es sich hierbei um die Gesamt-Konzentration an reduziertem GSH und oxidiertem GSSG handelt. Während die intrazelluläre Konzentration an Glutathion in der Kontrollgruppe zwei Stunden nach Reperfusion bei $3,69 \pm 0,61 \mu\text{mol GSH/ g Lebergewebe}$ lag, war die Konzentration in der 50 ng-Gruppe mit $3,81 \pm 0,734 \mu\text{mol GSH/ g Lebergewebe}$ auf einem vergleichbaren Niveau. Etwas niedriger, jedoch ohne statistische Signifikanz, lag der intrazelluläre Glutathionspiegel in der 10 ng-Gruppe mit $2,49 \pm 1,652 \mu\text{mol GSH/ g Lebergewicht}$ (Abb.20).

GSSG intrazellulär 2h nach Reperfusion

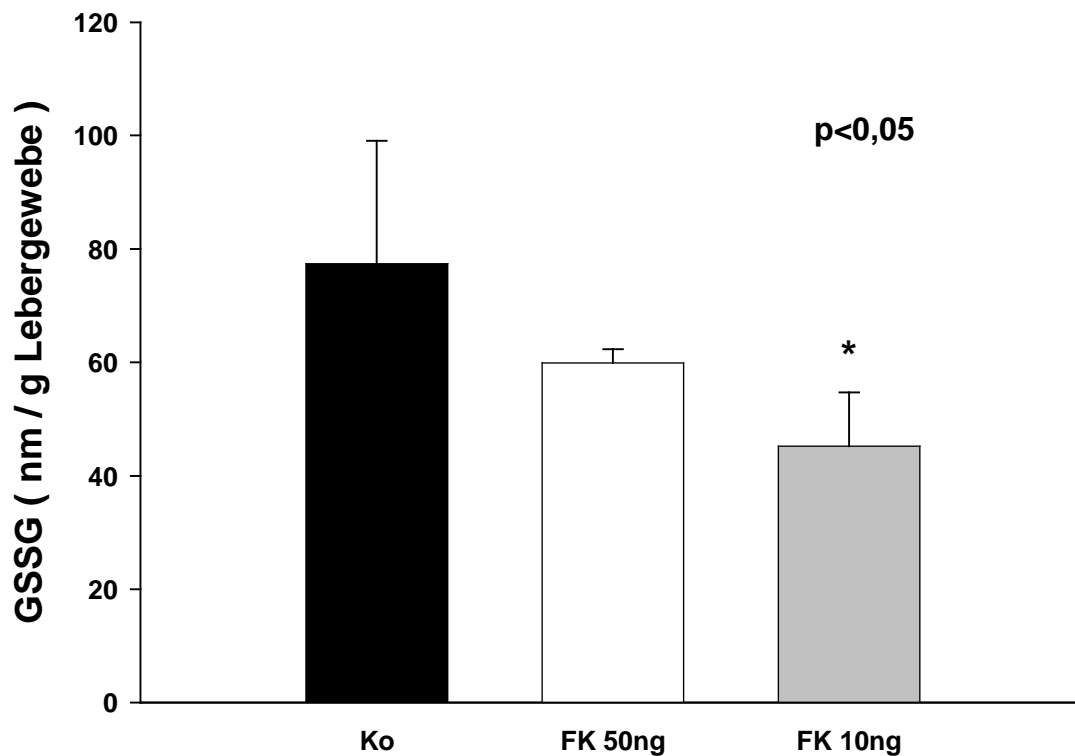


Abb.21: Intrazelluläres GSSG 2h nach Lebertransplantation, n=5

Die Tacrolimus-Rinse bewirkte eine Reduktion des intrazellulären GSSG, dessen zytotoxische Eigenschaften in der Literatur beschrieben werden. Während es bei den Empfängern von mit Tacrolimus in einer Konzentration von 50 ng/ml perfundierten Lebern zu einer Abnahme von $71,80 \pm 30,64$ nm GSSG/ g Lebergewebe bei den Kontrolltieren auf $63,87 \pm 10,05$ nm GSSG/ g Lebergewebe kam, war die Abnahme bei den Tieren, denen mit Tacrolimus in einer Konzentration von 10 ng/ml perfundierte Lebern implantiert worden waren auf $47 \pm 10,38$ nm GSSG / g Lebergewebe wiederum stärker und signifikant (Abb.21).

Mittleres Gesamt-GSH in der Galle nach Reperfusion

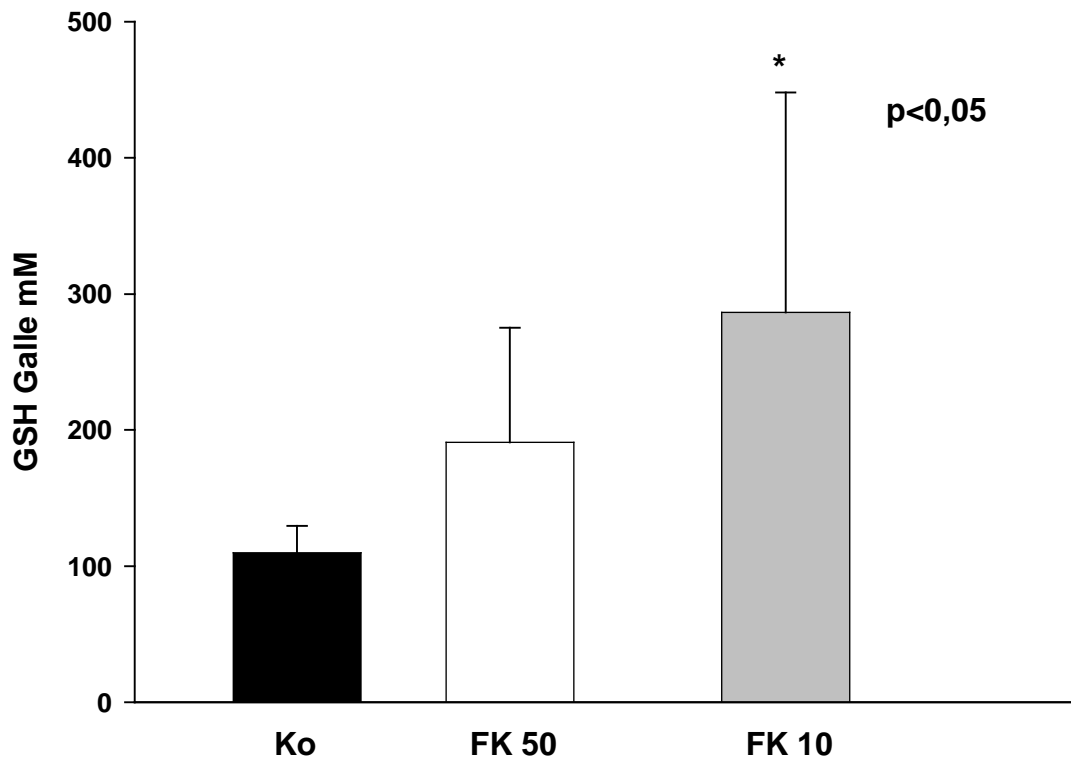


Abb. 22: Mittleres biliäres Gesamt-GSH nach Lebertransplantation, n=5

Eine Ursache der niedrigeren intrazellulären Glutathion- beziehungsweise GSSG-Spiegel liegt in einer vermehrten Freisetzung von Glutathion in die Galle. Die Behandlung mit Tacrolimus bewirkte eine Steigerung der Konzentration des Gesamt-Glutathions (GSH und GSSG) in der Galle von $109,86 \pm 19,71$ nM in der Kontrollgruppe auf $191,06 \pm 84,19$ nM in der 50 ng-Gruppe. Die stärkste Steigerung des Glutathion-Exportes ergab sich bei Spülung der Lebern mit Tacrolimus in einer Konzentration von 10 ng/ml, hier lag die Konzentration in der Galle bei $320,38 \pm 161,66$ mM und damit signifikant über dem Niveau der Kontrolltiere (Abb.22).

