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

**Einfluss des Ernährungsstatus (Fasten) auf den
Konservierungs- und Reperfusionsschaden
der Leber**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2007

Vorgelegt von:
Henning Huth
Geboren am 11. August 1977 in Münster

Index

1.	Zusammenfassung	4
1.1.	Einfluß des Ernährungsstatus auf den Konservierungs- und Reperfusionsschaden der Leber	4
2.	Summary	7
2.1.	Effect of nutritional status on hepatic preservation and reperfusion injury	7
3.	Einleitung	9
3.1.	Lebertransplantation	9
3.2.	Reperfusionsschaden nach kalter Konservierung	12
3.3.	Beeinflussung des Konservierungs- und Reperfusionsschadens durch Fasten	14
4.	Fragestellung	16
5.	Material und Methoden	17
5.1.	Tiermodell	17
5.1.1.	<i>Tiere</i>	17
5.1.2.	<i>Explantation der Leber und ihre kalte Konservierung</i>	17
5.1.3.	<i>In vitro Reperfusion</i>	21
5.2.	Methoden und Techniken	24
5.2.1.	<i>Proben</i>	24
5.2.2.	<i>Parameter zur Einschätzung der Leberfunktion</i>	24
5.2.3.	<i>Fluoreszenz-Mikroskopie</i>	25
5.2.3.1.	<i>Auflichtmikroskopie der Leber</i>	25
5.2.3.2.	<i>Quantitative Videoanalyse</i>	25
5.2.4.	<i>Routinehistologie und Immunohistochemie</i>	26
5.3.	Experimentelles Protokoll	31
5.3.1.	<i>Ernährungsstatus der Tiere</i>	31
5.4.	Statistische Analyse	32
6.	Ergebnisse	33
6.1.	Tiergewicht	33
6.2.	Lebergewicht	34
6.3.	Lebermetabolismus	34

6.4.	Leberfunktion	39
6.4.1.	<i>Portalvenöser Druck</i>	39
6.4.2.	<i>Portalvenöse Widerstand</i>	40
6.4.3.	<i>Galleproduktion</i>	40
6.5.	Hepatozellulärer Schaden	42
6.5.1.	<i>Apoptotischer Zellschaden</i>	42
6.5.2.	<i>Nekrotischer Zellschaden</i>	43
6.6.	Histomorphologische Parameter	45
6.6.1.	<i>Vakuolisierung</i>	45
6.6.2.	<i>Endothelablösung</i>	46
6.6.3.	<i>Caspase-3 Expression</i>	46
6.6.4.	<i>Glykogenspeicherung</i>	47
6.7.	Korrelationsanalyse	49
6.7.1.	<i>Nahrungskarenz</i>	49
6.7.2.	<i>Lebergewicht</i>	50
6.7.3.	<i>Vakuolisierung</i>	52
6.7.4.	<i>Caspase-3 Expression</i>	54
6.7.5.	<i>Glykogenspeicherung</i>	55
7.	Diskussion	56
7.1.	Diskussion von Material und Methoden	56
7.1.1.	<i>Diskussion des Modells</i>	56
7.1.2.	<i>Diskussion der Methoden</i>	58
7.1.2.1.	<i>Apoptose und Nekrose</i>	58
7.1.2.2.	<i>Galleproduktion</i>	60
7.2.	Diskussion der Ergebnisse	61
7.3.	Schlussfolgerung	65
8.	Literatur	66
9.	Danksagung	75
10.	Lebenslauf	76

1. Zusammenfassung

Die Lebertransplantation ist heute als Therapie von „end stage“-Lebererkrankungen längst zur Routine geworden. Dabei steht ein zunehmender Bedarf an zu transplantierenden Organen einer immer weiter abnehmenden Anzahl von Spendern gegenüber.

Der Mangel an Spenderlebern wird möglicherweise dazu führen, dass in Einzelfällen auch Lebern zu Transplantationen herangezogen werden müssen, die auf Grund von Dysfunktion oder Funktionsversagen die Genesung des Patienten beeinträchtigen können. Daher haben seit langem verschiedene Arbeitsgruppen untersucht, ob durch gezielte Maßnahmen die Qualität der Transplantate verbessert werden kann.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war die Klärung der Frage, ob durch das Fasten von Versuchstieren – im vorliegenden Fall männliche Sprague-Dawley Ratten - vor der Explantation der Leber die Funktion der Leber nach kalter Konservierung bei der Reperfusion beeinflusst werden kann.

Es wurden 24 männliche Tiere in drei Gruppen mit je 8 Ratten eingeteilt. Die erste Gruppe hatte bis zur Explantation der Leber freien Zugang zur Nahrung. Die zweite Gruppe musste 12 Stunden und die dritte Gruppe 48 Stunden vor der Operation eine Nahrungskarenz einhalten.

Nach der Explantation wurden die Lebern mit jeweils 4°C kalter Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK) –Lösung perfundiert und in dieser für 24 Stunden bei 4°C konserviert. Danach erfolgte im Modell der isoliert-perfundierten Leber eine zweistündige Reperfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit-Lösung. Durch Fluoreszenzmikroskopie und histologische Verfahren wurde der Konservierungs- und Reperfusionsschaden, einschließlich des apoptotischen und nekrotischen Zelltods, beurteilt.

Mittels der Bestimmung von Gallefluss, Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffaufnahme sowie CO₂-Produktion und K⁺-Efflux wurden die hepatozelluläre Funktion, der Metabolismus und die Parenchym-Integrität bestimmt. Ferner wurden Leberenzymaktivitäten im Effluat bestimmt, um weitere Erkenntnisse zum hepatozellulären Schaden zu gewinnen.

Nach zweistündiger Reperfusion zeigte sich, dass die Lebern von Tieren mit freiem Nahrungszugang die geringsten Störungen metabolischer Parameter aufwiesen. Bei den Organen von Tieren mit 12 Stunden Nahrungskarenz fanden sich lediglich geringfügige Beeinträchtigungen, während sich bei Lebern von Tieren der 48 Stunden Fastengruppe eine ausgeprägte Verschlechterung der metabolischen Funktion nachweisen ließ.

Vergleicht man die Galleproduktion, so ist sie bei Tieren mit freiem Nahrungszugang am höchsten und bei Tieren mit 48 Stunden Nahrungskarenz am geringsten. Betrachtet man allerdings die Galleproduktion in Abhängigkeit vom Lebergewicht, relativierte sich dieses Ergebnis, da die geringere Menge Galleflüssigkeit bei den Tieren, die gefastet hatten, auch einem reduzierten Lebergewicht gegenüber stand.

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte überraschenderweise, dass nach 48 Stunden Nahrungskarenz die geringste Anzahl apoptotischer Zellen zu beobachten war. Dies erstaunte insofern, da dies mit der stärksten Beeinträchtigung der metabolischen Parameter und der geringsten Produktionsleistung von Galleflüssigkeit einherging. Demgegenüber war bei geringerer Apoptose eine signifikant erhöhte Freisetzung von Leberenzymen im Effluat zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass ausgedehnte Nahrungskarenz aufgrund eines Verlusts energiereicher Phosphate weniger den Signalweg des apoptotischen Zelltods, sondern vielmehr einen primär nekrotischen Zelltod bewirkt.

Im Vergleich der Untersuchungsgruppen zeigte die histologische Auswertung, dass eine ausgedehnte Nahrungskarenz von 48 Stunden mit einer signifikant vermehrten zytoplasmatischen Vakuolisierung und einer ausgedehnten Endothelablösung einhergegangen ist.

Bei der PAS-Färbung der Hepatozyten waren bei Zellen der Tiere, die freien Nahrungszugang hatten, etwa 70% gefärbt, während bei Lebern von Tieren, die 48 Stunden gefastet hatten, nur knapp unter 30% der Hepatozyten gefärbt waren.

Mittels Caspase-Färbung konnten apoptotische Zellen dargestellt werden. Die Anzahl apoptotischer Zellen bei den Tieren, die 48 Stunden gefastet hatten, war geringer als bei denen, die 12 Stunden gefastet hatten. Insgesamt war jedoch deutlich mehr Caspase exprimiert als bei den Tieren der 0 Stunden Fastengruppe.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse in dem beschriebenen Modell den Schluss zu, dass es für die Transplantatqualität nicht förderlich ist, wenn der Organismus, dem die Leber zur Transplantation entnommen werden soll, vor diesem Eingriff einer längeren Nahrungskarenz unterzogen wird.

Die präoperative Nahrungskarenz stellt einen großen Stressfaktor für das potentiell zu transplantierende Organ dar, die sich zu weiteren Stressoren wie kalter Konservierung und Reperfusion addieren kann. Je weniger Stress aber auf ein Organ einwirkt, desto besser ist die Funktion des transplantierten Organs.

Eine wesentliche Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Glykogen. Bei Organen von Tieren mit freiem Nahrungszugang war wesentlich mehr Glykogen enthalten als bei Organen von Tieren, die 48 Stunden vor der Explantation auf Nahrung verzichten mussten. Hieraus ergibt sich für das oben beschriebene Modell an den Sprague-Dawley-Ratten, dass dem Ernährungsstatus eines Organismus eine wesentliche Rolle bei der erfolgreichen Durchführung von Transplantationen und der späteren Funktionsqualität des transplantierten Organs zukommt.

Eine Nahrungskarenz des Spenderorganismus, dem das Organ explantiert werden soll, ist nach unserer Auffassung schädlich.

Eine adäquate Nahrungszufuhr bis zum Zeitpunkt der Entnahme des Organs ist empfehlenswert und sichert unter anderem den Transplantationserfolg.

2. Summary

2.1. Effect of nutritional status on hepatic preservation and reperfusion injury

The transplantation of the liver becomes increasingly more important as a possibility to cure end-stage-liver-disease in the 21st century. But the problem is that there is a decreasing number of donors in comparison to an increasing number of livers needed. We also have to use all available organs including such, which cause a major, life-threatening condition for the patient by early graft failure or severe dysfunction. So for a long time it has been the aim of many work-groups to assess the feasibility of improving the quality of transplanted organs. In our study we tried to find out if starvation could be a factor which influences the liver function after explantation, cold storage and reperfusion. Therefore we separated twenty-four male Sprague-Dawley rats into three groups consisting of eight animals. The first group had free access to food until the operation started. The second and third group were starved twelve and fortyeight-hours respectively, before the operation.

After explantation, each animal's liver was stored for twenty-four hours in a 4°C cold Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK)-solution, followed by a two hour reperfusion with 37°C warm Krebs-Henseleit bicarbonate puffer in an isolated liver perfusion system. During this time we studied apoptosis and parenchymal damage by using fluorescence microscopy and histological analysis. Bile flow, oxygen consumption, efflux of potassium, and enzyme release served as indicators of overall graft quality. After two hours of reperfusion we could see that the best livers came from rats that had free access to food until operation. Animals that were starved twelve hours before the operation had poorer but not significantly worse results. This was in contrast to the forty-eight hour group. The damage to these organs was significant and severe.

This could be confirmed by the bile flow, because absolute production of bile was higher in test subjects with free food access. When considering the weight of the liver, the situation changes a bit because the lighter livers of the starved animals produced less bile so that the results seemed better. But these results were not as good as those of the 0h group.

Evaluating the fluorescence microscopy, the forty-eight hour group showed the lowest rate of apoptosis. We think the reason for this lies in the fact that cells from the forty-eight hour livers were very low on energy, resulting in their inability to manage the powerful apoptosis process. The resulting liver-enzyme-activity of the efflux was so high that many cells turned into necrosis. This explains the low rate of apoptosis. This could be confirmed by histology. The parenchymal cell damage was assessed using different histological procedures, but in all procedures the group with free access to food showed little damage to the parenchymal cell. In great contrast, the animals starved forty-eight hours before the operation displayed enormous cell damage.

In conclusion, our model shows that starvation is not very useful in improving the quality of an organ prior to its use in the transplantation process. What it clearly shows is that all livers taken from Sprague-Dawley rats that were starved twelve or forty-eight hours before the explantation had bad metabolic parameters and that the amount of necrotic injury was very high.

An important factor seems to be the glycogen. We mentioned that the livers of animals with free food access were full of glycogen in contrast to the livers of starved animals. The nutritional status of an organism is very important and it appears early graft failure or severe liver dysfunction could possibly be reduced if the donor organism is in good nutritional condition.

3. Einleitung

3.1. Lebertransplantation

Die Leber ist ein von Natur aus regenerationsfähiges Organ. Durch Erkrankungen wie Hepatitis oder sklerosierende Cholangitis, durch fehlerhafte Stoffwechselprozesse im menschlichen Körper, wie Hyperlipidämie oder Diabetes mellitus, oder auch durch chronischen Alkoholabusus kann es zu Funktionseinschränkungen bis hin zum völligen Funktionsverlust des Leberparenchyms kommen. Neben der Entzündung der Leber und ihrer Fibrosierung, bei der das Lebergewebe irreversibel zerstört wird, stellt die Steatose der Leber eine weit verbreitete Zivilisationskrankheit dar (ALPERS et al., 1993). Dabei kommt es zu einer intrazellulären Ansammlung von Fett in zytoplasmatischen Vakuolen (BELLENTANI et al., 1994). Im Gegensatz zur Fibrose der Leber ist die Steatose eine reversible Erkrankung (ALPERS et al., 1993). Allen Zuständen gemein ist, dass die Leber ihrer Entgiftungsfunktion für den menschlichen Organismus nicht mehr adäquat nachkommen kann, und es zu einer Ansammlung von zu verstoffwechselnden, meist toxischen, Metaboliten im Körper kommen kann. Der Endzustand bei irreversibler beziehungsweise zunehmender Fibrosierung der Leber ist der Funktionsverlust des Organs und die daraus resultierende Vergiftung des menschlichen Organismus.

Die Lebertransplantation ist heute eine wirksame Möglichkeit, den betroffenen Patienten rechtzeitig zu helfen (KRAMER 2004). Um die Wahrscheinlichkeit einer Transplantatabstoßung zu minimieren, sollten zwischen Spender und Empfänger möglichst wenig immunologische Inkompatibilitäten bestehen. In Frage kommen allogene Transplantate von hirntoten Spendern oder von lebenden Spendern, denen ein Teil der Leber explantiert werden kann. Nach der Transplantation ist eine konsequente Immunsuppression zur Vermeidung der immunologischen Abstoßung notwendig.

Seit der ersten erfolgreichen Lebertransplantation 1967 haben sich in Europa 118 Transplantationszentren entwickelt (KOLHAW et al., 2000; SETTMACHER et al., 2004). Allein in Deutschland wurden im Jahre 2001 757 Lebertransplantationen durchgeführt (Wolff et al. 2003). In den Vereinigten Staaten wurden über den Zeitraum von 1999 bis 2001 sogar 4500 Lebertransplantationen vorgenommen. Hierbei konnten 1-Jahres Überlebensraten von 90 % (KEEFFE et al., 2001) und 5-Jahres Überlebensraten von 70 % erzielt werden (Sterling et al., 2001). Diese Fortschritte in der Transplantationsmedizin haben dazu geführt, dass sich immer mehr Menschen, die an einer schweren Lebererkrankung leiden, einer Transplantation unterziehen wollen. In den USA kam es nach einem exponentiellen Anstieg der Transplantationen zu keiner weiteren Zunahme der Transplantationszahlen, da nicht mehr genügend Organe zur Verfügung stehen (ADAM et al., 2003). Im November 2000 standen in den USA mehr als 16000 Patienten auf der Warteliste (KEEFFE 2001), denen gegenüber nur etwa 4000 Spenderorgane standen (KEEFFE 2000). In Deutschland wird ebenfalls von einer Explosion der Anzahl der Wartenden und der Wartezeit gesprochen. Dieses große Missverhältnis führt dazu, dass nahezu 20 % der Patienten auf der Warteliste sterben, bevor für sie ein Spenderorgan gefunden werden kann (NASHAN et al., 2002). Es ist zu erwarten, dass durch großzügige Indikationsstellungen die Anzahl der potentiellen Empfänger steigen wird, die Anzahl verfügbarer Spenderorgane jedoch gleich bleibt (FEVERY 1998). Ein Beispiel hierfür sind maligne Tumore der Leber, die durch Chemotherapie oder andere Verfahren soweit therapiert werden können, dass auch sie eine Indikation zur Transplantation darstellen (ROSEN et al., 1996).

Um die aufgezeigten Missstände zu beseitigen, gibt es verschiedene Ansätze. Es wird zum Einen versucht, den Organpool zu vergrößern, indem man einen Teil der von toten Spendern zur Verfügung stehenden Lebern teilt und sie verschiedenen Patienten implantiert. Eine andere Möglichkeit stellt die Lebendspenderlebertransplantation dar (NASHAN et al., 2002). Um die Anzahl der Transplantationen weiter zu erhöhen, spielt die Nutzung von Organen, die primär als gering geeignet oder gar ungeeignet eingestuft worden sind (TROTTER 2000), eine zunehmende Rolle. Ziel aller Bemühungen ist es, postoperativ eine uneingeschränkte Funktion des Transplantats zu erreichen und den Ischämie-Reperfusionsschaden so gering wie möglich zu halten. Dies gelingt nicht immer (BUSUTTIL et al., 2003). Untersuchungen in den Vereinigten Staaten haben ergeben, dass 6 % der transplantierten Organe eine so genannte „primary nonfunction“ zeigen. Weiter wurde festgestellt, dass in bis zu 15% der Lebertransplantationen die Organe initial nach Reperfusion nicht adaequat funktionieren.

Ferner wiesen entsprechende Patienten in den ersten 3 Monaten nach Transplantation ein erhöhtes Abstoßungsrisiko auf (STRASBERG et al., 1996). Die Konsequenz der Transplantatabstoßung ist die Retransplantation, und im schlimmsten Fall der Tod. Funktionsversagen oder Funktionseinschränkungen können verschiedene Ursachen haben. So sind die Lebern vieler Spender durch eine moderate Steatose bereits vorgeschädigt. Auch das Alter des Spenders ist entscheidend für die Qualität des gespendeten Organs. Von nicht unerheblicher Bedeutung für eine erfolgreiche Transplantation ist auch eine möglichst kurze Dauer der kalten Konservierung, die 12 Stunden nicht überschreiten sollte. Gleiches gilt für die Dauer der warmen Ischämie (PLOEG et al., 1993; STRASBERG et al., 1996). Ferner werden noch ein Körpergewicht des Spenders von über 100 kg sowie eine längere intensivmedizinische Behandlung als negative Prädiktion für die Organqualität diskutiert (MOR et al., 1992). Ebenso spielt eine verspätete Rearterialisierung nach Reperfusion der Leber während der Operation eine wichtige Rolle für eventuelle Transplantatdysfunktionen (PUHL et al., 2004). Wenn es gelingt, die aufgezeigten Risikofaktoren so gering wie möglich zu halten, lässt sich das Problem einer „primary nonfunction“ oder einer eingeschränkten Funktion nach Reperfusion zwar reduzieren, allerdings nicht vollständig vermeiden.

3.2. Reperfusionsschaden nach kalter Konservierung

Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt angesprochen, stellt der Reperfusionsschaden ein großes Problem in der Transplantationsmedizin dar. Gelingt es bei gesunden Organen noch diesen Schaden gering zu halten und gegebenenfalls zu kompensieren, so ist ein Reperfusionsschaden bei geteilten oder minderwertigen, aber auch bei größenreduzierten Lebendspenderorganen, häufig die Ursache für eine Funktionseinschränkung beziehungsweise für einen vollständigen Funktionsverlust der Leber nach der Transplantation. Es gibt drei wesentliche Faktoren, von denen die Qualität einer transplantierten Leber abhängt. Erster Faktor ist der Zustand der Parenchymzellen. Dieser schließt den entsprechenden Ernährungszustand mit ein. Zweiter Faktor ist die Beeinträchtigung des Organs durch Traumata und Ischämie während der Explantation und der Konservierung. Um die zur Transplantation des Organs zur Verfügung stehende Zeit möglichst zu verlängern, werden die Lebern in einer Konservierungslösung gelagert, welche die Zellen während der Ischämie vor Schädigungen durch Autolyse bewahren soll. Die ischämische Zelle kann keinen aeroben Stoffwechsel betreiben. Auf Grund des anaeroben Stoffwechsels wird sie azidotisch und verfügt nicht über eine ausreichende Energieversorgung, um die Homöostase aufrechtzuerhalten (DREWS AND SPIEGEL, 2000). Die Zellen schwellen und gehen entweder in Apoptose oder Nekrose (LIU et al., 1994). Der dritte Faktor, der schlussendlich auch die Qualität des Transplantats wesentlich beeinflusst ist die Reperfusion. Durch das plötzliche Sauerstoffangebot während der Wiederperfusion können sich in den azidotischen Zellen toxische Substanzen wie zum Beispiel Sauerstoffradikale bilden, die eine vermehrte Schädigung bewirken (DREWS AND SPIEGEL, 2000) und den Zelltod sowohl von Sinusendothelzellen als auch von Hepatozyten bewirken (HUET et al., 2004). Sowohl Ischämie als auch Reperfusion bedeuten enormen Stress für die Zelle. Es muß das Risiko der „primary non function“ beziehungsweise der eingeschränkten Funktion der transplantierten Lebern so gering wie möglich gehalten werden. Dies kann durch adaequate Modulierung der oben genannten Faktoren geschehen. Dann ist der Leberzellschaden gering und die Transplantatqualität angemessen.

Sichergestellt werden kann dies unter anderem durch die Reduktion der Ischämiedauer. Die Zeit der kalten Konservierung sollte nicht länger als 12 Stunden betragen, in Ausnahmefällen werden allerdings bis zu 30 Stunden toleriert; eine kalte Konservierung von mehr als 30 Stunden bedeutet eine sichere „primary non function“ für die transplantierte Leber (STRASBERG et al., 1996). Andere Autoren sprechen von einem erhöhten Risiko der Funktionseinschränkungen bei Lebern, die länger als 18 Stunden konserviert worden sind (PLOEG et al., 1993). Bei einer Untersuchung von Que et al. zeigte sich sogar, dass bereits Konservierungszeiten über 8 Stunden kritisch für die Leberfunktion nach Transplantation werden können (QUE et al., 2004). Vergleicht man daher Organe in ihren Funktionen, die 12 Stunden, 24 Stunden und 48 Stunden konserviert worden sind, so zeigt sich deutlich, dass die Lebern mit geringen Konservierungszeiten die beste Funktion und den geringsten Schaden zeigen (BOUDJEMA et al., 1990; EL-GIBALY et al., 2004).

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Qualität des Transplantats ist die Wahl der Konservierungslösung. Die Histidine-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK) -Lösung wird heute standardmäßig für die kalte Konservierung von Spenderlebern benutzt (PICHLMAYR et al., 1988). Zur Wahl steht neben HTK-Lösung die 1979 als kardioplegische Lösung im Rahmen von Operationen am offenen Herzen eingeführte University of Wisconsin Lösung (UW-Lösung) (BRETSCHEIDER et al., 1988). Diese gilt als besonders geeignet für die längere Konservierung von Leber und Pankreas (BELZER et al., 1988). Vergleichende Untersuchungen dieser Lösungen und einer weiteren komplexen Mehrkomponentenlösung, der „Celsior“ Lösung, haben gezeigt, dass Organe, die bis zu 16 Stunden in „Celsior“- oder UW-Lösung konserviert worden sind, eine bessere Funktion und einen geringeren Schaden aufweisen als solche, die in HTK-Lösung konserviert worden sind.

Ab 24 Stunden kalter Ischämie zeigt allein die Konservierung mit UW-Lösung akzeptable Ergebnisse hinsichtlich der Funktion und Morphologie der Lebern. Wichtig dabei ist aber, dass bei keinem der in den drei verschiedenen Lösungen konservierten Organe Unterschiede der Zellvitalität, wie Apoptose und Nekrose, zu verzeichnen waren (STRAATSBURG et al., 2002; PALOMBO et al., 1989). Man sieht also, dass die Einflussfaktoren, die auf ein Organ während und nach einer Transplantation einwirken, sehr vielschichtig und im Hinblick auf das Transplantationsergebnis von entscheidender Bedeutung sind.

3.3. Beeinflussung des Konservierungs- und Reperfusionsschadens durch Nahrungskarenz

Ziel aller Bemühungen muß also sein, die Transplantatqualität zu verbessern, beziehungsweise Faktoren zu eliminieren, die die Qualität des Organs substantiell beeinträchtigen. Die notwendige Konservierungszeit stellt dabei einen nur schwer zu kalkulierenden Faktor dar, da sie sich im Rahmen des komplexen Vorgangs der Organexplantation und Transplantation nur schwer vorbestimmen läßt. Man kann lediglich bemüht sein, die Ischämiezeit so kurz wie möglich zu halten. Bei der Wahl der Konservierungslösung hingegen hat man die Möglichkeit, diejenige Lösung zu wählen, die für die Transplantation und die Situation am besten geeignet erscheint. Weiterhin kann durch die Anwendung von Antioxidantien, Prostaglandinen oder anderen geeigneten Pharmaka der Reperfusionsschaden reduziert werden.

Der Funktionszustand der Zellen des Transplantats kann ebenfalls effizient beeinflusst werden. Ziel sollte dabei sein, so auf die Zellen einzuwirken, dass sie den durch Konservierung und Reperfusion verursachten Stress möglichst unbeschadet überstehen. So gab es zum Beispiel Versuche, die Leberzellen durch eine hypertone Salzlösung zu präkonditionieren, um die sich eventuell aus einer Ischämie/Reperfusion ergebende Entzündungsreaktion durch Unterdrückung von Tumornekrosefaktor alpha zu reduzieren (OREOPOULOS et al., 2004). Des weiteren zeigen jüngste Ergebnisse, dass durch ischämische Präkonditionierung eine Verbesserung der Transplantatqualität erzielt werden kann (SELZNER et al., 2003).

Ein weiterer Ansatz zur Beeinflussung der Leberzellfunktion ist die Regulierung der Nahrungszufuhr vor Explantation der Leber. Es stellt sich dabei die Frage, ob man die Zellen durch Fasten derart konditionieren kann, dass die „primary non function“ beziehungsweise die initiale Funktionseinschränkung nach Konservierung und Reperfusion verringert werden kann. Auch Nahrungskarenz stellt für den Organismus einen Stressfaktor dar, wobei nicht geklärt ist, ob dieser Stressfaktor, die Zellen in einen Zustand versetzt, in dem sie Ischämie, Konservierung und Reperfusion besser tolerieren. So zeigte sich zum Beispiel, dass durch Fasten Kupfferzellen der Leber inaktiviert werden können.

Diese Zellen des Phagozytose-Systems spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Entzündungsreaktionen und als Mediatoren des Leberzellschadens. Ferner konnte eine verminderte Produktion von Tumornekrosefaktor (TNF) – alpha nach Reperfusion

nachgewiesen werden. Allerdings enthalten Lebern nach ausgedehnter Nahrungskarenz weniger Glykogen, was für die Produktion von Adenosin Triphosphat (ATP), dem Energielieferanten der Zelle, von essentieller Bedeutung ist (SANKARY et al., 1995; SHIINO et al., 1998). Einschlägige Untersuchungen haben gezeigt, dass der Glykogengehalt der Zellen von erheblicher Bedeutung für eine erfolgreiche Transplantation ist. Lebern mit hohem Glykogengehalt hatten dabei längere Überlebenszeiten, als solche mit niedrigerem Glykogengehalt (SADAMORI et al., 1995). Im Gegensatz dazu sind in den Zellen nach Nahrungskarenz weniger Antioxidantien wie Vitamin C, alpha-Tocopherol und Glutathion vorhanden. Dies reduziert die Toleranz gegenüber oxidativem Stress, wie er bei Ischämie, Konservierung und Reperfusion vorkommt (LIU et al., 1994; GRATTAGLIANO et al., 2000). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien durch Fasten in ihrer Ultrastruktur beschädigt werden und die Serumtransaminasen nach Reperfusion stark ansteigen (DOMENICALI et al., 2001). Dagegen konnte jedoch beobachtet werden, dass diejenigen Tiere nach Lebertransplantation die längste Überlebenszeit aufwiesen, deren Leber von einem Spender stammte, der vorher gefastet hatte. Nebenbei wurde festgestellt, dass die gefasteten Lebern weniger Glykogen enthielten, was aber für das Ergebnis der Lebertransplantation bei diesen Arbeitsgruppen als irrelevant betrachtet wurde (SUMIMOTO et al., 1993; SUMIMOTO et al., 1996). Ähnliche Beobachtungen wurden am Beispiel von Fruchtfliegen gemacht. Es zeigte sich, dass solche Fliegen am längsten überleben konnten, die zuvor einer Nahrungskarenz unterzogen wurden (MAIR et al., 2003). Man sieht also, dass es keine einheitliche wissenschaftliche Beurteilung zum Thema Fasten gibt. Es gibt Autoren, die das Fasten befürworten, weil sich in ihren Studien gezeigt hat, dass die Zellen dann unter Ischämie, Konservierung und Reperfusion weniger Schaden nehmen. Es gibt indes auch Gruppen, in deren Studien sich das Gegenteil gezeigt hat (SKULLMAN et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit sollen daher Stoffwechselfparameter der Leber, wie Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxidproduktion, Elektrolyt-Stoffwechsel, portalvenöser Widerstand, Galleproduktion, apoptotischer und nekrotischer Zelltod und histomorphologische Beeinträchtigungen wie Vakuolisierung und Glykogengehalt der Zellen nach Ischämie, Konservierung und Reperfusion im „In vitro-Modell“ der isolierten Leberperfusion untersucht werden.

4. Fragestellung

Ziel der Untersuchung am Modell der 2-stündigen in vitro Reperfusion der Rattenleber nach vorhergehender 24-stündiger kalter Konservierung war die Antwort auf folgende Fragestellung: Kann durch 12-stündige, beziehungsweise 48-stündige Nahrungskarenz vor Explantation der Konservierungs- oder Reperfusionsschaden reduziert werden.

Zu diesem Zweck wurden näher betrachtet:

1. Metabolismus der Leber während der 2-stündigen Reperfusion durch Ermittlung des K⁺-Efflux, der CO₂ Produktion, des pH-Wertes, des Sauerstoffverbrauchs und der Sauerstoffaufnahme,
2. Funktion der Leber während der 2-stündigen Reperfusion durch Beurteilung der Galleproduktion,
3. Apoptose als Ausmaß des Zellschadens vor und nach der 2-stündigen Reperfusion durch Fluoreszenzmikroskopie und weitere histologische Verfahren,
4. Nekrosen als Ausmaß des Zellschadens vor und nach der 2-stündigen Reperfusion durch die laborchemische Quantifizierung der Leberenzyme und durch die Sichtbarmachung des Ausmaß des Zellschadens beziehungsweise Zelltods durch histologische Verfahren.

5. Material und Methode

5.1. Tiermodell

5.1.1. Tiere

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 200 und 330g genutzt. Die Tiere wurden in einzelnen Käfigen in der UTH des Instituts für klinisch experimentelle Chirurgie bei 22 bis 24°C unter 12-stündig wechselndem hell-dunkel Rhythmus gehalten. Alle Tiere wurden mit Wasser ad libitum versorgt. Je nach Gruppe wurden die Tiere mit Standard Labornahrung bis zur Explantation, beziehungsweise bis 12 oder 48 Stunden vor diesem Eingriff ernährt. Die Experimente wurden nach Genehmigung der Organentnahme durch die zuständige Behörde entsprechend der Richtlinien der deutschen Tierschutzgesetzgebung durchgeführt.

5.1.2. Explantation der Leber und ihre kalte Konservierung

Nachdem die Tiere mit Pentobarbital (50 mg/kg i.p.) narkotisiert worden waren, wurden sie in Rückenlage unter einem chirurgischen Stereomikroskop (40121; Zeiss, Jena; Deutschland) gelagert und mit Pflasterstreifen an den vier Extremitäten fixiert (Abb. 1). Zügig wurde dann die Trachea freipräpariert und eine Tracheotomie durchgeführt, um freie Atemwege für die Spontanatmung von Raumluft zu gewährleisten. Als nächstes wurde die linke Arteria carotis aufgesucht und auf einer Strecke von 15 bis 20 mm dargestellt. Nach Setzen eines distalen Gefäßclips wurde sie mit einem Polyethylenkatheter kanüliert (Abb. 2) (Innendurchmesser (ID) von 0,58 mm; Portex, Hythe, UK).