Mittleres GSSG in der Galle nach Reperfusion

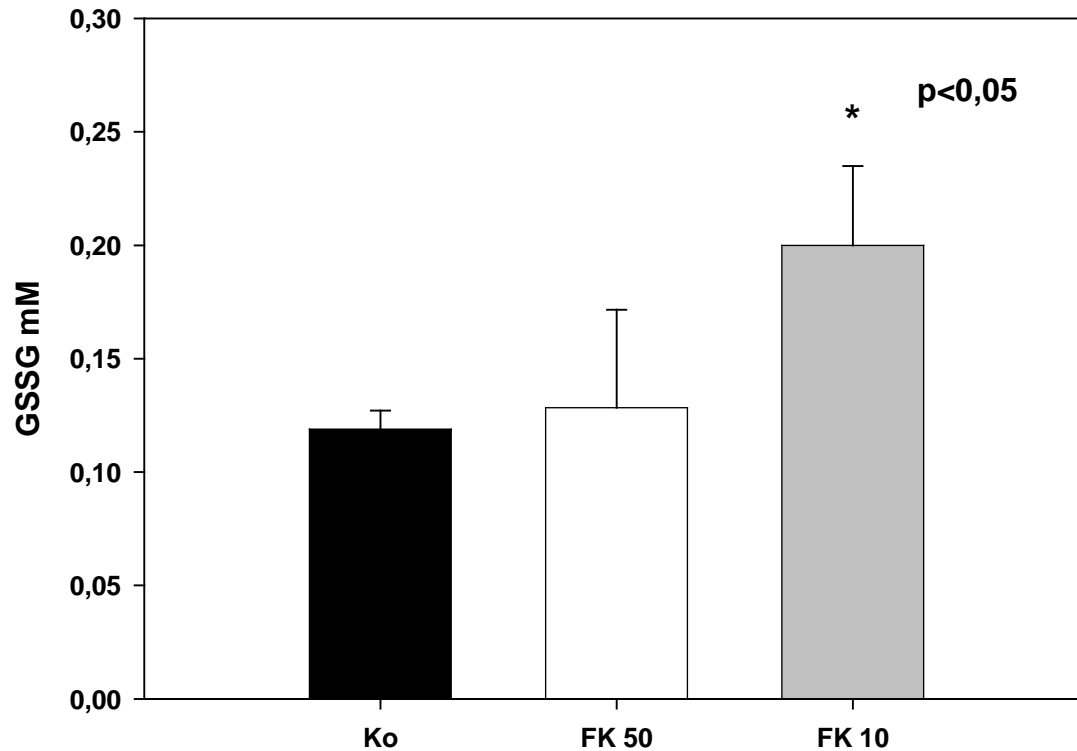


Abb.23: Mittlere biliäre Konzentration von GSSG nach Lebertransplantation, n=5

Der Export von GSSG war in der 10 ng-Gruppe ($0,19 \pm 0,035$ mM) gegenüber Kontrolle ($0,13 \pm 0,043$ mM) signifikant erhöht. Die Veränderung der GSSG-Ausscheidung in der 50 ng-Gruppe war dagegen gegenüber Kontrolle nur minimal (Abb.23).

Gallefluss während 120 Minuten Reperfusion

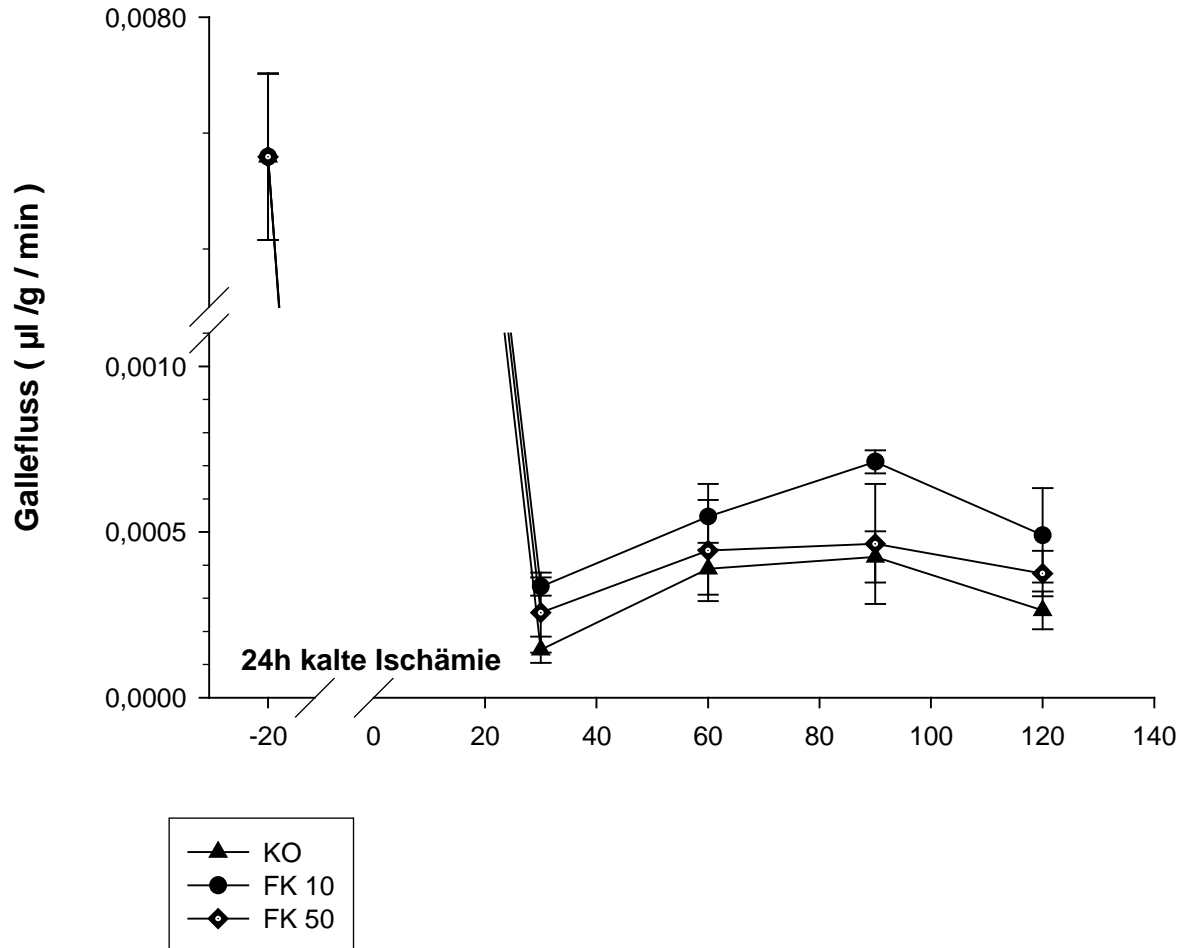


Abb.24: Gallefluss zu verschiedenen Zeitpunkten während der Reperfusion, $n=5$

Der Gallefluss nach Lebertransplantation war bei den mit Tacrolimus gespülten Lebern nach Reperfusion zwar insgesamt höher, dies jedoch ohne statistische Signifikanz. Ausgehend von einem hohen Ausgangsniveau bei den Spendertieren, entsprechend der basalen Galleproduktion ausgedrückt in $\mu\text{l/g Lebergewicht/min}$, zeigen sich höhere Galleflüsse in der 10ng-Gruppe als in der 50ng-Gruppe (Abb.24).

Mittlerer Gallefluss nach Reperfusion

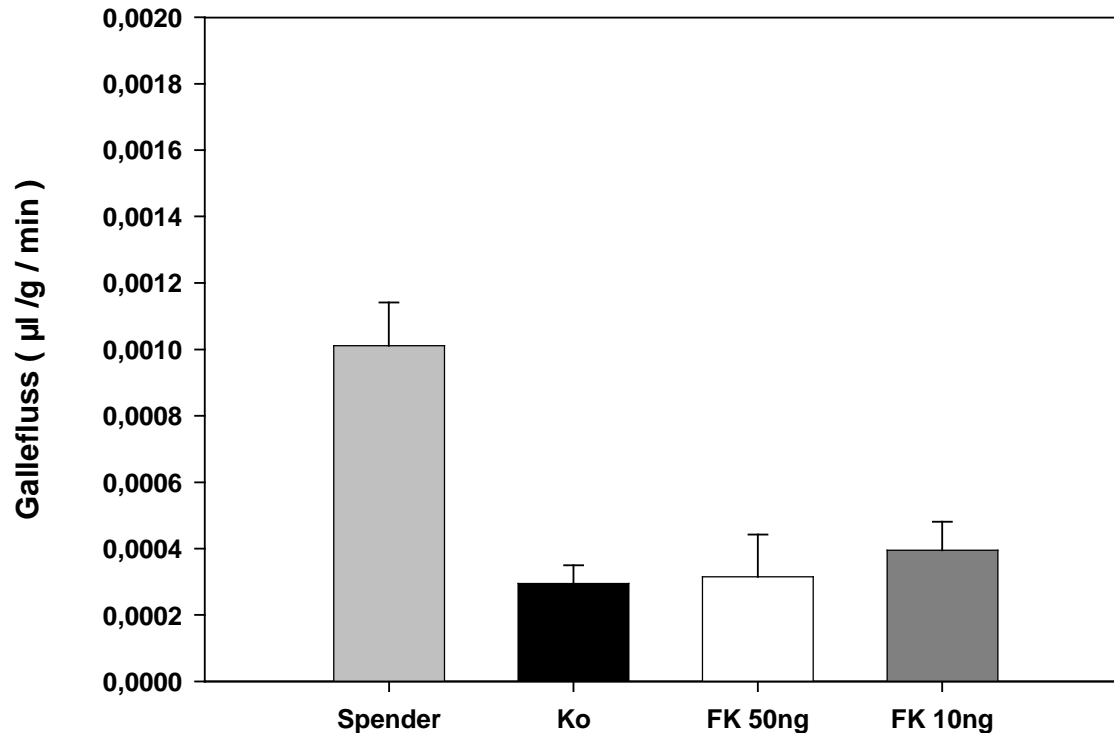
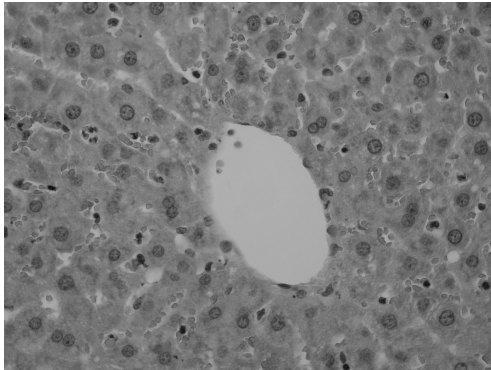