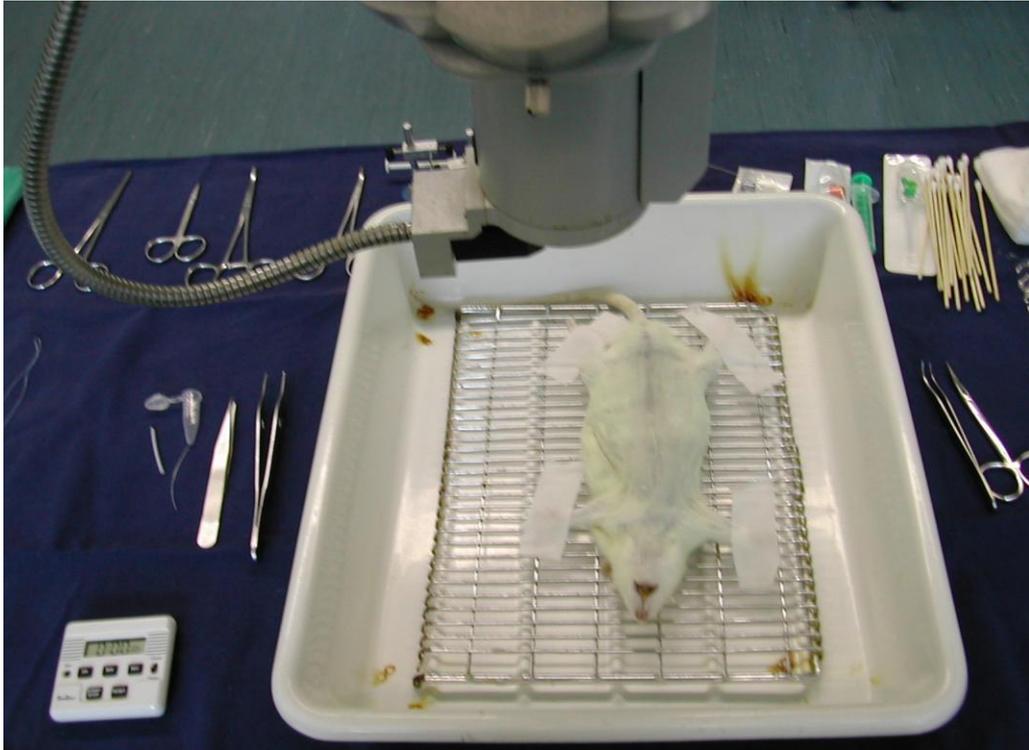


Abb. 1 Lagerung des Tieres zur Organexplantation

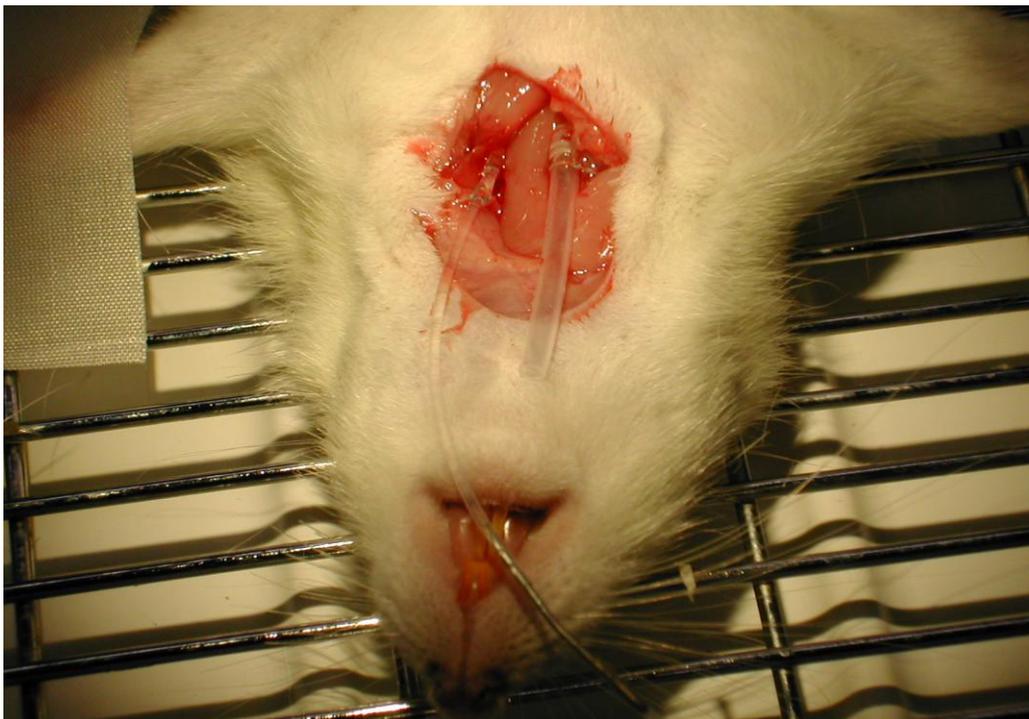


Abb. 2 Tracheotomie und Kanülierung der linken Arteria carotis

Nach Fixierung des Katheters wurde über diesen der Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid injiziert (H33342; 2µmol/kg i.v.; Sigma, Deisenhofen, Germany). Ferner diente der Katheter zur Applikation von 0,9 % isotoner Kochsalzlösung und zur Entnahme von arteriellem Blut. Zunächst wurde eine transverse Laparotomie durchgeführt und der Gallengang dargestellt. Dieser wurde ebenfalls mit einem Polyethylenkatheter kanüliert (ID 0,28mm). Die Galle wurde für 20min in einem vorgewogenen Eppendorf Gefäß gesammelt (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) (Abb. 3).

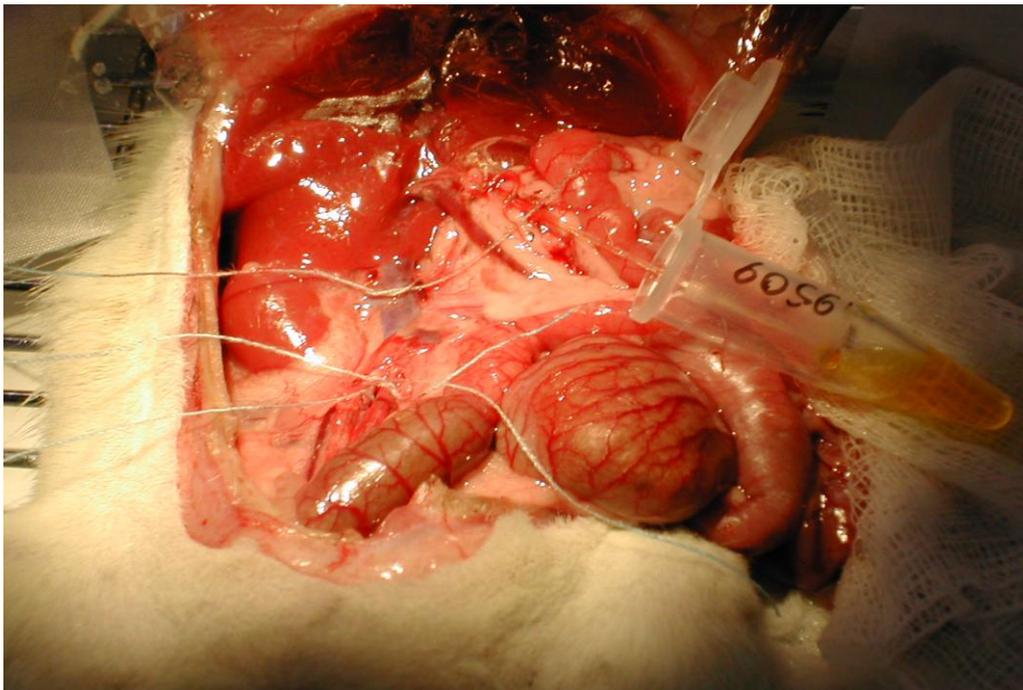


Abb. 3 Transverse Laparotomie und Kanülierung des Gallengangs zur Bestimmung der Galleproduktion

Anschließend wurde die Aorta abdominalis freipräpariert und mit drei Ligaturen angeschlungen. Die suprarenale Vena cava wurde ebenfalls mit einer Ligatur angeschlungen. Nach Eröffnung des gesamten Brustkorbs über das Zwerchfell wurden beide Trunci pulmonales inzidiert. Daraufhin wurde die bereits frei präparierte Aorta abdominalis mit einer 18-G Kanüle (Venflon 2; Ohmeda, Helsingborg, Schweden) kanüliert und das Interstitium und die Leber in situ mit 100 ml einer 4°C kalten Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat (HTK)-Lösung (Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) perfundiert. Die Perfusion erfolgte mit einem Druck von 100 cm Wassersäule über einen Zeitraum von 10 min. Während dieser Zeit wurde die suprahepatische Vena cava inferior mit einem Polyethylenkatheter kanüliert (ID 1,67 mm), dann fixiert und der suprarenale, infrahepatische Teil durch die vorgelegte Ligatur ligiert. Nach Abschluß der Infusion der HTK-Lösung wurde die Vena porta dargestellt, kanüliert (14-G; Venflon 2) und fixiert.

Zum Schluß wurde die Leber zügig explantiert (Abb. 4), gewogen und in einem mit 50 ml 4°C kalter HTK-Lösung gefüllten Plastikgefäß, das in eine mit Eis gefüllte Nierenschale eingebettet wurde, in einen Kühlschrank bei 4°C eingelagert.

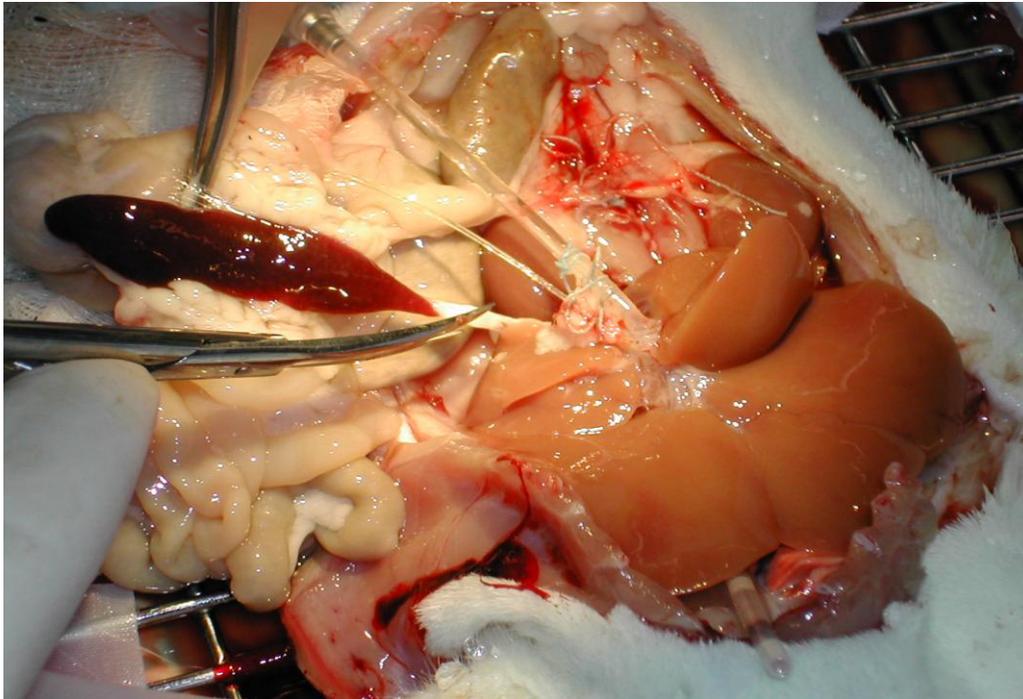


Abb. 4 Vorgang der Explantation der Rattenleber nach Perfusion mit HTK

5.1.3 In vitro Reperfusion

Nachdem die Leber 24h bei 4°C konserviert worden war, wurde sie zur Reperfusion an ein isoliertes Perfusionssystem angeschlossen (Abb. 5-7). Zuerst wurde die Leber mit 40ml einer 24°C warmen Ringer-Laktat Lösung perfundiert, um den Reperfusionsschaden durch zu rasches Erwärmen des Organs zu reduzieren (POST, 1995).

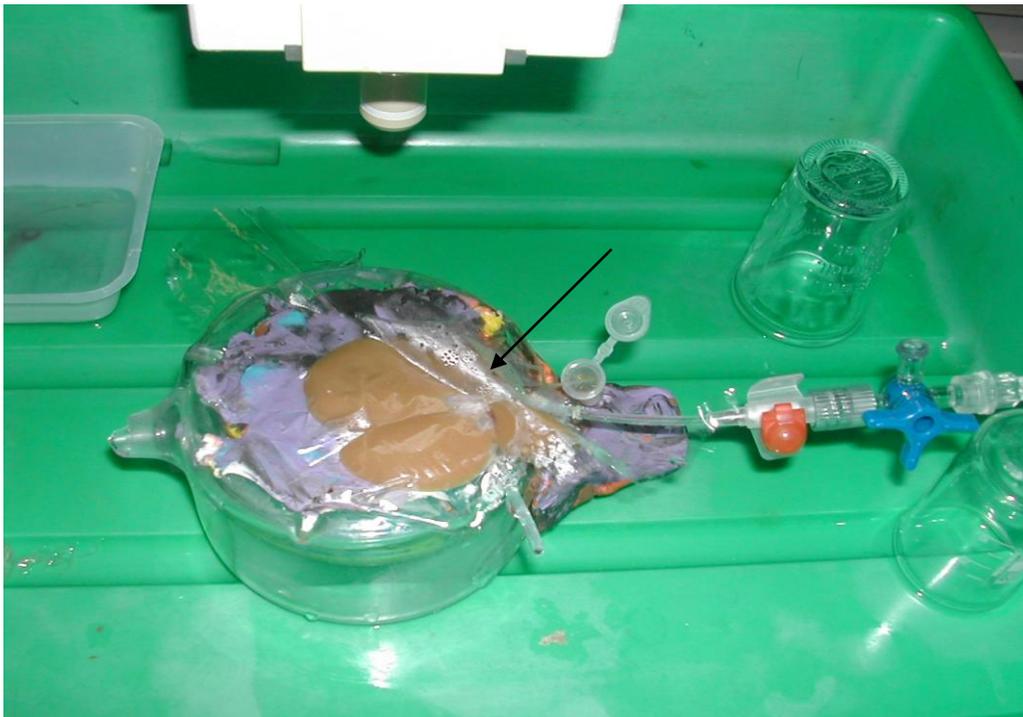


Abb. 5 Explantierte Leber unter dem Auflichtmikroskop mit 14-G Kanüle in der Vena porta als zuführender Schenkel der Perfusionslösung; kanülierter Gallengang (Pfeil) zur Bestimmung der Galleproduktion



Abb. 6 Ex situ Modell der Reperfusion: Auflichtfluoreszenzmikroskop mit Kamera und Videosystem zur Aufzeichnung der auflichtmikroskopischen Bilder; rechts oben im Bild Pumpe mit Wärmetauscher und Luftfalle für die Krebs-Henseleit-Reperfusion

Danach wurde begonnen, die Leber durch die Vena porta mit Krebs-Henseleit-Bikarbonat Puffer (KHB) zu perfundieren, der mit 95 % Sauerstoff und 5 % Kohlendioxyd bei einer Flussrate von annähernd 2 ml/min x g Leber gesättigt worden war. Dabei handelte es sich um ein über die kanülierte Vena cava geöffnetes System.

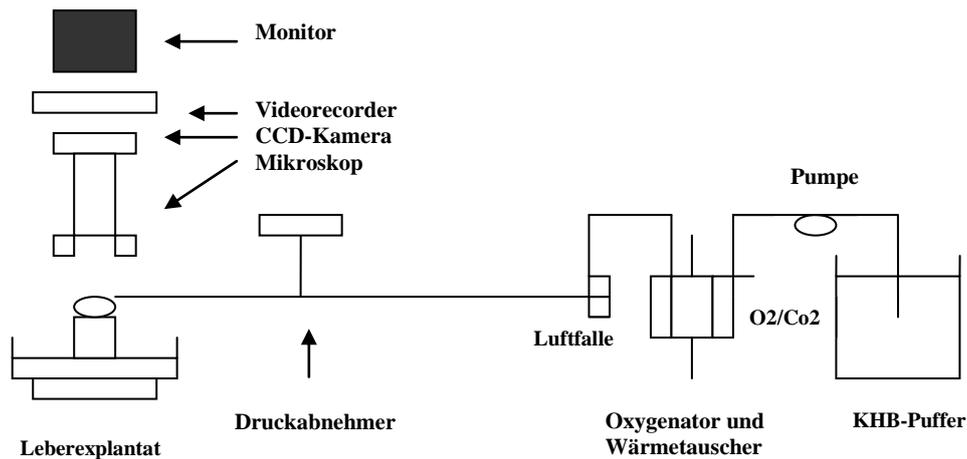


Abb. 7 Schematische Darstellung des *in vitro* Leberreperusionsmodells und der gleichzeitigen Auflichtfluoreszenzmikroskopie

Für die Perfusion wurde eine pulsierende Pumpe benutzt (beta/4; ProMinent, Heidelberg, Deutschland). Der sich in unserem System ausbildende portalvenöse Druck (PVP) wurde kontinuierlich durch einen Druckabnehmer aufgenommen und war über ein zentrales digitales Display abzulesen. (Servomed; Hellige, Freiburg, Deutschland) Aus diesem portalvenösen Druck und der Flussrate wurde dann der portalvenöse Widerstand über $R=P/Q$ (mmHg x min/ml) (HARDISON, 1967) berechnet. Zur Sicherstellung der Temperatur von 37°C unmittelbar prähepatisch wurde hinter die Pumpe ein Wärmetauscher geschaltet, der den KHB-Puffer soweit aufheizte, dass er unmittelbar vor der Leber auf 37°C erwärmt war. Des weiteren enthielt das System eine Luftfalle, die garantierte, dass keine Luftblasen in das System, und insbesondere in die Leber gelangten. Insgesamt wurde die Leber für 120 Minuten reperfundiert.