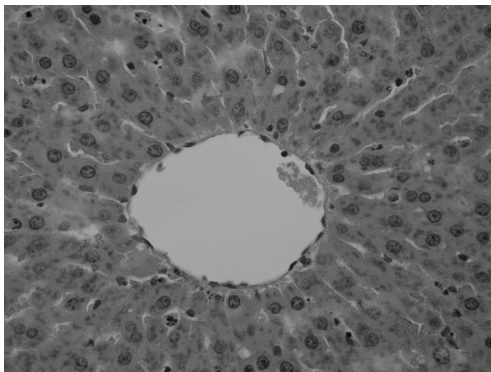
Abb. 25: Mittlerer Gallefluss nach Lebertransplantation, $n=5$

Anschaulicher präsentiert sich der über 2 Stunden gemittelte Gallefluss. Dazu wurden die Mittelwerte der Galleflüsse der verschiedenen Messpunkte jedes einzelnen Tieres gebildet und diese anschließend der statistischen Auswertung mittels Mann-Whitney-Rangsummentest zugeführt. Nach Reperfusion kam es bei den Kontrolltieren zu einer Reduktion des Galleflusses auf knapp ein Drittel der Werte vor Ischämie. Die FK-Behandlung bewirkte bessere Galleflüsse gegenüber der Kontrollgruppe, ausgedrückt in $\mu\text{l}/\text{g Lebergewicht}/\text{min}$. Wenngleich keine statistische Signifikanz erreicht wurde, zeigten sich auch hier wiederum höhere Galleflüsse bei den mit 10ng Tacrolimus gespülten Lebern als bei den mit 50 ng behandelten Tieren (Abb.25).

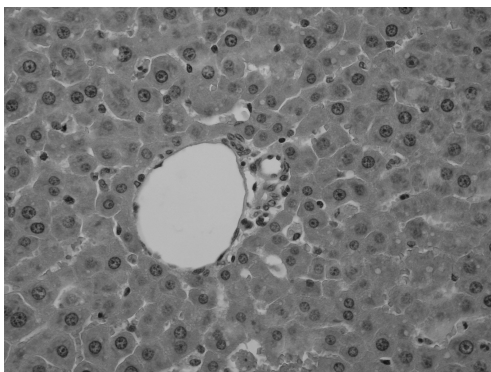
Lichtmikroskopische Befunde:



Ko, 2h Reperfusion



*Tacrolimus 50 ng/ml, 2h
Reperfusion*



*Tacrolimus 10 ng/ml, 2h
Reperfusion*

Abb.26: Leber 2h nach LTX, HE-Färbung, 40-fache Vergrößerung

Die lichtmikroskopische Untersuchung ergab zwischen der Kontrollgruppe und den mit Tacrolimus behandelten Gruppen keine relevanten Unterschiede zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme 120 Minuten nach Reperfusion (Abb.26).

Einen Hinweis auf die Frage, ob diese Beobachtungen durch lokale oder systemische Effekte von Tacrolimus hervorgerufen werden, liefern unter Umständen Untersuchungen der Rinse

Solution, nachdem diese die Lebern durchflossen hatten. In jeweils zwei in der 10-beziehungsweise 50-ng-Gruppe durchgeführten FK-Messungen lagen die gemessenen Werte in der 10-ng Gruppe unterhalb der Nachweisgrenze von 5 ng/ml und in der 50 ng-Gruppe bei 4- beziehungsweise 9 ng/ml. Die Lebern hatten Tacrolimus offenbar vollständig aufgenommen.

4. Diskussion

4.1 Tacrolimus und Ischämie-Reperfusionsschaden

Seit Beginn der neunziger Jahre sind protektive Wirkungen von Calcineurininhibitoren auf Ischämie-Reperfusionsschäden an der Leber bekannt(11;19;35;37;41;52;53). Als problematisch erweist sich jedoch die in allen Arbeiten angewandte Methode der Spenderpräkonditionierung, die im einem klinischen Alltag nicht umsetzbar erscheint. Eine klinische Arbeit einer amerikanischen Gruppe zeigte jedoch einen neuen protektiven Therapieansatz mit Tacrolimus auf: Konservierte humane Lebern wurden vor Implantation mit handelsüblicher Rinse-Lösung (Plasma-Lyte A, Fa. Baxter) gespült, der Tacrolimus in einer Konzentration von 20 ng/ml zugesetzt worden war. Diese Behandlung führte bei insgesamt 10 behandelten Patienten zu einer signifikanten Reduktion des Transaminasenanstiegs an den ersten beiden postoperativen Tagen(63).

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Ansatz auf das Modell der experimentellen Lebertransplantation bei der Ratte übertragen. Dabei konnten wir eine Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens durch eine Spülung (20 ml) der Lebern mit Tacrolimus unmittelbar vor Implantation zeigen. Unsere Untersuchungen der zugrunde liegenden Wirkmechanismen konzentrierten sich dabei auf den zellulären Glutathion-Stoffwechsel. Die Gründe hierfür sollen nachfolgend erläutert werden.

4.2 Glutathion als Therapeutikum und Mediator hepatischer Ischämie-Reperfusionsschäden

An dieser Stelle sei nochmals auf die Bedeutung der ROS-Freisetzung bei IRS durch Kupfferzellen und Granulozyten während der Reperfusion verwiesen(30). ROS schädigen unspezifisch Gewebe aber induzieren auch spezifisch ablaufende Entzündungskaskaden (28;32) und Mikrozirkulationsstörungen (25). Dies wird heute als einer der zentralen Pathomechanismen von Ischämie-Reperfusionsschäden angesehen.

In diesem Zusammenhang konnte unsere Arbeitsgruppe in einem Modell der kalten Ischämie bei Transplantation von Fettlebern die protektive Wirkung von exogen zugeführtem Glutathion (200 μ mol/h/kg) zeigen (n=5, Reperfusionszeit 120 min). (Abb. 27).

Reduktion hepatischer IRS durch exogenes Glutathion:

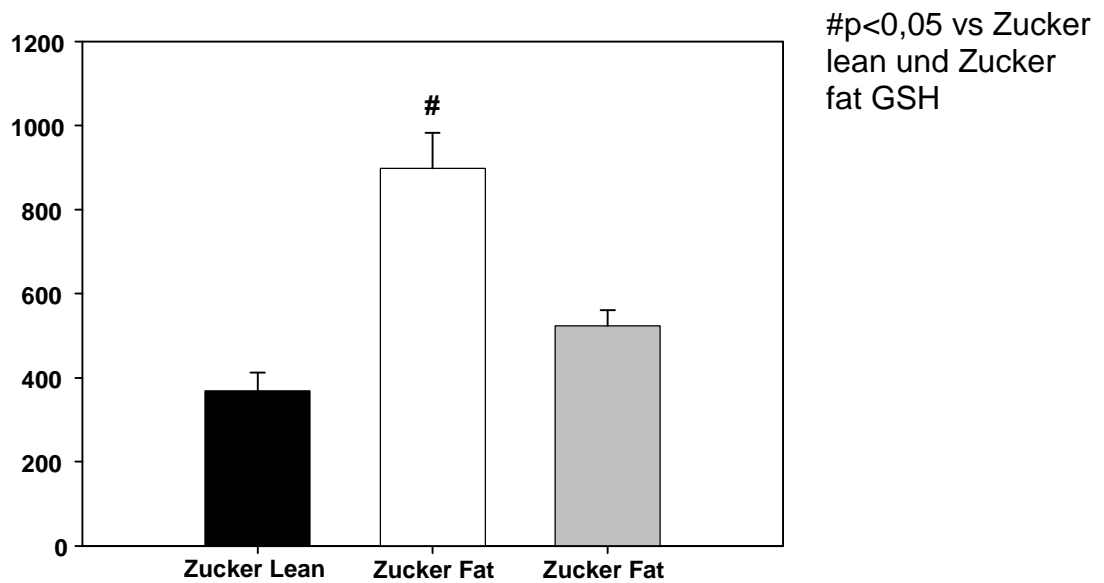


Abb.27: GPT 2h nach Lebertransplantation an Fettratten: Signifikant stärkerer Schaden bei Transplantation steatotischer Lebern gegenüber normalen Lebern, signifikante Verringerung des zellulären Schadens durch intravenöse Zufuhr von Glutathion (200 $\mu\text{mol/h/kg}$).

Neben dieser effizienten Wirkung als Radikalfänger und Therapeutikum bei hepatischen IRS gibt es jedoch auch Hinweise, dass Glutathion unter bestimmten Bedingungen auch ein Zytokin-ähnliches Agens darstellt.