5.2. Methoden und Techniken

5.2.1. Proben

Über den kanülierten Gallengang wurden während der 120-minütigen Reperfusionzeit im Abstand von 30 Minuten insgesamt vier Proben genommen. Dabei wurde ein Eppendorf Gefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) am Ende der im Gallengang liegenden Kanüle angebracht und so die produzierte Gallenflüssigkeit über 30 Minuten gesammelt. Diese wurde gewogen und die Produktion in Volumen pro Zeiteinheit ($\mu\text{l}/\text{min}$) errechnet. Ferner wurde der so ermittelte Wert auf das Lebergewicht bezogen ($\mu\text{l}/\text{min} \times \text{g Leber}$) (SUMIMOTO *et al.*, 1988). Weitere Proben vom Effluat wurden an der kanülierten Vena cava hinter der Leber zu Beginn der Ringer-Laktat-Perfusion, sowie unmittelbar nach Beginn und dann im Abstand von 30 Minuten während der 120-minütigen KHB-Perfusion entnommen. Aus diesen Effluatproben wurden dann die Aktivitäten der Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (GOT), der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und der Laktat-Dehydrogenase (LDH) spektrophotometrisch bestimmt, um Informationen über die Parenchymzellschädigung zu erhalten. Ferner wurden noch Lebergewebeproben entnommen, um sie einer histologischen Auswertung zuzuführen. Diese wurden sowohl nach 24 Stunden kalter Konservierung und auch nach Abschluss der 2-stündigen Reperfusion genommen und in Formalin asserviert.

5.2.2. Parameter zur Einschätzung der Leberfunktion

Um die exkretorische Funktion der Leber zu beurteilen, diente zum einen die oben beschriebene Bestimmung der Galleproduktion, zum anderen wurden Blutgasanalysen aus prä- und posthepatischen Proben durchgeführt (Blutgasanalysegerät (Chiron)). Die Entnahmen erfolgten nach 5, 30, 60, 90 und 120 min Reperfusion. In diesen Proben wurden die Elektrolyte, der pO_2 , der pCO_2 und der pH-Wert bestimmt. Der Sauerstoffverbrauch der Leber wurde anschließend wie folgt berechnet:

$C = \text{pO}_{2\text{prähep}} - \text{pO}_{2\text{posthep}} \times 0,00136 \times \text{Flussrate} (\mu\text{mol}/\text{min} \times \text{g Leber})$ (SUEHIRO *et al.*, 1994). Letztlich wurde die sogenannte Sauerstoffaufnahme bestimmt:

$\text{O}_2\text{-uptake} = ((\text{pO}_{2\text{prähep}} - \text{pO}_{2\text{posthep}}) : \text{pO}_{2\text{prähep}}) \times 100 (\text{in } \%)$.

5.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

5.2.3.1. Auflichtmikroskopie der Leber

Mit Hilfe eines modifizierten Auflichtfluoreszenzmikroskops (Axiotech; Zeiss), das mit einer 100 W Quecksilber Lampe ausgestattet und mit einem UV-Filter-System verbunden war, wurden die mikroskopischen Aufnahmen der Leberoberfläche während der Perfusion durchgeführt. Durch ein Wasserimmersionsobjektiv (W63x/0.90; Zeiss) und ultraviolettes Auflicht (Anregung/Wellenlänge (330-380/>415nm Einwirkungswellenlänge)), das die Bisbenzimid markierten Hepatozyten sichtbar machte (MENGER UND VOLLMAR, 2000), konnte die hepatozelluläre Apoptose on-line quantitativ erfasst werden. Die Bilder wurden von einer CCD Video Kamera (FK 6990; COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA) aufgenommen, auf ein Monitorsystem transferiert (PVM-2130 QM; Sony, München, Deutschland) und gleichzeitig von einem Videorecorder auf Videokassette aufgenommen (S-VHS Panasonic AG 7350; Matasushita, Tokyo, Japan), um sie später offline auszuwerten.

5.2.3.2. Quantitative Videoanalyse

Ausgewertet wurden jeweils 10 Felder pro Leber zu verschiedenen Zeitpunkten. Diese waren zu Beginn der Konservierung, zum Ende der 24-stündigen Konservierung, sowie nach 1 und 2 Stunden Reperfusion. Mit Hilfe eines computerunterstützten Bild-Analyse-Systems (CapImage; Zeintl, Heidelberg, Deutschland) wurden die Zellen gezählt, die Apoptose-assoziierte Kernkondensierung, Fragmentierung und / oder zunehmende Margination des Kernchromatins zeigten (Abb. 8). So ließ sich die Anzahl der apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld ermitteln. Diese wurde dann in das Verhältnis zu allen sichtbaren Zellen pro Gesichtsfeld gesetzt, so dass sich die Apoptoserate in Prozent bestimmen ließ (MENGER UND VOLLMAR, 2000).

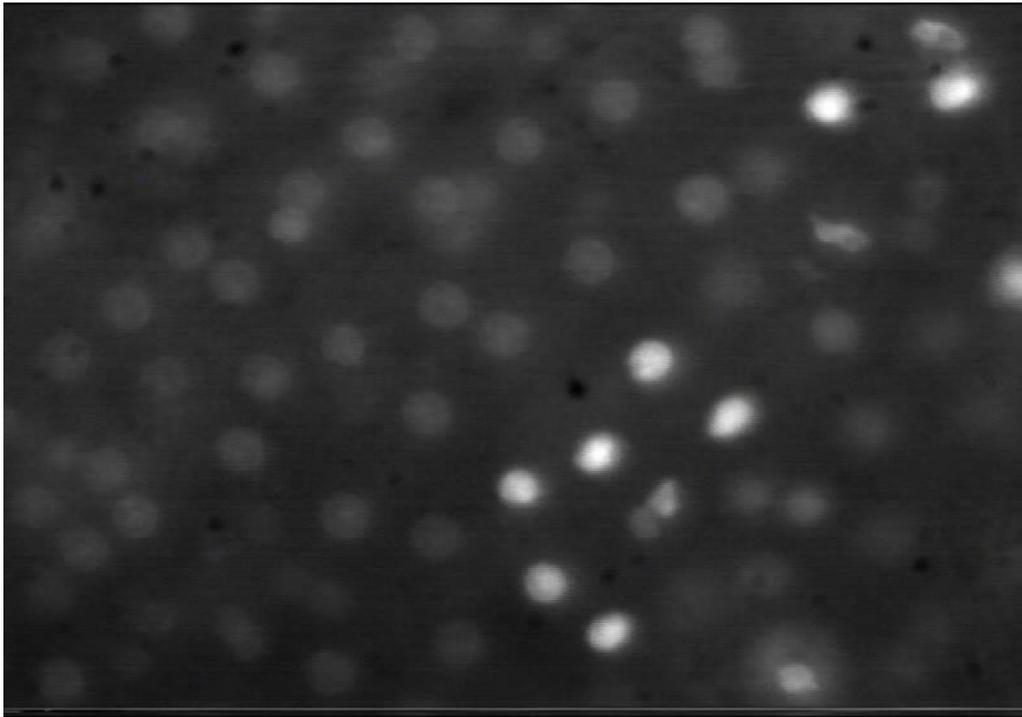


Abb. 8 Auflichtfluoreszenzmikroskopische Darstellung von Bisbenzimid-markierten hepatozellulären Kernen während der Reperfusion, die das klassische Bild der hepatozellulären Apoptose zeigen: Kondensierung, Fragmentierung und Margination des Chromatins (Original Vergrößerung x 800).

5.2.4. Routinehistologie und Immunhistochemie

Vor Beginn der Reperfusion, also unmittelbar nach der 24-stündigen kalten Konservierung, und am Ende der 120-minütigen Reperfusion, wurden jeweils Gewebeproben der Leber entnommen. Das Gewebe wurde 2-3 Tage in 4% Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Diese Paraffin Gewebelöcke wurden mit einer Dicke von 5µm geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und mit Hematoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Mit dieser histologischen Methode konnten die Vakuolisierung der Hepatozyten sowie die Endothelzellablösungen in Venolen erfasst werden. Zunächst wurde die Vakuolisierung der Hepatozyten beurteilt. Die Vakuolisierung ist ein Indikator der morphologischen Desintegration und repräsentiert eine typische hepatozelluläre Schädigung nach prolongierter Ischämie. Betrachtet wurden von allen Lebern jeweils die histologischen Proben, die vor Beginn der Reperfusion und nach ihrem Ende genommen worden waren. Dabei wurden 20 Gesichtsfelder pro Schnitt unter dem Mikroskop analysiert (Olympus Mikroskop; BX60F; 40x Objektiv). Nach eingehender Beurteilung wurde jedem Gesichtsfeld je nach Grad der Vakuolisierung der Score 0 (keine Vakuolen), 1 (bis zu 10 Prozent der Hepatozyten zeigen Vakuolen), 2 (zwischen 10 und 40 Prozent der Hepatozyten zeigen Vakuolen), 3 (40 und 70

Prozent der Hepatozyten zeigen Vakuolen) und 4 (über 70 Prozent der Hepatozyten zeigen Vakuolen) zugeordnet (CALABRESE *et al.*, 1997 (Abb. 9 und Abb. 10).

Weiter wurden die Endothelzellablösungen beurteilt. Dazu wurde die Anzahl der gesamten sichtbaren Venolen ermittelt und danach die Anzahl der Venolen, die eine Beschädigung des Endothels aufwiesen. So konnte eine Aussage gemacht werden, wieviel Prozent der Venolen eine endotheliale Beschädigung beziehungsweise Endothelzellablösung aufweisen. Auch hier wurden die vor und nach der Reperfusion gewonnenen Gewebeproben unabhängig voneinander beurteilt (Abb. 11).

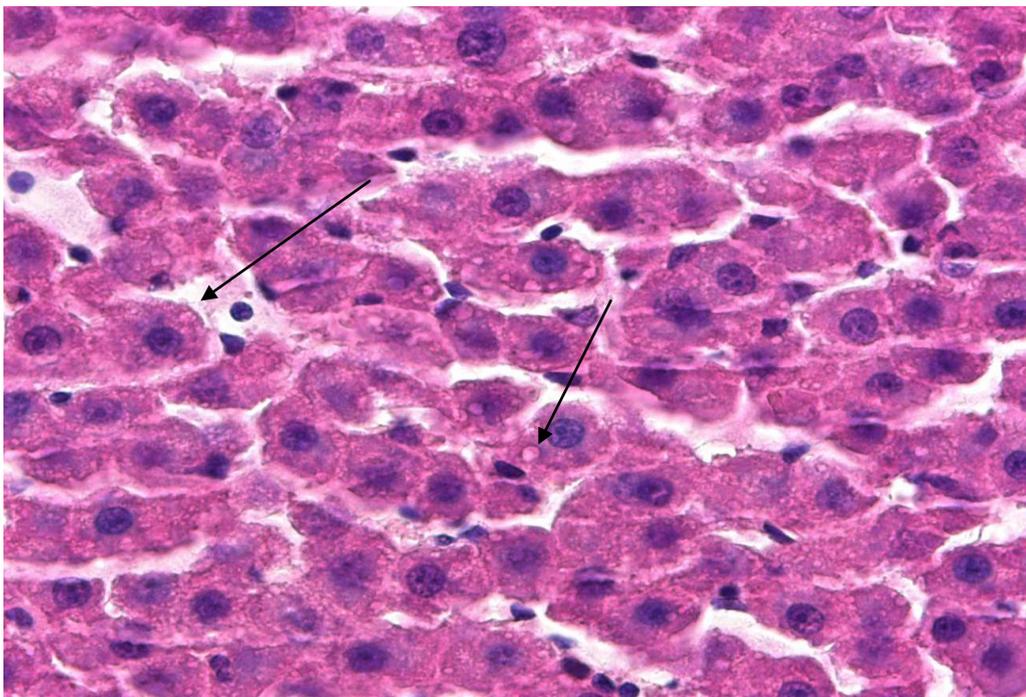


Abb. 9 HE-Färbung eines Lebergewebeschnitts, der den Vakuolisierungsgrad 1 (bis 10%) der Hepatozyten direkt nach der kalten Konservierung zeigt. Die Gewebeprobe entstammt einem Versuchstier ohne Nahrungskarenz nach 24 Stunden Konservierung und 2 Stunden Reperfusion (Originalvergrößerung x200)

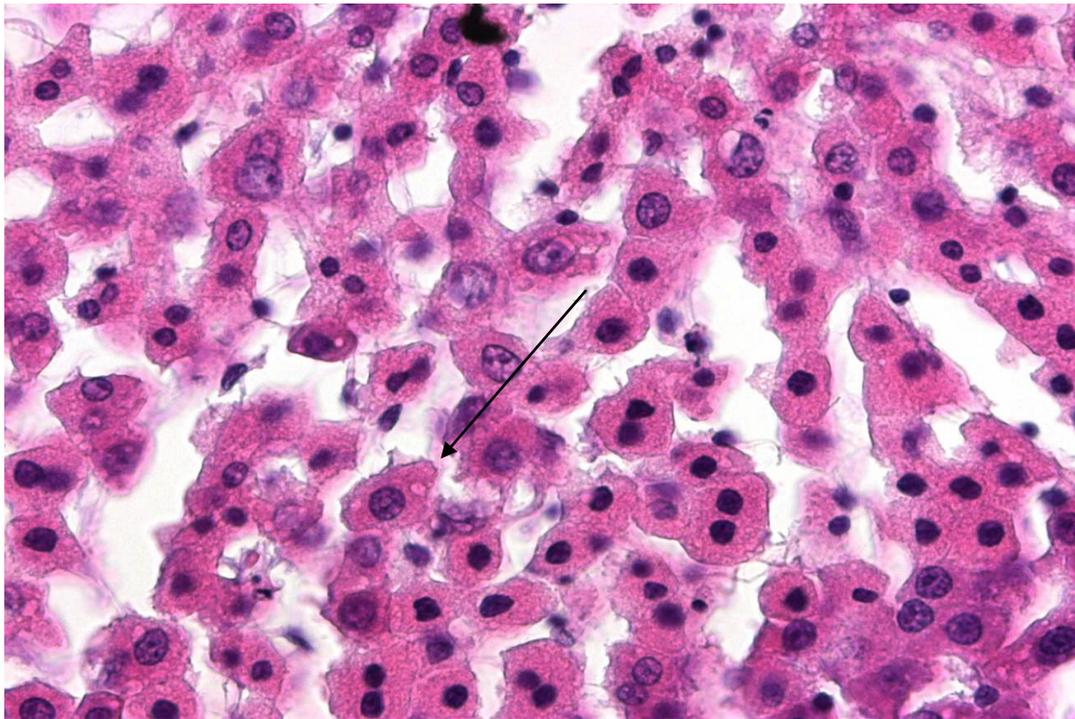


Abb. 10 HE-Färbung eines Lebergewebeschnitts, der den Vakuolisierungsgrad 4 (über 70%) der Hepatozyten direkt nach der kalten Konservierung zeigt. Die Gewebeprobe entstammt einem Versuchstier nach 48-stündiger Nahrungskarenz, 24 Stunden Konservierung und 2 Stunden Reperfusion (Originalvergrößerung x200)

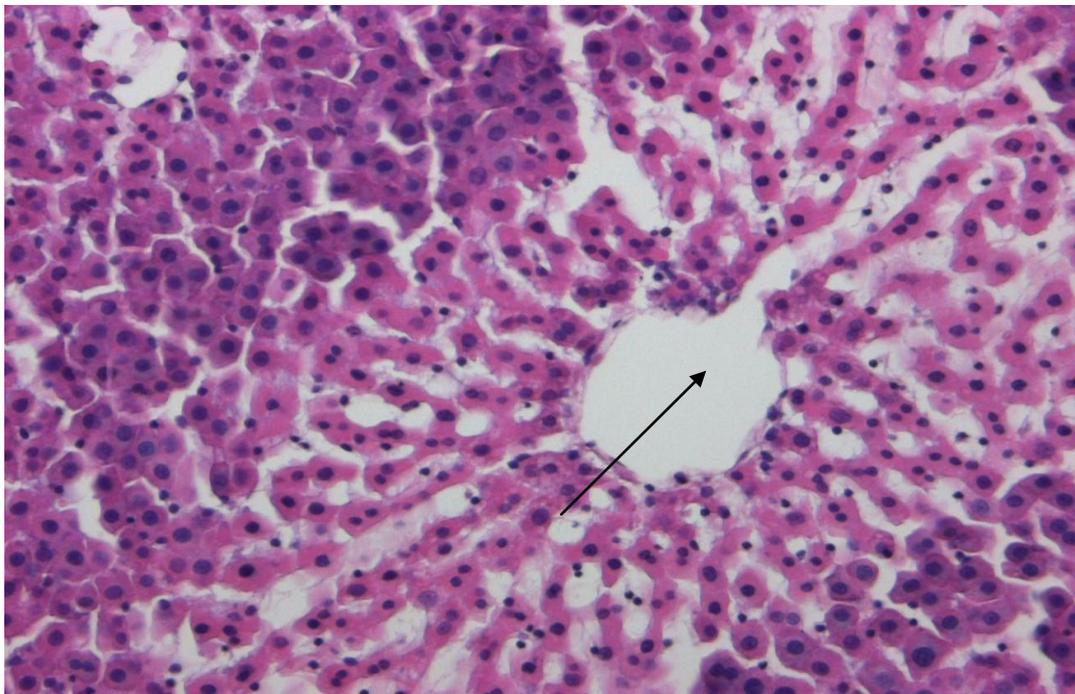


Abb.13 9 HE-Färbung eines Lebergewebeschnitts, der die Endothelablösung der Venolen nach der Reperfusion zeigt. Die Gewebeprobe entstammt einem Versuchstier nach 12-stündiger Nahrungskarenz, 24 Stunden Konservierung und 2 Stunden Reperfusion (Originalvergrößerung x100)

Um einen Eindruck zu gewinnen, wieviel Glykogen die Hepatozyten der Lebern enthalten, wurden Lebergewebeschnitte mit der periodic acid-Schiff Methode (PAS) gefärbt. Bei dieser Färbemethode wird das Glykogen violett angefärbt, so dass Hepatozyten, die Glykogen enthalten dunkel violett imponieren. Auch hier wurden 20 Felder pro Gewebeschnitt beurteilt, allerdings nur von Schnitten, die aus Gewebeproben stammten, die nach der kalten Konservierung und vor Beginn der Reperfusion gewonnen worden waren. Wenn weniger als 30% der Hepatozyten in einem Gesichtsfeld violett gefärbt waren, wurde der Score 1 zugeordnet. Waren zwischen 30-70% der Hepatozyten gefärbt, wurde der Score 2, waren mehr als 70% der Hepatozyten pro Gesichtsfeld gefärbt, wurde der Score 3 zugeordnet (CALABRESE *et al.* 1997) (Abb. 12).

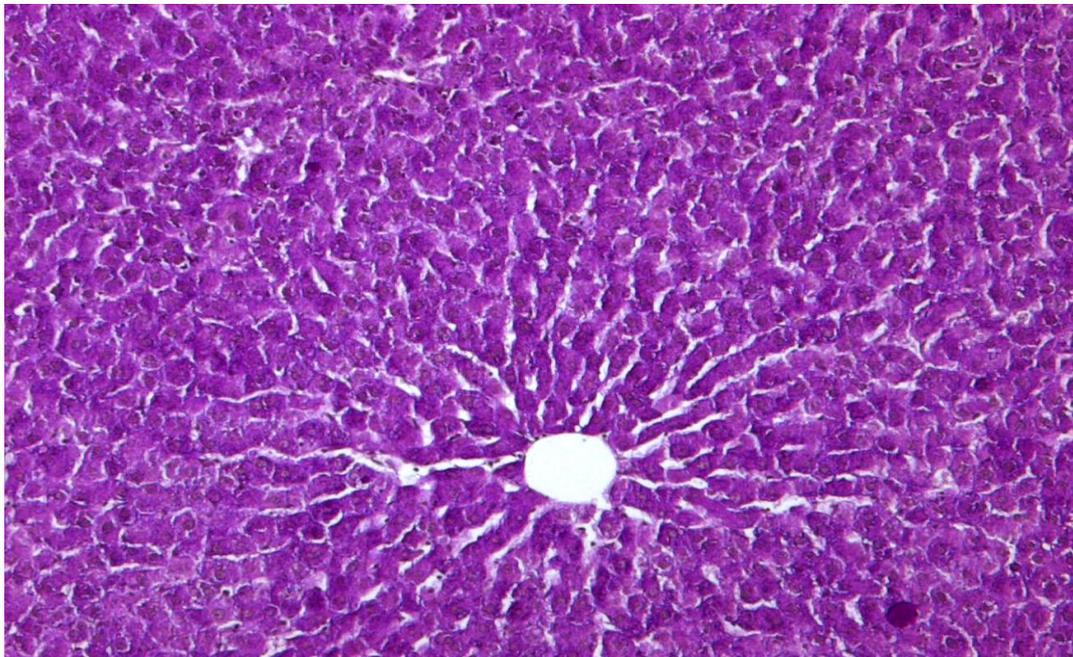


Abb. 12 PAS-Färbung eines Lebergewebeschnitts, der den Glykogengehalt der Hepatozyten vor der Reperfusion zeigt. Die Gewebeprobe entstammt einem Versuchstier ohne Fasten nach 24 Stunden Konservierung und 2 Stunden Reperfusion (Originalvergrößerung x100)

Um die Aktivität von Caspase-3 zu bestimmen, wurden 5µm dicke, in Paraffin eingebettete Lebergewebeschnitte über Nacht bei Raumtemperatur mit einem polyklonalen anti-cleaved-Caspase-3 Kaninchenantikörper (1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Diese Antikörper detektieren große Fragmente (17/19 kDa) aktivierter Caspase-3, aber keine komplette Caspase-3 Kette. Ein biotinylierter Anti-Maus/Kaninchen-Ig-Antikörper wurde als sekundärer Antikörper verwendet, um Streptavidin-Biotin-Komplex Peroxidase zu markieren (Link,LSAB-HRP; DakoCytomotion, Hamburg, Deutschland). Als Chromogen diente 3,3´ Diaminobenzidin. Alle Schnitte wurden mit Hemalaun gegengefärbt (Abb.13).

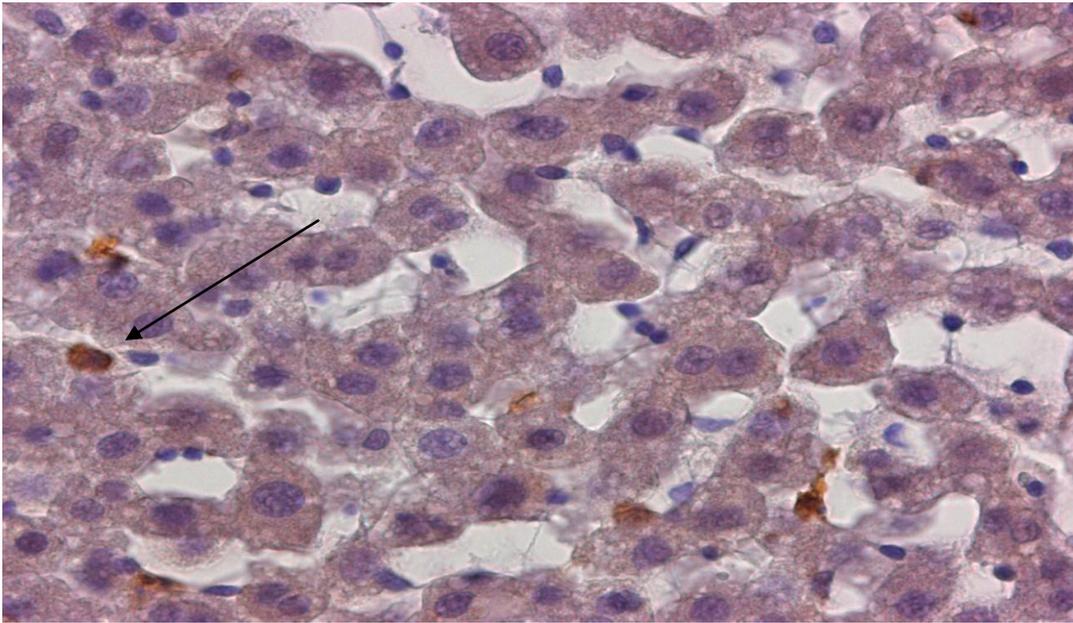


Abb. 13 Caspase-Färbung eines Lebergewebeschnitts, der Zeichen der Apoptose der Hepatozyten und Sinusendothelzellen nach Reperfusion zeigt. Die Gewebeprobe entstammt einem Versuchstier nach 12-stündiger Nahrungskarenz, 24 Stunden Konservierung und 2 Stunden Reperfusion (Originalvergrößerung x200)

5.3. Experimentelles Protokoll

Wie bereits ausgeführt, wurden für die Durchführung der Experimente 24 Sprague-Dawley Ratten benötigt, die in 3 Gruppen (n=8) eingeteilt worden waren. Alle Ratten wurden vor Beginn der Versuche gleich behandelt. Sodann wurde die erste Gruppe bis zur Operation mit Wasser und Standard Labornahrung ad libitum versorgt. Die zweite Gruppe erhielt Wasser ad libitum bis zum Versuchsbeginn, allerdings wurde eine 12-stündige Nahrungskarenz vor der Operation eingehalten. Die dritte Gruppe von Tieren musste eine 48-stündige Nahrungskarenz vor der Operation einhalten, hatte jedoch ebenfalls Wasser ad libitum bis zum Operationsbeginn zur Verfügung. Alle Tiere wurden vor dem Fasten und vor der Explantation gewogen, um den Gewichtsverlust zu dokumentieren. Nach Organentnahme erfolgte bei allen Explantationen eine 24-stündige Konservierung in HTK bei 4°C sowie eine anschließende 2-stündige Reperfusion mit 37°C warmen Krebs-Henseleit-Puffer.

5.4. Statistische Analyse

Alle ermittelten Daten sind als Mittelwert plus minus dem Standardfehler des Mittelwerts dargestellt (mean +/- SEM (standard error of the mean)). Mit Hilfe des „Kolmogorov-Smirnov“ Tests wurde die Normalverteilung der ermittelten Daten überprüft. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch den „Student`s *t*-Test“ eingeschätzt.

Für nicht parametrisch verteilte Daten wurde der Rangsummentest („Mann-Whitney U-Test“) durchgeführt.

Um drei Gruppen miteinander vergleichen zu können, wurde eine Einweg-Varianzanalyse durchgeführt. Der Einzelgruppenvergleich wurde dann mit einem passenden post-hoc Test durchgeführt, der aufgrund der Mehrfachvergleiche den alpha-Fehler entsprechend Bonferroni korrigierte. Zum Schluß wurden „Pearson Product Moment“ Korrelationsanalysen durchgeführt, um zu prüfen, ob zwischen den ermittelten Parametern statistisch relevante Korrelationen bestehen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Software Programms SigmaStat Version 2.03 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt.

6. Ergebnisse

6.1. Tiergewicht

Alle Tiere wurden vor dem Beginn der Explantation gewogen. Die Tiere der 0-Stunden Gruppe wogen 288,8g +/- 11,8g, die Tiere der 12-Stunden Fastengruppe wogen 252,8g +/- 11,7g und die Tiere der 48-Stunden Gruppe wogen 250g +/- 10,5g (Abb. 14). Das Körpergewicht der Tiere der Fastengruppen war zwar im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert, ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte jedoch nicht gefunden werden.

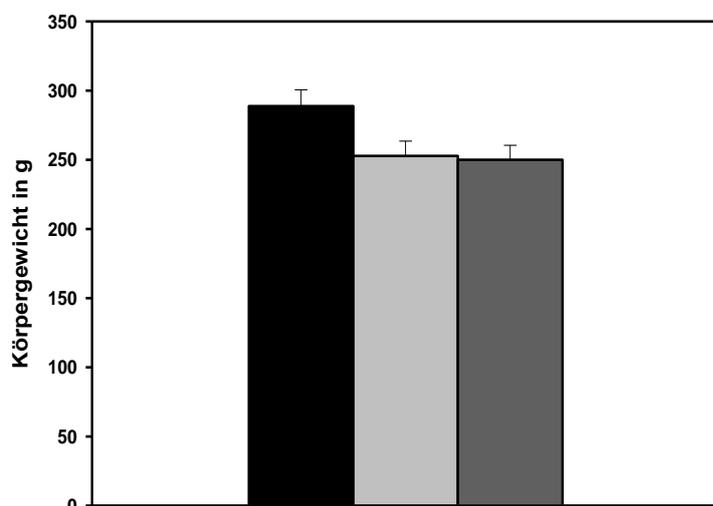
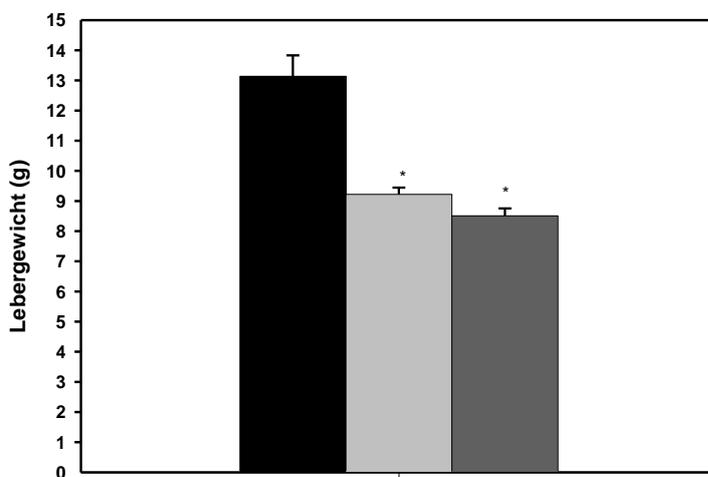


Abb.14 Körpergewicht der Tiere in g nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h Nahrungskarenz (dunkelgrau). Mittelwert +/- SEM.

6.2. Lebergewicht

Bei der Ermittlung des Lebergewichts nach der Explantation zeigte sich, dass die Organe von Tieren, die der 12-Stunden und 48-Stunden Fastengruppe angehörten, signifikant leichter waren als die Organe, die den Tieren der 0-Stunden Fastengruppe entnommen worden waren. In der 0-Stunden Fastengruppe wogen die Lebern $13,13\text{g} \pm 0,69\text{g}$, in der 12-Stunden Fastengruppe $9,22\text{g} \pm 0,22\text{g}$ und in der 48-Stunden Fastengruppe wogen die Organe $8,50\text{g} \pm 0,24\text{g}$ (Abb.15).



*Abb.15 Lebergewicht der Tiere, die 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) gefastet haben bei der Explantation in g. Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. 0h.*

6.3. Lebermetabolismus

Im Rahmen der Versuche wurden folgende metabolische Parameter untersucht:

Sauerstoff: Bei der Ermittlung des Sauerstoffverbrauchs in μmol zeigte sich, dass die Organe der 12- und 48-Stunden Fastengruppe weniger Sauerstoff verbrauchten als die Organe, die der 0-Stunden Fastengruppe entstammten. Bei den Messungen des Sauerstoffverbrauchs, die bei 60 min, 90 min und 120 min durchgeführt worden waren, war der Sauerstoffverbrauch von Lebern aus der 48-Stunden Fastengruppe sogar signifikant ($p < 0,05$) geringer als bei Lebern der 0-Stunden Fastengruppe (Abb. 16).

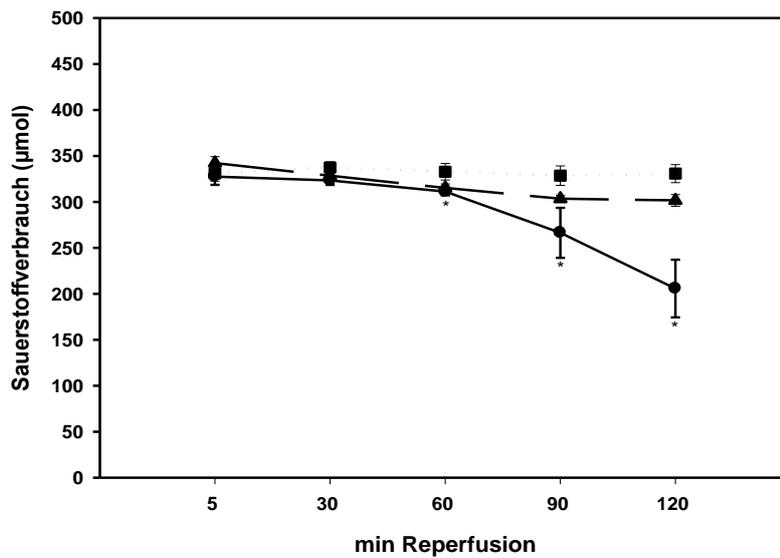


Abb.16 Sauerstoffverbrauch während 120 minütiger Reperfusion nach 24h kalter Konservierung, 0h (Quadrat), 12h (Dreieck) und 48h (Kreis) Nahrungskarenz und HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs. 0h.

Die Analyse des Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit vom Lebergewicht zeigte, dass die Werte der Lebern der 12- und 48-Stunden Fastengruppe signifikant höher lagen als die Verbrauchswerte der Organe der 0-Stunden Fastengruppe. Allerdings war der Sauerstoffverbrauch der Lebern der 0-Stunden Gruppe über die gesamte 120-minütige Reperfusion konstant, während bei denen der 12-Stunden Gruppe und insbesondere bei denen der 48-Stunden Fastengruppe ein deutlicher Abfall der Werte über die Zeit zu sehen war (Abb. 17).