Eine wichtige Rolle spielt dabei die ATP-abhängige Exkretion von GSH bzw. GSSG ins Blut beziehungsweise in die Blutbahn (50) unter

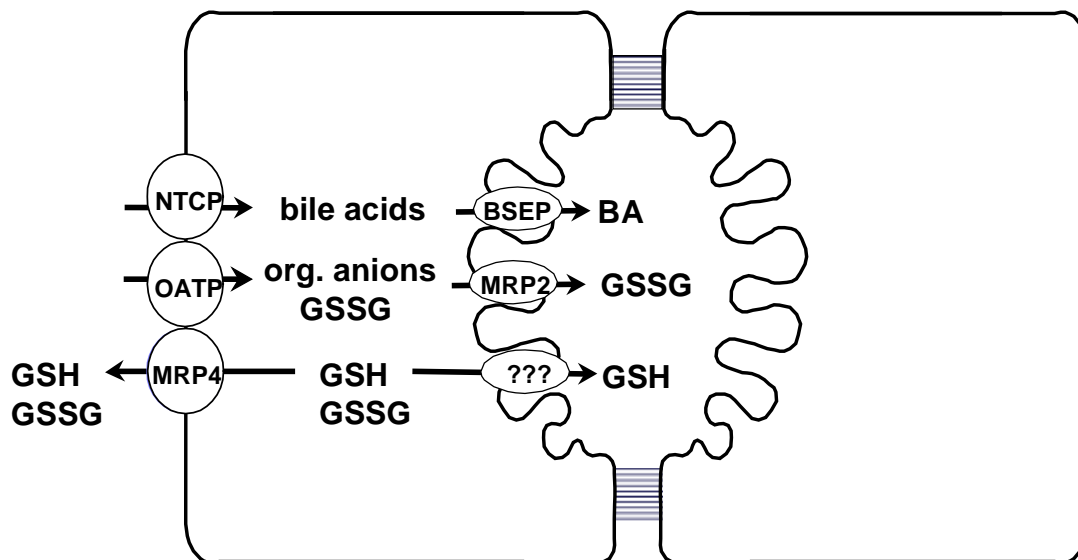


Abb. 28: Hepatobiliäre Transporterproteine

anderem über das in der basolateralen Membran lokalisierte Gallensäure-Transportprotein mrp (multidrug resistance-associated protein) 4 (22) oder in die Galle über das in der kanalikulären Membran angesiedelte mrp2 (Abb.28). In einem experimentellen Modell der Dünndarmischämie konnte eine umgekehrte Korrelation zwischen der mrp2-Expression der Leber und dem Serum-Spiegel von IL-6 gezeigt werden (75). IL-6 wird beim Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber vermehrt freigesetzt und spielt nicht zuletzt eine wichtige Rolle für die Rekrutierung und Adhärenz von Leukozyten, einer wesentlichen Ursache von Mikrozirkulationsstörungen (28). Wenngleich in der zitierten Arbeit keine primäre Leberischämie angelegt wurde, ist einerseits jedoch die Bedeutung von IL-6 für den Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber unstrittig, zumal Tacrolimus den systemischen IL-6 Spiegel nach experimenteller Lebertransplantation senkt (76). Andererseits kommt es während der anhepatischen Phase bei Lebertransplantation an der Ratte sehr wohl zu einer Form von Darmischämie, wenn sich das normalerweise über die Pfortader abfließende Blut im Darm zurückstaut. Nach eigener Anschauung und der Erfahrung aus weit mehr als den in dieser Arbeit dargestellten Lebertransplantationen an der Ratte spielen Endotoxine aus dem hämorrhagisch veränderten Darm während dieser Phase eine ganz wesentliche Rolle bei der systemischen Vermittlung hepatischer IRS, da die Ratte im Gegensatz zum Menschen, bei dem immer chronische Lebererkrankungen zur Transplantation führen, über keine vergleichbaren portosystemischen Umgehungskreisläufe verfügt. Jedoch bleiben Aussagen zur Bedeutung dieser Sachverhalte zum jetzigen Zeitpunkt spekulativ, da vor allem Untersuchungen der Zytokinantwort zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit ausstehen.

Dessen ungeachtet sind kanalikuläre und sinusoidale Transportproteine für die Ausscheidung von Giftstoffen und Medikamenten von Bedeutung, was möglichen Veränderungen auf dieser Ebene eine weit über die Glutathionhomöostase hinausreichende Rolle verleiht. Glutathion spielt eine Rolle bei der Zellzyklusprogression(2) sowie bei der Entgiftung von toxischen Stoffen und Medikamenten (38), wodurch Änderungen der Glutathion-Homöostase auch Bedeutung im Arzneimittelmetabolismus erlangen.

Gleichzeitig können SH-Gruppen, deren größtes intrazelluläres Reservoir Glutathion darstellt, bei Anwesenheit hoher Konzentrationen von ROS - wie bei der Reperfusion - über die Bildung toxischer Thiylradikale Radikalkettenreaktionen induzieren, in deren Verlauf toxische Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) und H_2O_2 entstehen.

Darüber hinaus kann bei oxidativem Stress vermehrt anfallendes GSSG unspezifisch mit SH-Gruppen anderer Proteine gemischte Disulfide bilden und diese entsprechend in ihrer

Funktion verändern. Obwohl oxidiertes GSSG normalerweise nur 1% des gesamten Glutathions ausmacht, steigt es bei oxidativem Stress in der Zelle als Maß für oxidativen Stress an, ausgedrückt in der sogenannten GSH-GSSG-Ratio. Wenngleich diese Reaktion reversibel ist, haben die entstehenden gemischten Disulfide eine längere Halbwertszeit als GSSG und diese Proteine sind in ihrer Funktion verändert(4;12;13;23;60).

Da Thiolgruppen ubiquitär in der Zelle an verschiedensten Proteinen vorkommen, existieren über die Auswirkungen der Thiolierung von Proteinen zahlreiche Hypothesen: Dickinson et al. beschreiben bereits unter physiologischen Bedingungen hohe GSSG-Konzentrationen im endoplasmatischen Reticulum, wo die Bildung von gemischten Disulfiden eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung spielt(12). Eine Erhöhung der GSSG-Konzentration könnte hier neu gebildete Proteine in ihrer Funktion verändern. Droge et al. diskutieren dabei eine Glutathion-abhängige Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise NFκB und auf diesem Weg eine Beeinflussung der T-Zellaktivierung und IL-2-abhängiger Signalwege(13). Dies erscheint für diese Arbeit besonders interessant im Hinblick auf Tacrolimus als IL-2-Antagonist und seine Wirkung über die Hemmung der T-Zell-Aktivierung. Darüber hinaus besitzen zahlreiche an der Signaltransduktion beteiligte Proteine in ihrem Ladungszustand kritische und reaktive Thiole. Darunter zu finden sind verschiedene Rezeptoren, an der Ubiquitinylierung beteiligte Proteine, Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren(2).

4.3 Verringerung von Ischämie-Reperfusionsschäden im isoliert-perfundierten Modell durch Tacrolimus

Ähnliche Untersuchungen wie mit Fettlebern wurden in der Folge mit normalen Lebern im isoliert-perfundierten Modell durchgeführt. Hierbei sammelten wir erste Erkenntnisse mit möglichen Interaktionen einerseits zwischen Tacrolimus und Sauerstoffradikalen beziehungsweise zwischen Tacrolimus und Glutathion-Metabolismus andererseits. Die Perfusion der Lebern mit Tacrolimus in Konzentrationen von 10- bzw. 50 ng/ml zeigte eine dosisabhängige Zytoprotektion der nachfolgend mit H₂O₂ perfundierten Lebern. Die LDH-Freisetzung war in der 50 ng-Gruppe signifikant verringert (Abb.10). Dies ging einher mit einer signifikanten Reduktion von zytotoxischem intrazellulärem GSSG (Abb.11) bei gleich bleibender intrazellulärer Konzentration von GSH (Abb.12). Bei gleichzeitig unveränderter Aktivität der an Oxidation und Reduktion von Glutathion beteiligten Enzyme GSH-

Reduktase, -Peroxidase und Katalase (Abb.13-15) postulieren wir daraus Veränderungen der Glutathion-Freisetzung aus Leberzellen.

Trotz dieser Erkenntnisse stellt die isolierte Organperfusion ein artifizielles in vitro-Modell dar, das die Mechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens nur unzureichend wiederzugeben vermag, handelt es sich beim Ischämie-Reperfusionsschaden doch um einen komplexen systemischen Prozess, der in unterschiedlichen Kompartimenten abläuft, die im isoliert perfundierten Modell nicht existieren. Von grosser Bedeutung für unsere weiteren Untersuchungen waren daher Daten ebenfalls aus unserer Arbeitsgruppe, die in einem realitätsnahen Modell - der *warmen Ischämie* - Störungen der Glutathionhomöostase während Ischämie und Reperfusion zeigten. Diese Störungen konnten – bei damit einhergehenden protektiven Wirkungen - durch ischämische Präkonditionierung verhindert werden(57). Dabei wurde aufgrund von Untersuchungen mit dem p38 MAPK-Inhibitor SB203580 beziehungsweise dem p38 MAPK-Induktor Anisomycin indirekt auch die Vermittlung dieses Effektes durch p38 MAPK gezeigt.

Dabei beschreiben Sanchez-Perez et al. eine vermehrte Expression von p38 MAPK durch Tacrolimus(54).

Diese Erkenntnisse schlugen den Bogen zu den jetzt durchgeführten Arbeiten mit Tacrolimus im Modell der kalten Ischämie bei Lebertransplantation.

4.4 Verbesserung der hepatozellulären Integrität durch Tacrolimus-Rinse nach Lebertransplantation

Wir übertrugen den Ansatz der Tacrolimus-Rinse – ausgehend von den Daten der amerikanischen klinischen Studie - in das Modell der syngen, arterialisierten Lebertransplantation an der Ratte und fügten der Rinse-Solution Tacrolimus in einer Konzentration von 10- beziehungsweise 50 ng/ml zu und verglichen diese Gruppen mit einer Kontrollgruppe, die Rinse-Solution ohne Zusatz erhalten hatte (jeweils n=5).

Dabei sahen wir eine signifikante Reduktion von GOT und GPT nach 2 Stunden Reperfusion. Überraschenderweise war der protektive Effekt der Tacrolimus-Rinse in der 10 ng-Gruppe stärker ausgeprägt als in der 50 ng-Gruppe. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der LDH als Maß für organunspezifischen zellulären Schaden, bei der die Tacrolimus-Rinse zu einer signifikanten Protektion mit einer Verringerung auf ein Drittel des Wertes der Kontrollgruppe in der 10ng-Gruppe führte.

Dies steht im Gegensatz zu Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe im isoliert perfundierten Modell der Rattenleber, die eine dosisabhängige protektive Wirkung einer Tacrolimus-Behandlung gezeigt hatten (Abb.10).

4.5 Inverse Dosis-Wirkungsbeziehung der Tacrolimus-Rinse bei Lebertransplantation

Die Ursachen der umgekehrten Dosis-Wirkungsbeziehung bleiben derzeit noch unklar. Tacrolimus besitzt eine schmale therapeutische Breite und seine häufigste Nebenwirkung bei längerfristigem Gebrauch liegt in seiner Nephrotoxizität. Während systemische Wirkungen im isoliert perfundierten Modell nicht existieren, böten diese im in vivo Modell einen Erklärungsansatz für die im Vergleich zu den 50ng-Tieren niedrigeren Transaminasen der 10ng-Tiere. Auch existieren Daten zur kurzfristigen Nephrotoxizität von Tacrolimus in einem Modell der Lebertransplantation am Schwein(15). Die Untersuchung der Rinse-Solution, nachdem sie die Transplantatleber durchflossen hatte, zeigte jedoch ein erstaunliches Bild: Bei jeweils zwei in der 10- und 50 ng-Gruppe untersuchten Proben lagen die Tacrolimus-Spiegel in der 10 ng-Gruppe unterhalb der Nachweisgrenze beziehungsweise in der 50ng-Gruppe bei 4 und 9 ng/ml. Die Lebern hatten das mit der Perfusionslösung verabreichte Tacrolimus offenbar beinahe vollständig aufgenommen. Dies lässt eine akute Toxizität von Tacrolimus aufgrund systemischer Nebenwirkungen als Erklärung unwahrscheinlich erscheinen. Dies legt die Vermutung nahe, die Ursache für die umgekehrte Dosiswirkungsbeziehung könnte doch in der Leber selbst liegen. Grundsätzlich sollte aber beim Vergleich von Daten aus dem isoliert-perfundierten Modell mit dem in-vivo-Modell beachtet werden, dass es sich beim Ischämie-Reperfusionsschaden um einen komplexen systemischen Prozess handelt, bei dem humorale und auch neuronale Faktoren eine Rolle spielen, die im in vitro Modell nicht wiedergegeben werden können.

4.6.1 Veränderungen des Glutathion-Stoffwechsels nach Lebertransplantation als protektiver Wirkmechanismus von Tacrolimus

Um mehr über die Wirkungen von Glutathion bei Ischämie und Reperfusion zu erfahren, untersuchten wir zunächst seine Konzentration in der Zelle nach Reperfusion. Bei

Reperfusion kommt es zu einem Anstieg von oxidiertem GSSG. In unseren Versuchen zeigte sich jedoch bei Tacrolimus-Gabe eine signifikante Abnahme der intrazellulären Konzentration von GSSG in der 10ng-Gruppe gegenüber Kontrolle (Abb.21). Angesichts der beschriebenen toxischen Wirkungen von GSSG(2;12) postulieren wir hieraus eine *Zytoprotektion durch Tacrolimus über eine Verminderung von toxischem intrazellulärem GSSG*.

Intrazelluläres GSH war zwischen Kontroll-, 50-, und 10 ng-Gruppe nicht signifikant verändert (Abb.20). Die scheinbar niedrigeren intrazellulären GSH-Werte in der 10ng-Gruppe interpretieren wir im Zusammenhang mit einer hohen Standardabweichung in dieser Gruppe.

Im isoliert-perfundierten Modell zeigte sich dabei, dass die an Oxidation und Reduktion von Glutathion beteiligten Enzyme GSH-Peroxidase, GSH-Reduktase und Katalase bei Tacrolimus-Gabe unveränderte Aktivität zeigen (Abb.13-15). Die Veränderungen der intrazellulären GSSG-Spiegel können also nicht durch eine veränderte Bildung von Glutathion erklärt werden, sondern müssen durch einen gesteigerten Export bedingt sein. Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch im Moment eine zusätzlich verringerte ROS-Bildung aufgrund der Tacrolimus-Rinse als Ursache für die erniedrigten GSSG-Spiegel in der Zelle, zumal hemmende Wirkungen von Tacrolimus auf Kupfferzellen bei warmer Ischämie beschrieben wurden(44). Eigene Untersuchungen hierzu wurden bislang nicht durchgeführt.

Die bei der orthotopen Lebertransplantation gewonnenen Ergebnisse korrelieren grundsätzlich mit denen aus dem isoliert perfundierten Modell, wo die Tacrolimus-Perfusion ebenfalls zu einer Erniedrigung von intrazellulärem GSSG bei gleich bleibendem GSH geführt hatte (Abb11,12). Auch hier sahen wir jedoch wieder die Diskrepanz zwischen einer dosisabhängigen Wirkung gegenüber dem umgekehrten Befund im in vivo Modell.

In Übereinstimmung mit den Voruntersuchungen unserer Gruppe im isoliert perfundierten Modell, die eine Reduktion des LDH-Efflux bei H₂O₂-Gabe nach vorangegangener Tacrolimus-Perfusion gezeigt hatten (Abb.10), postulieren wir die Induktion einer zellulären H₂O₂-Resistenz durch Tacrolimus, die durch Veränderungen der zellulären Glutathion-Homöostase bedingt sein könnte.

4.7 Voruntersuchungen des p38 MAPK-pathways

In der Literatur wurde die Hemmung des p38MAPK pathways durch Tacrolimus beschrieben(48;54). Mitogen aktivierte Protein-Kinasen zählen zur Familie der Serin-/Threonin-Kinasen und besitzen zentrale Bedeutung bei Zellwachstum, Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung. Zu den MAPK-Signalwegen gehören dabei ERK1/2, c-Jun und p38 MAPK(45;47).

In Vorversuchen im isoliert-perfundierten Modell bewirkte die Gabe des p38 MAPK-Inhibitors SB203580 eine der Tacrolimus-Präkonditionierung vergleichbare Zytrotektion, ausgedrückt durch eine Verringerung des LDH-Efflux und eine verminderte Akkumulation von intrazellulärem GSSG. Die gleichzeitige Gabe von Tacrolimus und SB203580 führte dabei zu keiner relevanten Erniedrigung der LDH gegenüber der alleinigen Gabe von Tacrolimus (Abb.34). Einen gegenteiligen Effekt entfaltete p38 MAPK in Voruntersuchungen unserer Gruppe im Modell der *ischämischen Präkonditionierung (IP)*: Hier führte die Gabe von SB203580 zu einer *Verminderung* des protektiven Effektes der ischämischen Präkonditionierung(57). Diese Ergebnisse lassen jedoch derzeit keine Rückschlüsse auf die experimentelle Lebertransplantation zu. Nur der direkte Nachweis von p38 MAPK beispielsweise mittels Western Blot könnte deren Rolle zweifelsfrei belegen.

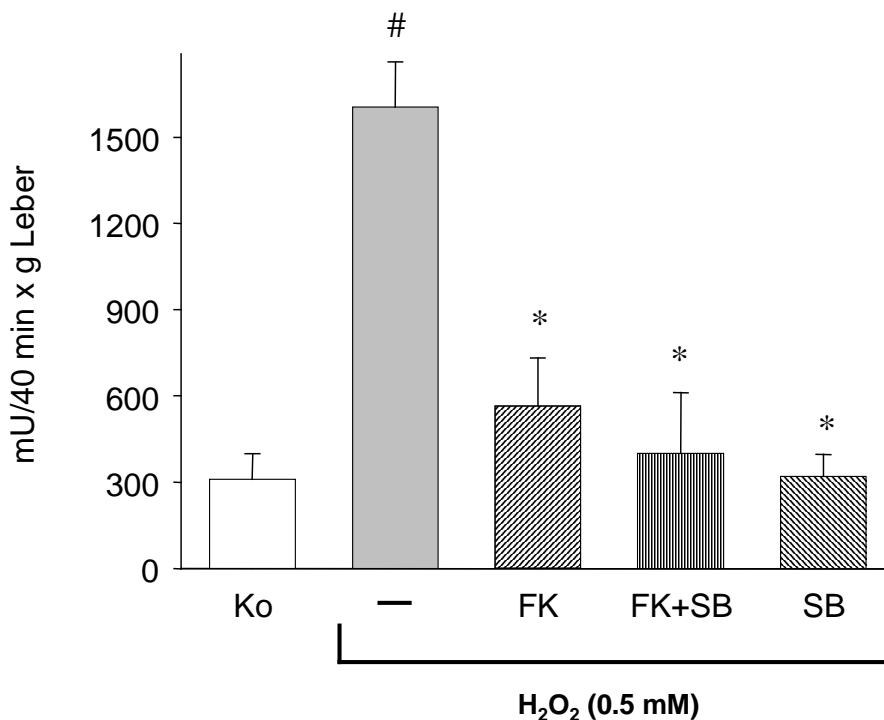


Abb. 29: LDH-Efflux im isoliert perfundierten Modell: Bedeutung der p38 MAPK für ROS-vermittelte Zellschäden; nach Bilzer et al, unveröffentlichte Daten

4.8 Glutathion-Freisetzung in die Galle

Als mögliche Ursache für die verminderte *intrazelluläre* GSSG-Konzentration bei Gabe von Tacrolimus sehen wir einen signifikant gesteigerten Export von zytotoxischem GSSG in die Galle. Dieser Prozess erreicht in der 10-ng-Gruppe statistische Signifikanz (Abb.22). Dies stärkt unsere These, dass die Zytoprotektion bei Tacrolimus-Gabe durch eine veränderte Glutathionhomöostase vermittelt werden könnte.