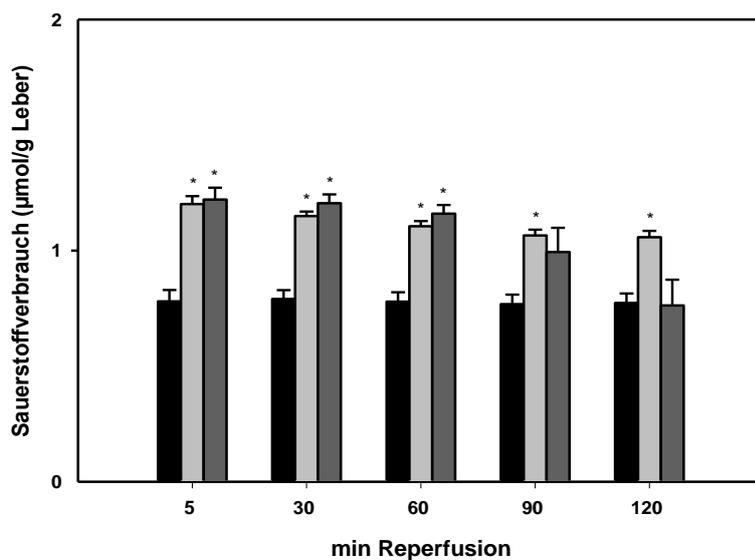


Abb.17 Sauerstoffverbrauch in Relation zum Lebergewicht während 120-minütiger Reperfusion nach 24 Stunden kalter Konservierung von Lebern nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs. 0h.

Die Untersuchung der Sauerstoffaufnahme zeigte, dass die Organe aller drei Gruppen in den ersten 60 Minuten der Reperfusion vergleichbar viel Sauerstoff aufnahmen. Nach 90 und 120 Minuten der Reperfusion war festzustellen, dass sich die Sauerstoffaufnahme der Lebern der 12- und 48-Stunden Fastengruppe verringert hatte. In der 48-Stunden Gruppe hatte sie sich sogar im Vergleich zur 0-Stunden Gruppe signifikant verschlechtert (Abb. 18).

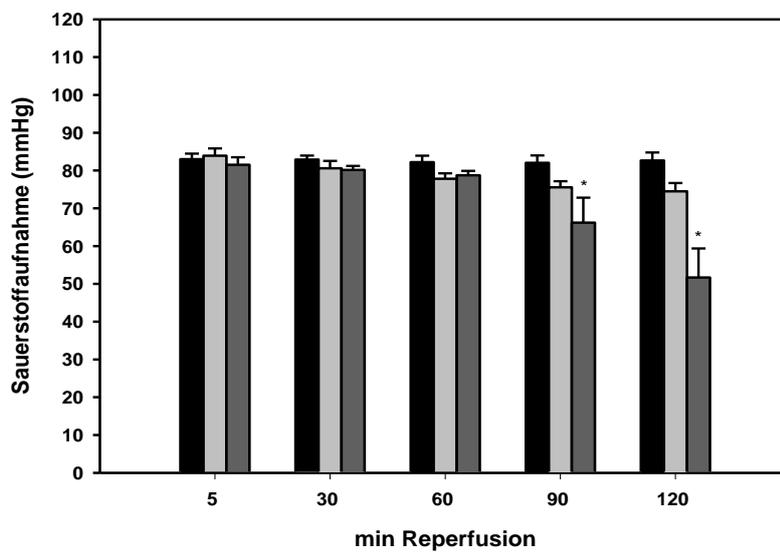


Abb.18 Sauerstoffaufnahme während 120-minütiger Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs. 0h.

Kohlendioxid: Beim Kohlendioxidstoffwechsel zeigten die Lebern der 0-Stunden Fastengruppe nach 5 und 30 Minuten der Reperfusion eine wesentlich höhere Kohlendioxidproduktion als die der 12-Stunden und 48-Stunden Fastengruppe. Im weiteren Verlauf näherte sich die Kohlendioxidproduktion der Organe der 0-Stunden Gruppe der Organe der anderen Gruppen an, blieb aber immer noch erhöht. Nach 90 und 120 Minuten war die Kohlendioxidproduktionsleistung der Lebern aus der 48-Stunden Fastengruppe am schlechtesten (Abb. 19).

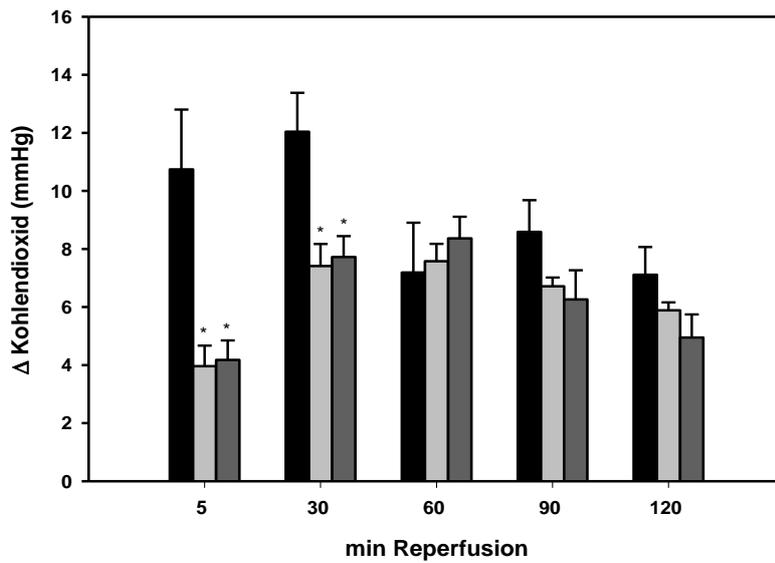


Abb. 19 Kohlendioxidproduktion während 120-minütiger Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs. 0h. Delta = Differenz post- und prähepatisch gemessener Werte

Die Analyse der Kohlendioxidparameter in Abhängigkeit vom Lebergewicht ergab, dass zunächst die Lebern der 0-Stunden Fastengruppe die höchste Kohlendioxidproduktion aufwiesen. Diese fiel allerdings im Verlauf der Reperfusion deutlich ab und glich sich der Produktion der anderen Gruppen an. Alle Gruppen lagen im Zeitraum zwischen 60- und 120 Minuten der Reperfusion auf einem vergleichbaren Niveau (Abb. 20).

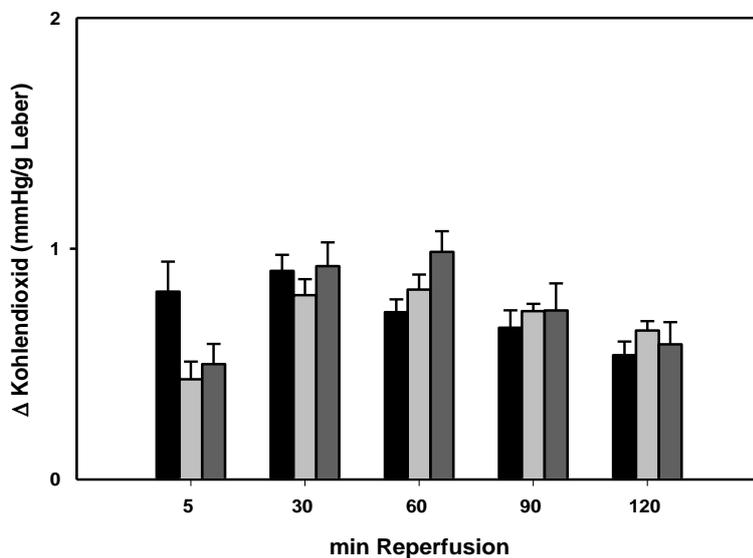


Abb. 20 Kohlendioxidproduktion während 120-minütiger Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. Delta = Differenz post- und prähepatisch gemessener Werte

Kalium: Der Kaliumgehalt im Effluat war nach Ausspülung der konservierten Leber mit Ringer-Laktat wesentlich höher als nach den ersten 5 Minuten der eigentlichen Reperfusion mit KHB-Puffer. Im Verlauf der 120-minütigen Reperfusion steigerte sich der Kaliumgehalt im Effluat deutlich. Nach 90 Minuten war der Kaliumgehalt im Effluat von Organen der 12-

Stunden Fasengruppe einmalig signifikant niedriger als bei Organen der 0-Stunden Fastengruppe (Abb. 21).

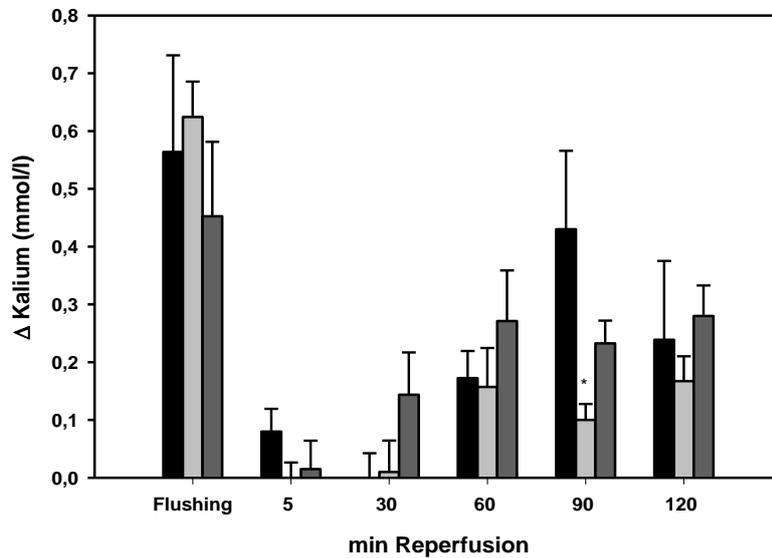


Abb. 21 Kalium im Effluat während der 120 minütigen Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs 0h. Delta = Differenz post- und prähepatisch gemessener Werte

pH-Wert: Die Analyse des pH-Werts zeigt deutlich, dass über die gesamte Zeit der Reperfusion gesehen die Organe der 0-Stunden Fastengruppe die größte pH-Wert Differenz aufwiesen. Die kleinsten pH-Wert Differenzen hatten die Organe der 48-Stunden Gruppe. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 22).

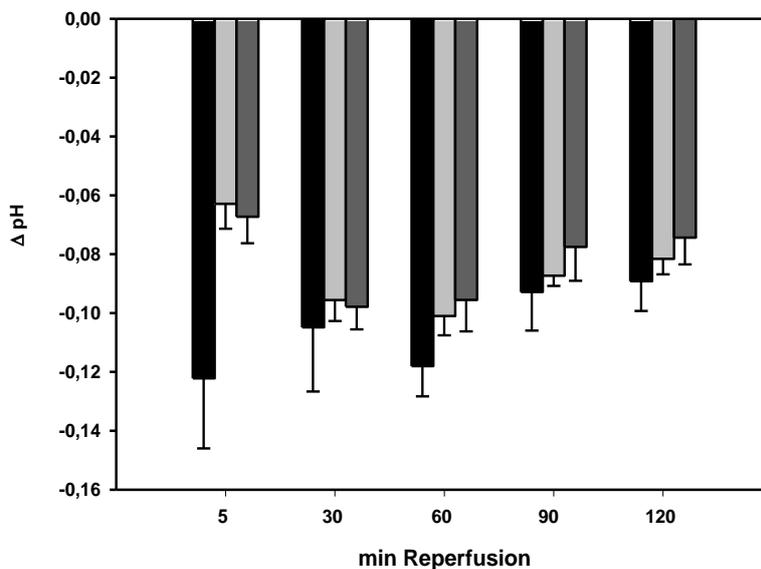


Abb. 22 pH-Veränderung während der 120 minütigen Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. Delta = Differenz post- und prähepatisch gemessener Werte

6.4. Leberfunktion

Die Beurteilung der Organfunktion erfolgte an der Messung des portalvenösen Drucks, des portalvenösen Widerstands und an der Produktion von Galleflüssigkeit.

6.4.1 Portalvenöser Druck

Der portalvenöse Druck war zu Beginn der Reperfusionphase bei allen Organen der drei Fastengruppen vergleichbar hoch. Er lag bei ca. 10 mmHg und fiel im Verlauf zügig ab, um sich gegen Ende der Reperfusion bei ca. 5 mmHg einzupendeln. Den höchsten Druck über die gesamte Perfusionszeit wiesen die Organe der 0- und 48-Stunden Fastengruppe auf. Geringfügig niedrigere Druckwerte waren bei den Organen der 12-Stunden Fastengruppe zu verzeichnen. Signifikant höher als bei Lebern der 12-Stunden Fastengruppe war der portalvenöse Druck bei Lebern der 48-Stunden Gruppe allerdings nur nach 45- und 60-Minuten. Signifikant niedriger als bei Organen der 0-Stunden Fastengruppe war der Druck bei Lebern der 12-Stunden Gruppe zum Zeitpunkt nach 75 Minuten. Ansonsten fanden sich keine statistisch relevanten Unterschiede (Abb. 23).

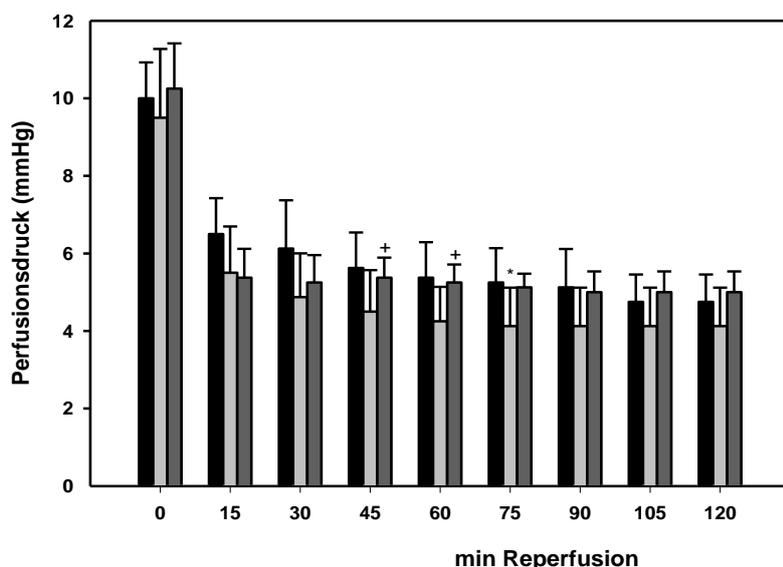


Abb. 23 Portalvenöser Druck während der 120 minütigen Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ versus 0h; + $p < 0,05$ versus 12h.

6.4.2 Portalvenöser Widerstand

Bei dem portalvenösen Widerstand, der in Abhängigkeit vom Lebergewicht ermittelt worden ist, zeigten sich deutliche Unterschiede. Zu Beginn der Reperfusion war der Widerstand bei allen Organen der drei Gruppen eher niedrig, stieg im Verlauf der weiteren Reperfusion aber stetig an.

Bei Organen der 48-Stunden Fastengruppe war zu erkennen, dass der Widerstand im Vergleich zu Organen der 0- und 12-Stunden Gruppe im Verlauf deutlich geringer zunahm. Ab 60 Minuten Reperfusion war er signifikant niedriger. Zwischen dem portalvenösen Widerstand der Lebern der 0- und 12-Stunden Fastengruppe war während des gesamten Beobachtungszeitraums kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abb. 24).

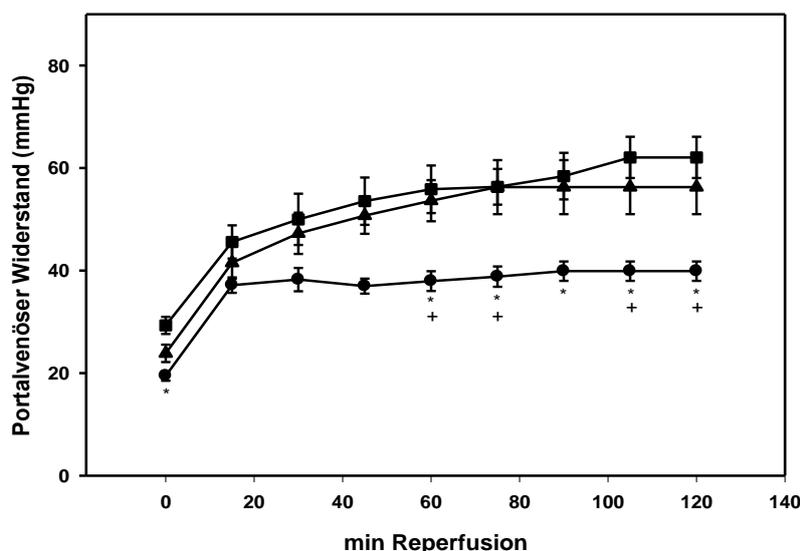


Abb. 24 Portalvenöser Widerstand während der 120 minütigen Reperfusion nach 0h (Quadrat), 12h (Dreieck) und 48h (Kreis) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ versus 0h; + $p < 0,05$ versus 12h.

6.4.3 Galleproduktion

Die Lebern zeigten deutliche Unterschiede in der Produktion von Galleflüssigkeit vor und nach der Explantation. Alle Organe produzierten vor der Explantation mehr Galle als danach. Vor Explantation produzierten Lebern der 0-Stunden Fastengruppe am meisten Galleflüssigkeit, Organe der 48-Stunden Fastengruppe am wenigsten. Im Vergleich zu den Organen der 0-Stunden Gruppe produzierten die Organe der 48-Stunden Gruppe sogar signifikant weniger. Gleiches galt auch für die Produktionsleistung von Galleflüssigkeit während der Reperfusion, allerdings war hier in allen Gruppen die absolute Produktionsleistung geringer (Abb. 25).