Dabei war auch die Freisetzung von reduziertem GSH erhöht, wiederum am stärksten in der 10 ng-Gruppe (Abb.22), was auch dadurch erklärbar ist, dass es sich hierbei um die Menge an Gesamt-GSH, also die Summe aus Dies ist insofern überraschend, als die Zelle während der Reperfusion GSH zur Aufrechterhaltung ihres antioxidativen Potentials benötigt. Diese Daten lassen bei gleichzeitiger Zytoprotektion durch die Tacrolimus-Rinse zwei mögliche Schlüsse zu: Zum einen könnte die Zelle GSH als potentielle Quelle von ROS genauso wie GSSG ebenfalls aus der Zelle exportieren. Dies steht auch nicht in Widerspruch zu gleich bleibenden *intrazellulären* GSH-Spiegeln, da die Konzentration von intrazellulärem GSH physiologischerweise um den Faktor 1000 höher liegt als dessen extrazelluläre Konzentration und die von uns beobachtete Verdreifachung des GSH-Exportes in die Galle somit keine relevante Auswirkung auf die Konzentration von intrazellulärem Glutathion hat.

Eine zweite, weitaus einfachere Erklärung für den gesteigerten GSH-Export - und gleichzeitig Bestätigung der protektiven Wirkung von Tacrolimus - wäre die Hypothese einer durch die Tacrolimus-Rinse wiederhergestellten Zellhomöostase. Entsprechende Transportprozesse sind ATP-abhängig, und daher können nur intakte Zelle Glutathion überhaupt exportieren. Der Vorstellung einer unkontrollierten Freisetzung durch nekrotische Zellen widerspricht in unserem Fall die Verminderung von Transaminasen und LDH. Die vermehrte Freisetzung von reduziertem Glutathion erhöht gleichzeitig die antioxidative Kapazität im Extrazellulärraum. Dies ist insofern ein interessanter Aspekt der Tacrolimus-Wirkung, als der Extrazellulärraum bei IRS im Gegensatz zum Intrazellulärraum physiologischerweise über kein ausreichendes antioxidatives Potential verfügt.

4.9 Glutathion-Freisetzung in die Blutbahn

Die Glutathionspiegel im Blut liegen im Ruhezustand um den Faktor 1000 unter denen in Hepatozyten(6). Während der Reperfusion setzen Kupfferzellen und Granulozyten große

Mengen ROS zunächst in die Sinusoide frei, was als „vaskulärer oxidativer Stress“ postuliert wird(5). Dieser Umstand bildet auch die Grundlage der Glutathion-Behandlung beim Ischämie-Reperfusionsschaden, die die antioxidative Kapazität im Sinusoidalraum erhöht. In unseren Versuchen im Modell der Lebertransplantation konnten wir eine gesteigerte GSH-Freisetzung in die Galle zeigen. Eine vermehrte sinusoidale Freisetzung von reduziertem Glutathion würde daher die Induktion eines antioxidativen Schutzmechanismus durch Tacrolimus bedeuten.

Aus methodischen Gründen waren die intraoperativen Glutathionmessungen nicht wertbar: Während der kritischen Reperfusionsphase erhielten die Tiere zum Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten über die Laparotomie und durch die intraoperativen Blutabnahmen zur Aufrechterhaltung ihres Kreislaufes zu individuell unterschiedlichen Zeitpunkten Flüssigkeitssubstitution, was die gemessenen Plasmaspiegel entsprechend beeinflusst. Die gesamte Flüssigkeitszufuhr betrug jedoch bei allen Tiere zwischen 2 und 2,5 ml Volumen, sodass die am Versuchsende bestimmten Werte (GOT, GPT, LDH) als valide betrachtet werden können, während bei den äußerst geringen GSH-/ GSSG-Konzentrationen auch kleine Volumenunterschiede bereits zu relevanten Fehlern führen können.

4.10 Gallefluss:

Nach Lebertransplantation kam es zu einem massiven Rückgang der Galleproduktion der Lebern. Während 120 min Reperfusion zeigte sich bei den mit Tacrolimus behandelten Tieren gegenüber den Kontrolltieren zwar eine schnellere funktionelle Erholung, gemessen am Gesamt-Gallefluss, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

4.11 Lichtmikroskopie:

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der angefertigten Gewebeschnitte (Institut für Pathologie der LMU, München) zeigte, wie auch bei Voruntersuchungen, nach einer Reperfusionszeit von 120 Minuten in allen Gruppen weitgehend intaktes Gewebe und keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Gleichzeitig konnte damit aber die Qualität der gesamten Prozedur (Explantation/ Transplantation/ Reperfusion) bestätigt werden.

5. Zusammenfassung:

Seit Beginn der neunziger Jahre sind protektive Wirkungen von Tacrolimus auf Ischämie-Reperfusionsschäden der Leber bekannt. Die in bisherigen experimentellen Arbeiten beschriebene *Spender*präkonditionierung erscheint jedoch wegen potenzieller Nebenwirkungen klinisch nicht umsetzbar.

Eine amerikanische Arbeitsgruppe konnte dabei in einer klinischen Pilot-Studie zeigen, dass die Spülung humaner Lebern mit Tacrolimus (20ng/ml) vor Implantation zu einer signifikanten Reduktion von Ischämie-Reperfusionsschäden nach Lebertransplantation führte. Unsere Arbeitsgruppe hat umfangreiche Untersuchungen mit Glutathion als Therapeutikum von Ischämie-Reperfusionsschäden nach warmer und kalter Ischämie durchgeführt. Gleichzeitig scheint, dass *intrazelluläres* Glutathion bei Anwesenheit hoher Konzentrationen von ROS über die Induktion von Radikalkettenreaktionen beziehungsweise die Thiolierung anderer Proteine *selbst* als Mediator von Ischämie-Reperfusionsschäden fungieren kann.

In Vorarbeiten untersuchten wir die Wirkung von Tacrolimus im isoliert-perfundierten Modell der Rattenleber.

Die Vorbehandlung mit Tacrolimus bewirkte bei Zufuhr von H₂O₂ eine Verringerung des ROS-induzierten zellulären Schadens, ausgedrückt in einer dosisabhängigen, signifikanten Verringerung des LDH-Efflux.

Als Ursache hierfür wird eine verminderte intrazelluläre Akkumulation von zytotoxischem GSSG diskutiert, das nach Tacrolimus-Gabe vermehrt in Galle und Blut freigesetzt wurde, während die Aktivität der an Bildung und Abbau von GSH/GSSG beteiligten Enzyme Katalase, GSH-Peroxidase und GSSG-Reduktase unverändert war. Dieser Effekt konnte durch Gabe des p38 MAPK Inhibitors SB203580 imitiert werden.

Aus diesen Erkenntnissen postulierten wir die Induktion einer zellulären H₂O₂-Resistenz durch Tacrolimus auf dem Boden einer durch Hemmung von p38 MAPK vermittelten Steigerung des hepatozellulären GSSG-Exportes.

Wir übertrugen daraufhin das Konzept der Tacrolimus-Rinse in das Modell der arterialisierten, orthotopen Lebertransplantation an der Ratte.

Die Spülung der Leber (20ml) mit Tacrolimus unmittelbar vor Implantation in den Empfängerorganismus führte zu einer signifikanten Reduktion des Ischämie-Reperfusionsschadens, gemessen in Transaminasen, LDH sowie Gallefluss.

Das höchste Ausmass an Zytoprotektion wurde durch eine Tacrolimus-Konzentration von 10 ng/ml erreicht, wobei die protektive Wirkung der Tacrolimus-Rinse in der 10 ng-Gruppe stärker ausgeprägt war als in der 50 ng-Gruppe. Die Ursachen für diese inverse Dosis-Wirkungsbeziehung sind unklar, zumal keine statistische Signifikanz zwischen den beiden Gruppen besteht. Außerdem fehlen bislang systematische Untersuchungen zur optimalen Tacrolimus-Dosis in dieser Versuchsanordnung.

Als Wirkmechanismus der Tacrolimus-Rinse postulieren wir - aufbauend auf Voruntersuchungen im isoliert perfundierten Modell und den erhobenen in-vivo-Daten - eine über die Hemmung von p38 MAPK vermittelte Veränderung der zellulären Glutathionhomöostase:

Hepatozyten setzten im Modell der Lebertransplantation nach Tacrolimus-Rinse vermehrt zytotoxisches GSSG in Blut und Galle frei, wodurch ROS-vermittelte Zellschäden während der Reperfusion minimiert werden.

Zusammenfassend kann aufgrund der bisherigen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Tacrolimus-Rinse eine neue und klinisch praktikable Therapieoption von Ischämie-Reperfusionsschäden der Leber darstellen könnte.

Diese Arbeit wurde gefördert durch die Firma Astellas Deutschland, München

6. Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Activator protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell-lymphoma, Protoonkogen
CsA	Cyclosporin A
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
DTNB	,5' Dithiobis(nitrobenzoesäure)
ERK	Extracellular signal regulated Kinase

FKBP	FK-binding protein
FK 506	Calcineurin-Inhibitor, Immunsuppressivum, Syn.: Tacrolimus
GDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transferase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
KC	Kupffer cell, Kupffer Zelle
LDH	Laktatdehydrogenase
LTX	Lebertransplantation
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MRP	Multidrug resistance-associated protein
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NADPH	Nikotinadenindinukleotidphosphat
NEM	N-Ethylmaleimid
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NFκB	Nuclear factor κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NTCP	Natrium taurocholate cotransporting proteine
OATP	Organische Anionen transportiertes Polypeptid
ROS	Reactive oxygen species/ Sauerstoffradikale
SB 203586	p38 MAPK Inhibitor
SOD	Superoxiddismutase
UW	University of Wisconsin Perfusion-/ Lagerungslösung

7. Lebenslauf

Sebastian Pratschke, geb. 29.10.1977 in Bad Reichenhall

Eltern: Ekkehard Pratschke, geb. 1.10.1950 in Teisendorf, Monika Pratschke, geb. Hieber, geb. 16.10.1948 in Bad Reichenhall

Geschwister: Margarete Pratschke, geb. 21.10.1974 in München, Katharina Pratschke, geb. 13.5.1980 in München

1984-1988: Grundschule Neuried bei München

1988-1992: Gymnasium Fürstenried-West, München

1992-1997: Karlsgymnasium, Bad Reichenhall

1997-1998: Zivildienst beim Diakonischen Werk, Bad Reichenhall

SS1999: Studium der Rechtsmedizin, Universität Heidelberg

WS1999-SS2001: Studium der Humanmedizin, vorklinischer Studienabschnitt, Universität Heidelberg

Sommer 2001: Physikum in Heidelberg

WS2001-SS2002: 1. klinischer Studienabschnitt an der Fakultät für klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg

Sommer 2002: 1. Staatsexamen in Mannheim

WS2002-SS2004: 2. Klinischer Studienabschnitt an der Ludwigs-Maximilians-Universität, München

Sommer 2004: 2. Staatsexamen in München

WS2004-SS2005: Praktisches Jahr am Klinikum Grosshadern der LMU, München in den Fächern Chirurgie, Innere Medizin und Anästhesie

November 2005: 3. Staatsexamen in München

Dezember 2005: Ärztliche Approbation

Seit 1.1.2006: Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Grosshadern der LMU, München

8. Danksagung:

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mich unentwegt zur Fertigstellung dieser Arbeit angespornt haben.

Darüber hinaus danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Rolf Schauer zunächst für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Er hat mir, als meine Promotion nach mehrjähriger Arbeit vor dem Scheitern stand, mit der Wahl eines geeigneten Themas den entscheidenden Anstoß gegeben und mit seiner klinischen und experimentellen Erfahrung auf dem Gebiet der Leberchirurgie zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit verholfen.

In ganz besonderem Maße bin ich Frau Ingrid Liss zu Dank verpflichtet, die mit ihrer unentgeltlichen und unermüdlichen Hilfe die für diese Arbeit unerlässlichen Glutathion-Messungen durchgeführt hat.

Darüberhinaus möchte ich meiner Kollegin Frau Dr. Nicole Terpolilli (Neurochirurgische Klinik Grosshadern) danken, die mich in die Grundlagen der statistischen Auswertung und grafischen Darstellung wissenschaftlicher Daten eingeführt hat.

Ich möchte mich auch bedanken bei den Doktoranden und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Krombach und Baethmann/Plesnila (Institut für Chirurgische Forschung, LMU), die mich in bester Kollegialität bei zahllosen Fragen und Problemen unterstützt haben.

Außerdem danke ich den Herrn Dres. Rauch, Durner und Holdenrieder (Institut für Klinische Chemie Grosshadern) für ihre unbürokratische Hilfe bei der Bestimmung von Leberwerten, Arzneimittelspiegeln, etc. nicht nur bei diesem Projekt.

Mein Dank gilt auch Frau Alke Schropp (Institut für Chirurgische Forschung, München) für die Anfertigung immunhistochemischer Spezialfärbungen und die Beratung bei grundlegenden Fragen der Gewebeaufarbeitung.

Meinem Chef Herrn Professor Doktor Karl-Walter Jauch gebührt Dank, dass er die nötige Geduld bis zur Fertigstellung meiner Promotion aufgebracht hat.

9. Literaturverzeichnis

- (1) Angelico M. Donor liver steatosis and graft selection for liver transplantation: a short review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005 September;9(5):295-7.
- (2) Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic Biol Med* 1999 November;27(9-10):936-44.
- (3) Barshes NR, Goodpastor SE, Goss JA. Pharmacologic immunosuppression. *Front Biosci* 2004 January 1;9:411-20.
- (4) Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007 March;292(3):H1227-H1236.
- (5) Bilzer M, Baron A, Schauer R, Steib C, Ebensberger S, Gerbes AL. Glutathione treatment protects the rat liver against injury after warm ischemia and Kupffer cell activation. *Digestion* 2002;66(1):49-57.
- (6) Bilzer M, Paumgartner G, Gerbes AL. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after hypothermic preservation. *Gastroenterology* 1999 July;117(1):200-10.
- (7) Busuttill RW, Lake JR. Role of tacrolimus in the evolution of liver transplantation. *Transplantation* 2004 May 15;77(9 Suppl):S44-S51.
- (8) Busuttill RW, Tanaka K. The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 2003 July;9(7):651-63.
- (9) Cazanave S, Berson A, Haouzi D, Vadrot N, Fau D, Grodet A et al. High hepatic glutathione stores alleviate Fas-induced apoptosis in mice. *J Hepatol* 2006 December 18.
- (10) Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996 March;23(3):506-14.
- (11) Crenesse D, Laurens M, Heurteaux C, Cursio R, Saint-Paul MC, Schmid-Alliana A et al. Rat liver ischemia-reperfusion-induced apoptosis and necrosis are decreased by FK506 pretreatment. *Eur J Pharmacol* 2003 July 25;473(2-3):177-84.
- (12) Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci* 2002 November;973:488-504.
- (13) Droge W, Schulze-Osthoff K, Mihm S, Galter D, Schenk H, Eck HP et al. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. *FASEB J* 1994 November;8(14):1131-8.
- (14) El-Wahsh M, Fuller B, Davidson B, Rolles K. Hepatic cold hypoxia and oxidative stress: implications for ICAM-1 expression and modulation by glutathione during experimental isolated liver preservation. *Cryobiology* 2003 October;47(2):165-73.

- (15) Espi A, Regueira FM, Toledo G, ez-Caballero A, Baixauli J, Hernandez JL et al. Influence of hepatic ischemia-reperfusion injury on tacrolimus acute renal toxicity in pigs. *Transplant Proc* 2002 December;34(8):3053-6.
- (16) Futagawa Y, Terasaki PI. An analysis of the OPTN/UNOS Liver Transplant Registry. *Clin Transpl* 2004;315-29.
- (17) Futagawa Y, Terasaki PI, Waki K, Cai J, Gjertson DW. No improvement in long-term liver transplant graft survival in the last decade: an analysis of the UNOS data. *Am J Transplant* 2006 June;6(6):1398-406.
- (18) Gao W, Currin RJ, Lemasters JJ, Connor HD, Mason RP, Thurman RG. Reperfusion rather than storage injury predominates following long-term (48 h) cold storage of grafts in UW solution: studies with Carolina Rinse in transplanted rat liver. *Transpl Int* 1992;5 Suppl 1:S329-S335.
- (19) Garcia-Criado FJ, Lozano-Sanchez F, Fernandez-Regalado J, Valdunciel-Garcia JJ, Parrero-Manchado F, Silva-Benito I et al. Possible tacrolimus action mechanisms in its protector effects on ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1998 October 15;66(7):942-3.
- (20) Garcia-Criado FJ, Palma-Vargas JM, Valdunciel-Garcia JJ, Toledo AH, Misawa K, Gomez-Alonso A et al. Tacrolimus (FK506) down-regulates free radical tissue levels, serum cytokines, and neutrophil infiltration after severe liver ischemia. *Transplantation* 1997 August 27;64(4):594-8.
- (21) Garcia-Criado FJ, Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Phillips ML, Paez-Rollys A, Misawa K. Role of P-selectin in total hepatic ischemia and reperfusion. *J Am Coll Surg* 1995 October;181(4):327-34.
- (22) Geier A, Dietrich CG, Grote T, Beuers U, Pruffer T, Fraunberger P et al. Characterization of organic anion transporter regulation, glutathione metabolism and bile formation in the obese Zucker rat. *J Hepatol* 2005 December;43(6):1021-30.
- (23) Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP, Seifalian AM, Davidson BR. The role of thiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2006;12(23):2891-901.
- (24) Gomez-Lechon MJ, Serralta A, Donato MT, Jimenez N, O'connor E, Castell JV et al. The immunosuppressant drug FK506 prevents Fas-induced apoptosis in human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2004 December 15;68(12):2427-33.
- (25) Gonzalez-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative stress and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993 February;91(2):456-64.
- (26) He SQ, Zhang YH, Venugopal SK, Dicus CW, Perez RV, Ramsamooj R et al. Delivery of antioxidative enzyme genes protects against ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice. *Liver Transpl* 2006 December;12(12):1869-79.
- (27) Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg* 2003 May;16(3):127-40.