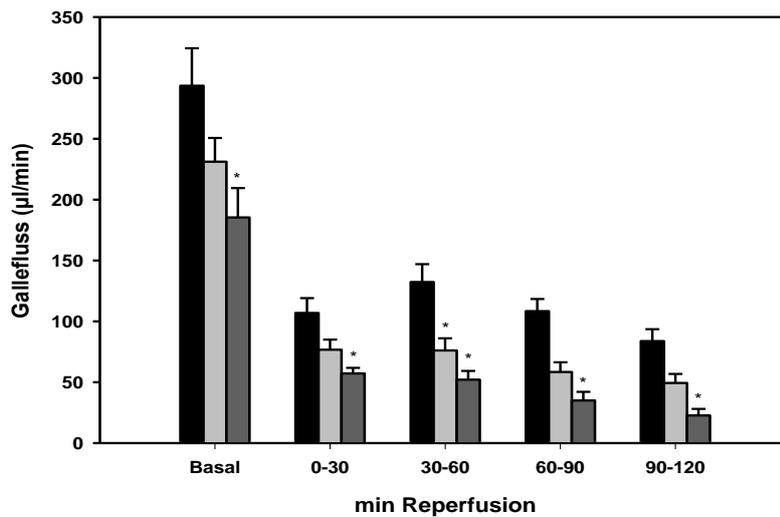


Abb. 25 Gallefluss basal und während 120 minütiger Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C) im Abstand von 30 Minuten. Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ versus 0h.

Die Analyse des Galleflusses in Abhängigkeit vom Lebergewicht zeigte bei den basalen Mengen vor Explantation keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen. Während der Reperfusionsphase produzierten Lebern der 0 Stunden Fastengruppe am meisten Galleflüssigkeit, Organe der 12-Stunden Gruppe produzierten weniger und die Lebern der 48-Stunden Fastengruppe produzierten sogar signifikant weniger Galleflüssigkeit im Vergleich zur 0 Stunden Gruppe (Abb. 26).

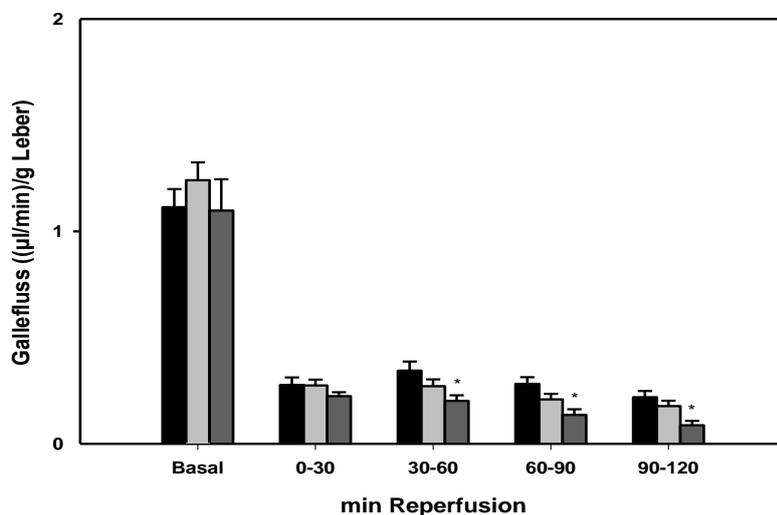


Abb. 26 Gallefluss basal und während 120 minütiger Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C) im Abstand von 30 Minuten. Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ versus 0h.

6.5. Hepatozellulärer Schaden

6.5.1. Apoptotischer Zellschaden

Die mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmte Apoptoserate lag bei Lebern von Tieren der 0-Stunden Fastengruppe vor Reperfusion bei ca. 1,5 % und stieg während der 120-minütigen Reperfusion auf über 2 % an (Abb. 27). 12 Stunden Fasten bewirkte eine geringfügig verstärkte Apoptoserate nach 60- und 120-Minuten Reperfusion. Im Gegensatz dazu zeigten Lebern von Tieren der 48-Stunden Fastengruppe eine signifikant verminderte Apoptoserate mit cirka 0,3 % direkt nach Konservierung und 1,5 % nach 120-minütiger Reperfusion (Abb. 27).

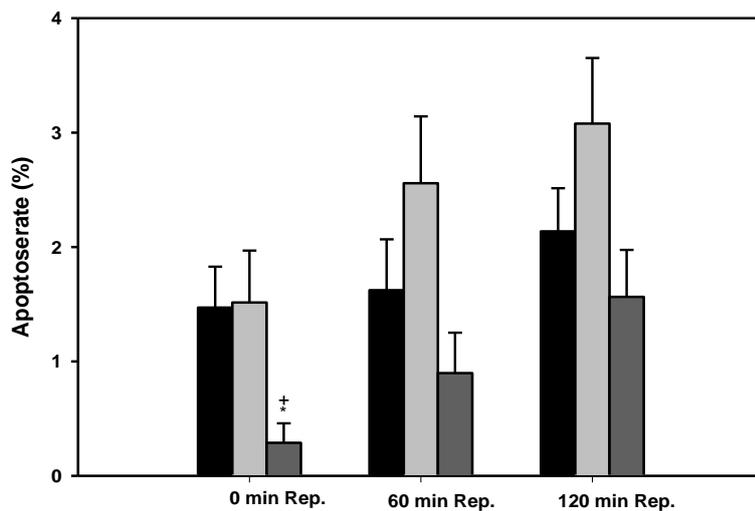


Abb. 27 Apoptoserate in Prozent aller sichtbaren Zellen während der 120 minütigen Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs 0h; + $p < 0,05$ vs 12h.

Des weiteren wurde die Anzahl apoptotischer Zellen pro Gesichtsfeld ermittelt. Die Ergebnisse waren vergleichbar mit den Ergebnissen, die im Rahmen der prozentualen Berechnung der Rate apoptotischer Zellen ermittelt werden konnten. Lebern der 48-Stunden Fastengruppe hatten zum Zeitpunkt 0- und 60-Minuten die geringste Anzahl apoptotischer Zellen. Es waren sogar signifikant weniger als bei Organen der 12-Stunden Fastengruppe zum Zeitpunkt 0-Minuten. Mehr Apoptosen pro Gesichtsfeld zeigten sich bei Organen der 0-Stunden Gruppe zu den Zeitpunkten 0- und 60-Minuten. Die Lebern der 12-Stunden Fastengruppe zeigten zu allen Zeitpunkten die meisten Apoptosen pro Gesichtsfeld ohne dass jedoch die Unterschiede zur 0-Stunden Gruppe signifikant waren (Abb. 28).

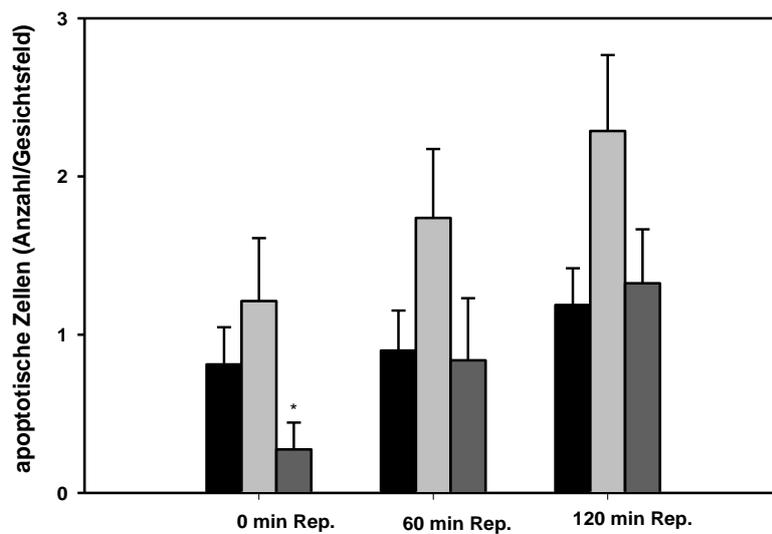


Abb. 28 Anzahl der apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld während der 120 minütigen Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs 0h.

6.5.2 Nekrotischer Zellschaden

Zur Feststellung des nekrotischen Zellschadens diente die Bestimmung der Leberenzyme im Effluat. Bestimmt wurden die Enzyme GOT, GPT und LDH in der Ringer-Laktat Ausspülung sowie im KHB-Effluat nach 120 Minuten. In der Ausspülung zeigten sich hohe Werte für GOT in allen drei Gruppen. Lebern der 12-Stunden Fastengruppe hatten sogar erheblich höhere Werte als Organe der 0-Stunden Gruppe. Die Werte lagen zwischen 35 und 80 U/L. Die Werte von GPT und LDH lagen bei allen drei Gruppen auf vergleichbarem Niveau. Sie lagen im Bereich zwischen 5 und 8 U/L und ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 29).

Nach 120 Minuten Reperfusion war die GOT in allen drei Gruppen bei Werten in der Größenordnung, die bereits in der Ausspülung gemessen worden ware. Die Werte für GPT und LDH waren in den Lebern der 48-Stunden Fastengruppe signifikant höher als in Organen der anderen beiden Gruppen. Zwischen diesen, der 0-Stunden und der 12-Stunden Fastengruppe, fand sich kein statistisch relevanter Unterschied (Abb. 30).

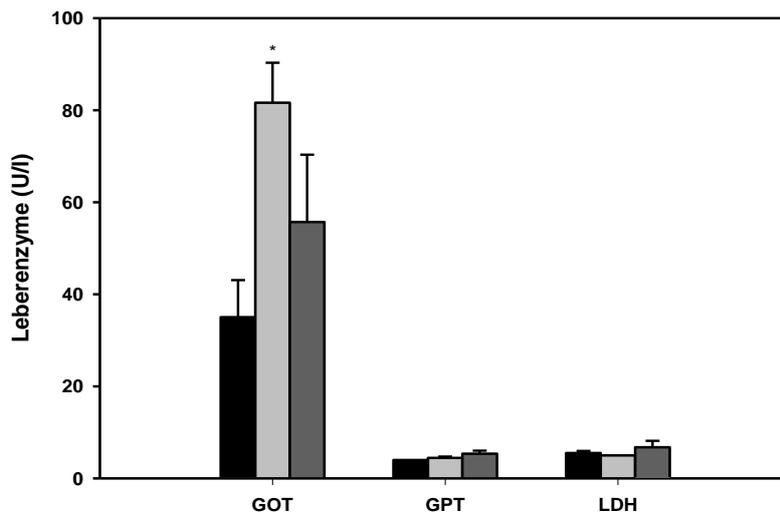


Abb. 29 GOT, GPT und LDH im Flushing in U/L nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs 0h.

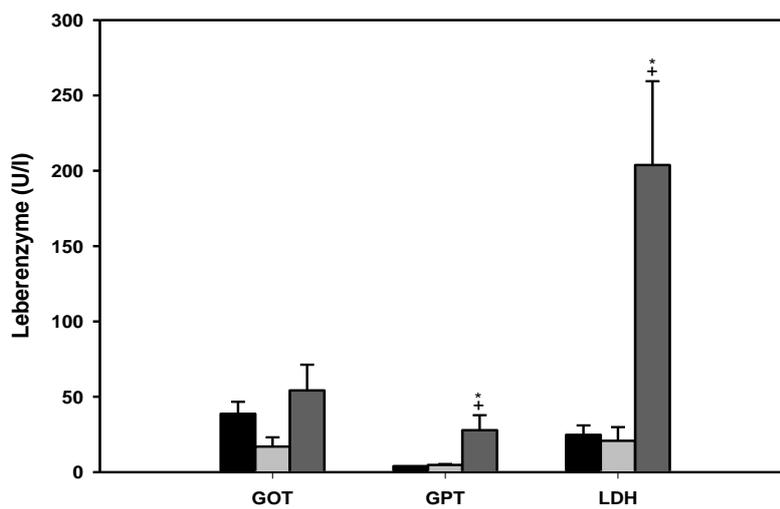


Abb. 30 GOT, GPT und LDH zum Zeitpunkt 120 min in U/L nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs 0h; + $p < 0,05$ vs 12h.

6.6. Histomorphologische Parameter

Insgesamt wurden vier verschiedene histomorphologische Parameter ausgewertet. In den HE-Schnitten wurden die Vakuolisierungen der Hepatozyten und die Endothelablösungen analysiert. Des Weiteren wurde mittels Caspase-Färbung der apoptotische Zelltod in Sinusendothelzellen und Hepatozyten ausgewertet. Schließlich wurden Schnitte mit einer PAS-Färbung zur Beurteilung des Glykogengehalts analysiert.

6.6.1 Vakuolisierung

Dieser Parameter wurde in normalen HE-Schnitten bestimmt. Analysiert wurde der Grad der Vakuolisierung der Hepatozyten, der einem Score von 0 bis 4 zugeordnet wurde, wie in Kapitel 5.2.4 im Detail erläutert. Die Auswertung erfolgte an Gewebeproben, die vor der Reperfusion und 120 Minuten nach erfolgter Reperfusion entnommen worden waren. Vor Beginn der Reperfusion zeigten Gewebsschnitte von Lebern der 0-Stunden Fastengruppe die geringste Vakuolisierung. Schnitte von Organen der 12-Stunden Fastengruppe wiesen eine signifikant stärkere Vakuolisierung auf. Die ausgeprägteste Vakuolisierung wurde in Schnitten der Lebern der 48-Stunden Gruppe gesehen. Nach 120-Minuten Reperfusion zeigte sich ein einheitliches Bild. Hier war die Vakuolisierung in allen drei Gruppen vergleichbar (Abb. 31).

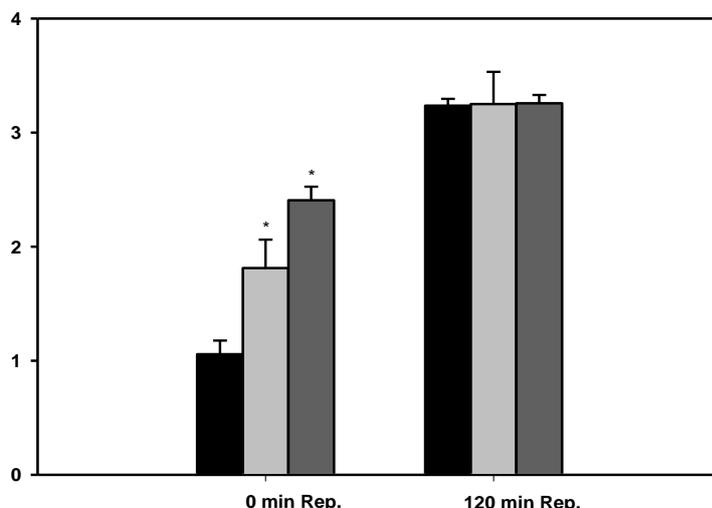


Abb. 31 Vakuolisierung der Hepatozyten zu den Zeitpunkten 0 und 120 Minuten der Reperfusion, nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). 0: keine; 1: <10%; 2: 10-40%; 3: 40-70%; 4: >70% Hepatozyten mit Vakuolen. Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs 0h.

6.6.2 Endothelablösung

Zu zwei verschiedenen Zeitpunkten - vor Beginn der Reperfusion und nach 120 Minuten Reperfusion – wurde die Endothelablösung der in den Gewebsschnitten enthaltenen Venolen analysiert. Schnitte der Lebern der 0-Stunden Fastengruppe zeigten vor der Reperfusion mit ca. 30 % die geringste Endothelablösung. Die anderen beiden Gruppen ließen ebenfalls eine Endothelablösung in der Größenordnung zwischen 30 und 35 % erkennen. Ein signifikanter Unterschied bestand nicht. Nach 120-minütiger Reperfusion stiegen die Werte für die Endothelablösung im Mittel um cirka 7 % auf 40 % in allen drei Gruppen an. Ein signifikanter Unterschied lag hier ebenfalls nicht vor (Abb. 32).

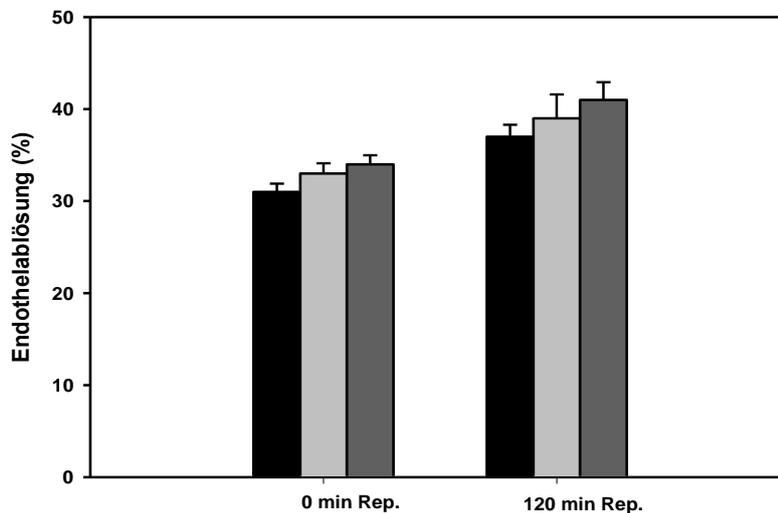


Abb. 32 Endothelablösung der Venolen zu den Zeitpunkten 0 und 120 Minuten der Reperfusion, nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C) in Prozent. Mittelwert +/- SEM.