- (28) Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 June;290(6):G1083-G1088.
- (29) Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003 January;284(1):G15-G26.
- (30) Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Am J Physiol* 1991 March;260(3 Pt 1):G355-G362.
- (31) Jaeschke H, Farhood A, Fisher MA, Smith CW. Sequestration of neutrophils in the hepatic vasculature during endotoxemia is independent of beta 2 integrins and intercellular adhesion molecule-1. *Shock* 1996 November;6(5):351-6.
- (32) Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003 October;125(4):1246-57.
- (33) Kaibori M, Inoue T, Tu W, Oda M, Kwon AH, Kamiyama Y et al. FK506, but not cyclosporin A, prevents mitochondrial dysfunction during hypoxia in rat hepatocytes. *Life Sci* 2001 May 25;69(1):17-26.
- (34) Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983 January;93(1 Pt 1):64-9.
- (35) Kato T, Sato Y, Kurosaki I, Yamamoto S, Hirano K, Nakatsuka H et al. FK506 may reduce early liver injury following living related liver transplantation. *Hepatogastroenterology* 2006 July;53(70):580-3.
- (36) Kawano K, Bowers JL, Clouse ME. Protective effect of FK 506 on hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation: influence on hepatic microcirculation. *Transplant Proc* 1995 February;27(1):362-3.
- (37) Kawano K, Bowers JL, Kim YI, Tatsuma T, Kitano S, Kobayashi M et al. FK506 reduces oxidative hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation. *Transplant Proc* 1996 June;28(3):1902-3.
- (38) Ketterer B. The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev* 1982;13(1):161-87.
- (39) Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B et al. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002 December;18(6):529-35.
- (40) Krishnadasan B, Naidu B, Rosengart M, Farr AL, Barnes A, Verrier ED et al. Decreased lung ischemia-reperfusion injury in rats after preoperative administration of cyclosporine and tacrolimus. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002 April;123(4):756-67.
- (41) Laurens M, Scozzari G, Patrono D, St-Paul MC, Gugenheim J, Huet PM et al. Warm ischemia-reperfusion injury is decreased by tacrolimus in steatotic rat liver. *Liver Transpl* 2006 February;12(2):217-25.

- (42) Lehmann TG, Wheeler MD, Froh M, Schwabe RF, Bunzendahl H, Samulski RJ et al. Effects of three superoxide dismutase genes delivered with an adenovirus on graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Transplantation* 2003 July 15;76(1):28-37.
- (43) Mackay K, Mochly-Rosen D. Involvement of a p38 mitogen-activated protein kinase phosphatase in protecting neonatal rat cardiac myocytes from ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2000 August;32(8):1585-8.
- (44) Matsuda T, Yamaguchi Y, Matsumura F, Akizuki E, Okabe K, Liang J et al. Immunosuppressants decrease neutrophil chemoattractant and attenuate ischemia/reperfusion injury of the liver in rats. *J Trauma* 1998 March;44(3):475-84.
- (45) Mayor F, Jr., Jurado-Pueyo M, Campos PM, Murga C. Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle* 2007 March;6(5):528-33.
- (46) Okaya T, Lentsch AB. Hepatic expression of S32A/S36A IkappaBalpha does not reduce postischemic liver injury. *J Surg Res* 2005 April;124(2):244-9.
- (47) Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001 April;22(2):153-83.
- (48) Plath KE, Grabbe J, Gibbs BF. Calcineurin antagonists differentially affect mediator secretion, p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases from immunologically activated human basophils. *Clin Exp Allergy* 2003 March;33(3):342-50.
- (49) Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Hoffmann RM, Eckhoff D, Isaacs R, Knechtle SJ et al. Impact of donor factors and preservation on function and survival after liver transplantation. *Transplant Proc* 1993 December;25(6):3031-3.
- (50) Rebbeor JF, Connolly GC, Ballatori N. Inhibition of Mrp2- and Ycf1p-mediated transport by reducing agents: evidence for GSH transport on rat Mrp2. *Biochim Biophys Acta* 2002 February 15;1559(2):171-8.
- (51) Rentsch M, Kienle K, Mueller T, Vogel M, Jauch KW, Pullmann K et al. Adenoviral bcl-2 transfer improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation* 2005 November 27;80(10):1461-7.
- (52) Sakr MF, Hassanein TI, Zetti GM, Van Thiel DH. FK 506 ameliorates the hepatic injury associated with ischemia. *Life Sci* 1990;47(8):687-91.
- (53) Sakr MF, Zetti GM, Hassanein TI, Farghali H, Nalesnik MA, Gavalier JS et al. FK 506 ameliorates the hepatic injury associated with ischemia and reperfusion in rats. *Hepatology* 1991 May;13(5):947-51.
- (54) Sanchez-Perez I, Rodriguez-Hernandez CJ, Manguan-Garcia C, Torres A, Perona R, Murguia JR. FK506 sensitizes mammalian cells to high osmolarity by modulating p38 MAP kinase activation. *Cell Mol Life Sci* 2004 March;61(6):700-8.

- (55) Schauer RJ, Bilzer M, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Schildberg FW et al. Microcirculatory failure after rat liver transplantation is related to Kupffer cell-derived oxidant stress but not involved in early graft dysfunction. *Transplantation* 2001 November 27;72(10):1692-9.
- (56) Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R et al. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg* 2004 February;239(2):220-31.
- (57) Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, op den WM, Fraunberger P, Bilzer M. Induction of cellular resistance against Kupffer cell-derived oxidant stress: a novel concept of hepatoprotection by ischemic preconditioning. *Hepatology* 2003 February;37(2):286-95.
- (58) 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 March 15;10(6):864-70.
- (59) Selzner M, Clavien PA. Fatty liver in liver transplantation and surgery. *Semin Liver Dis* 2001;21(1):105-13.
- (60) Shen D, Dalton TP, Nebert DW, Shertzer HG. Glutathione redox state regulates mitochondrial reactive oxygen production. *J Biol Chem* 2005 July 8;280(27):25305-12.
- (61) Soda Y, el-Assal ON, Yu L, Nagasue N. Suppressed endothelin-1 production by FK506 and cyclosporin A in ischemia/reperfusion of rat small intestine. *Surgery* 1999 January;125(1):23-32.
- (62) Soltys K, Dikdan G, Koneru B. Oxidative stress in fatty livers of obese Zucker rats: rapid amelioration and improved tolerance to warm ischemia with tocopherol. *Hepatology* 2001 July;34(1):13-8.
- (63) St Peter, Post DJ, Rodriguez-Davalos MI, Douglas DD, Moss AA, Mulligan DC. Tacrolimus as a liver flush solution to ameliorate the effects of ischemia/reperfusion injury following liver transplantation. *Liver Transpl* 2003 February;9(2):144-9.
- (64) Suetsugu H, Iimuro Y, Uehara T, Nishio T, Harada N, Yoshida M et al. Nuclear factor {kappa}B inactivation in the rat liver ameliorates short term total warm ischaemia/reperfusion injury. *Gut* 2005 June;54(6):835-42.
- (65) Sumimoto K, Inagaki K, Yamada K, Kawasaki T, Dohi K. Reliable indices for the determination of viability of grafted liver immediately after orthotopic transplantation. Bile flow rate and cellular adenosine triphosphate level. *Transplantation* 1988 October;46(4):506-9.
- (66) Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969 March;27(3):502-22.
- (67) Treska V, Molacek J, Kuntscher V, Liska V, Kobr J, Racek J et al. Immunosuppressive agents have an influence on ischemia-reperfusion injury in kidneys procured from a

- non-heart-beating donor: experimental study. *Transplant Proc* 2004 December;36(10):2931-4.
- (68) 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 February;117(2):195-200.
- (69) Wallemacq PE, Reding R. FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clin Chem* 1993 November;39(11 Pt 1):2219-28.
- (70) Wang YI, Li G, Zhang Y, Gao W, Yao Z. The expression of von Willebrand factor, soluble thrombomodulin, and soluble p-selectin during orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2007 January;39(1):172-5.
- (71) Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovasc Res* 1998 June;38(3):678-84.
- (72) Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK et al. Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome. *Hepatology* 1998 September;28(3):638-45.
- (73) Woolley SM, Farivar AS, Naidu BV, Rosengart M, Thomas R, Fraga C et al. Endotracheal calcineurin inhibition ameliorates injury in an experimental model of lung ischemia-reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004 February;127(2):376-84.
- (74) Yang CW, Ahn HJ, Jung JY, Kim WY, Li C, Choi BS et al. Preconditioning with cyclosporine A or FK506 differentially regulates mitogen-activated protein kinase expression in rat kidneys with ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2003 January 15;75(1):20-4.
- (75) Ogura J, Kobayashi M, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Alteration of Mrp2 and P-gp expression, including expression in remote organs, after intestinal ischemia-reperfusion. *Life Sci.* 2008 June 20;82(25-26):1242-8.
- (76) Sasaki K, Miyake H, Kinoshita T, Ikeyama S, Tashiro S. Protective effect of FK506 and Thromboxane synthase inhibitor on ischemia-reperfusion injury in non-heart-beating donor in rat orthotopic liver transplantation. *J Med Invest* 2004 February; 51(1,2): 76-83.