6.6.3 Caspase-3-Expression

Mit Hilfe der Caspase-Färbung wurde das Ausmaß der Apoptose in Sinusendothelzellen und Hepatozyten beurteilt. Unterschieden wurden in beiden Fällen braun und schwarz gefärbte Zellen. Für diese Analyse kamen lediglich Proben zur Verwendung, die zum Zeitpunkt nach 120 Minuten Reperfusion gewonnen worden waren. In Gewebeschnitten von Lebern der 0-Stunden Fastengruppe zeigte sich durchschnittlich eine Apoptose pro Gesichtsfeld bei Sinusendothelzellen und Hepatozyten. 12-Stunden Nahrungskarenz verdoppelte die Anzahl der Apoptosen bei Sinusendothelzellen und verdreifachte sie bei Hepatozyten. Eine 48-stündige Nahrungskarenz bewirkte keine weitere Verstärkung des apoptotischen Zelltods (Abb. 33).

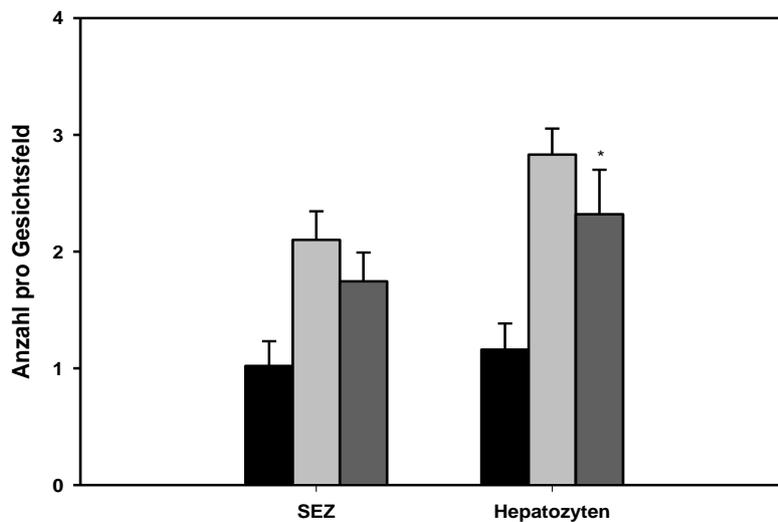


Abb. 33 Angefärbte Sinusendothelzellen (SEZ) und Hepatozyten pro Gesichtsfeld nach Caspase-Färbung, nach 120 Minuten Reperfusion und 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM. * $p < 0,05$ vs 0h Nahrungskarenz

6.6.4 Glykogenspeicherung

Die PAS-Färbung machte deutlich, wieviel Glykogen in den Hepatozyten gespeichert wurde. Ein hoher Glykogengehalt wird durch eine intensivere Färbung der Zellen repräsentiert. Der Grad dieser Färbung wurde nach Beurteilung der Gesichtsfelder mit Hilfe eines Score-Systems von 0 bis 3 eingeteilt. Dieses Score-System wurde in Kapitel 5.2.4. im Detail erläutert. Analysiert wurden nur Gewebeproben, die unmittelbar vor Beginn der Reperfusion gewonnen worden waren. Dabei konnte ermittelt werden, dass bei Gewebsschnitten von Lebern der 0-Stunden Fastengruppe der größte Anteil an Hepatozyten gefärbt war. Ungefähr 70 % der Hepatozyten pro Gesichtsfeld wiesen eine intensive Färbung auf. Bei Schnitten von Organen der 12-Stunden Fastengruppe waren signifikant weniger Hepatozyten (30-40 %) angefärbt als bei Schnitten von Lebern der 0-Stunden Fastengruppe. Bei den Schnitten von Organen der 48-Stunden Fastengruppe waren unter 30 % der Hepatozyten pro Gesichtsfeld angefärbt. Das waren signifikant weniger als bei den Schnitten von Lebern der anderen beiden Fastengruppen (Abb. 34).

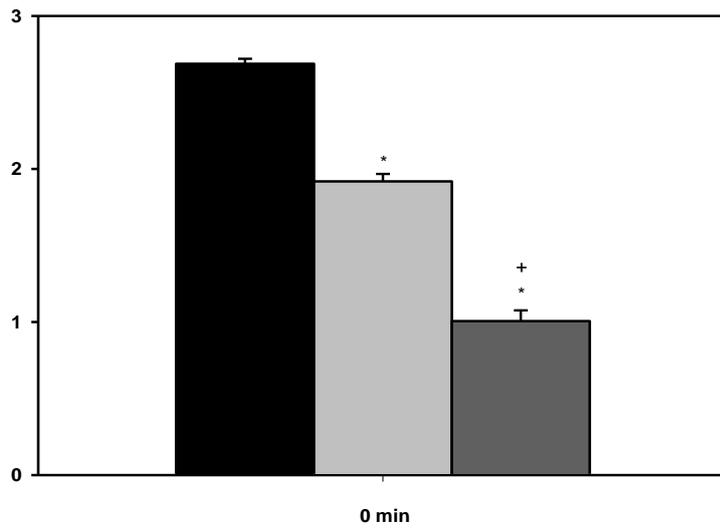


Abb. 34 PAS-Färbung der Hepatozyten pro Gesichtsfeld zum Zeitpunkt 0 Minuten der Reperfusion nach 0h (schwarz), 12h (hellgrau) und 48h (dunkelgrau) Nahrungskarenz und 24h HTK-Konservierung (4°C).
0: keine; 1: <30 %; 2: 30-70 %; 3: >70 %.
* $p < 0,05$ vs 0h; + $p < 0,05$ vs 12h.

6.7. Korrelationsanalyse

Für folgende Parameter war die Korrelation auf dem Niveau von 0,01 und 0,05 signifikant:

6.7.1 Nahrungskarenz

Die Dauer der Nahrungskarenz, also 0, 12 oder 48 Stunden, korrelierte negativ mit der Produktion von Galleflüssigkeit jeweils zwischen 30 und 60 Minuten (Abb. 35), zwischen 60 und 90 Minuten (Abb. 36) und zwischen 90 und 120 Minuten (Abb. 37).

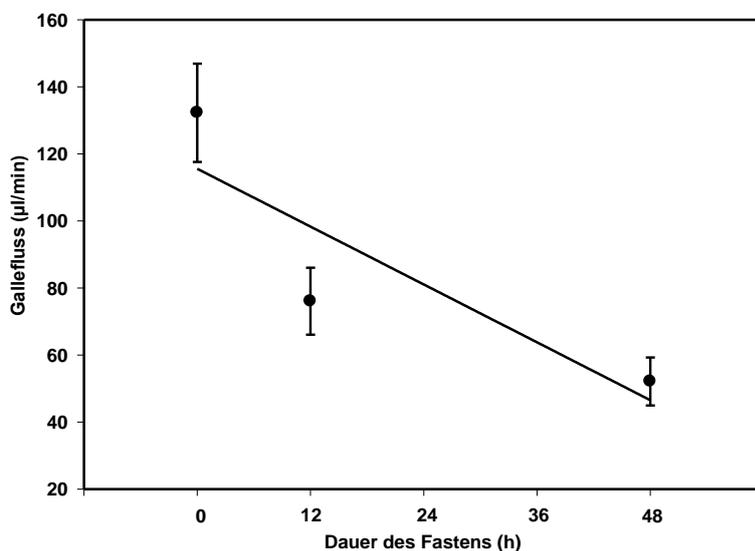


Abb. 35 Negative Korrelation zwischen der Dauer des Fastens in Stunden und der Produktion von Galleflüssigkeit zwischen 30 und 60 Minuten Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

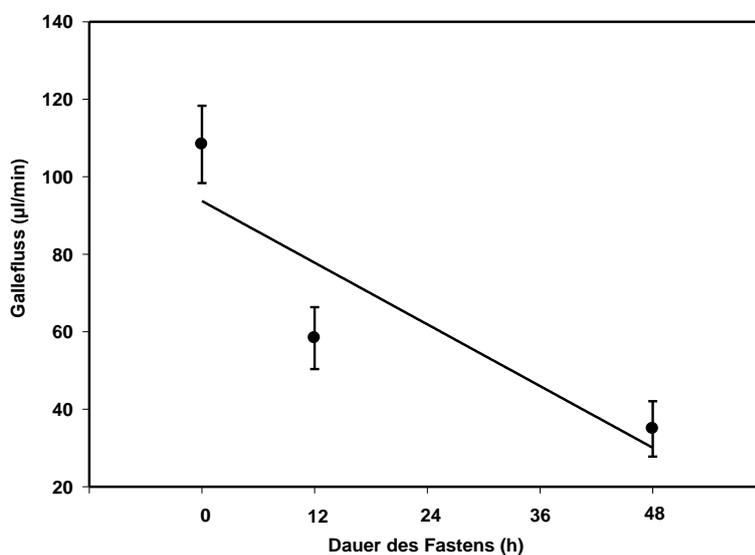


Abb. 36 Negative Korrelation zwischen der Dauer des Fastens in Stunden und der Produktion von Galleflüssigkeit zwischen 60 und 90 Minuten Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

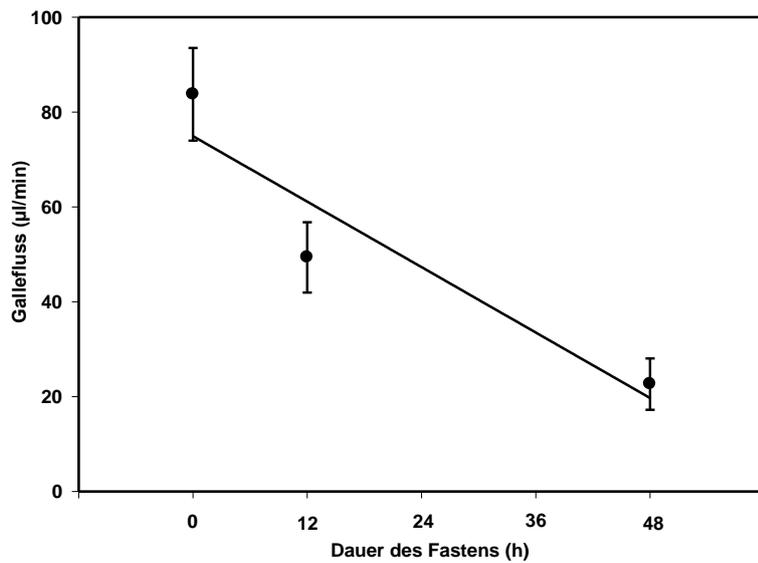


Abb. 37 Negative Korrelation zwischen der Dauer des Fastens und der Produktion von Galleflüssigkeit zwischen 90 und 120 Minuten Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

6.7.2 Lebergewicht

Das Lebergewicht bei der Explantation korrelierte positiv mit dem Sauerstoffverbrauch bei 30 (Abb. 38), 60 (Abb. 39), 90 (Abb. 40) und 120 Minuten (Abb. 41).

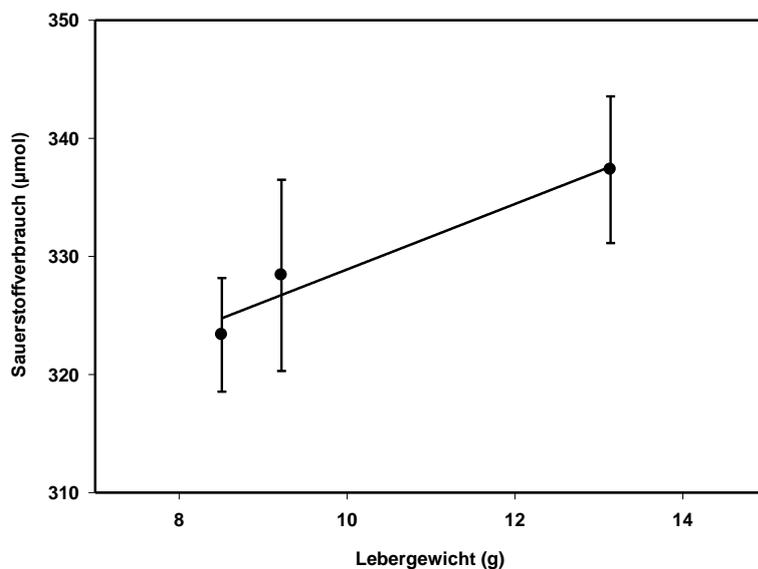


Abb. 38 Positive Korrelation zwischen dem Lebergewicht und dem Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt 30 Minuten der Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

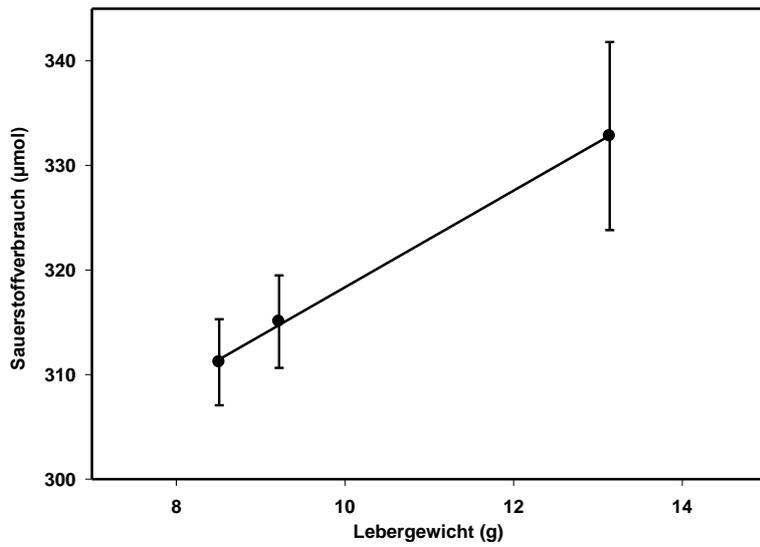


Abb. 39 Positive Korrelation zwischen dem Lebergewicht und dem Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt 60 Minuten der Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

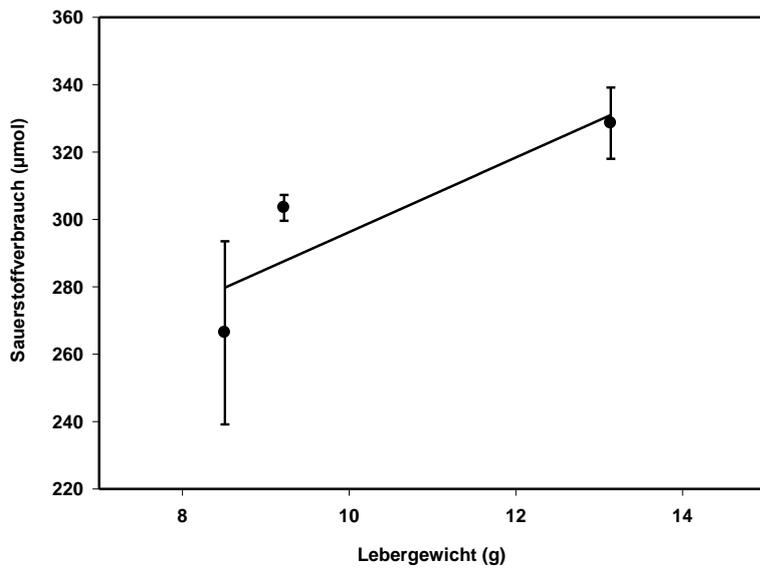


Abb. 40 Positive Korrelation zwischen dem Lebergewicht und dem Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt 90 Minuten der Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

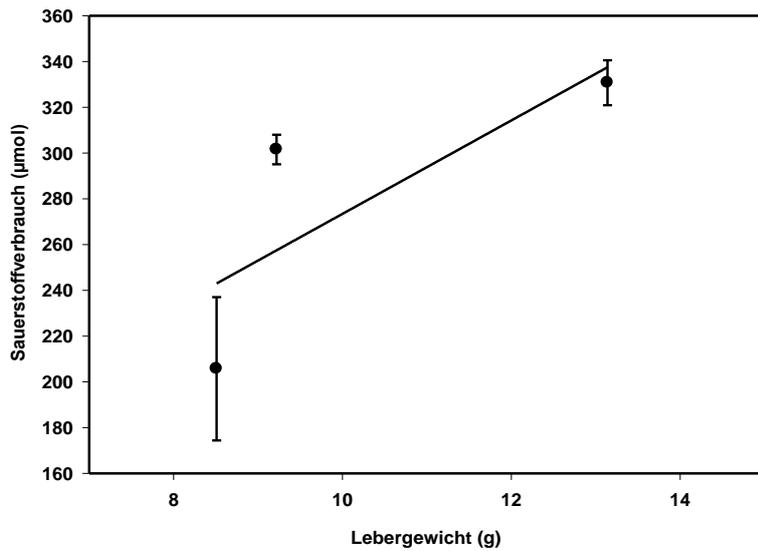


Abb. 41 Positive Korrelation zwischen dem Lebergewicht und dem Sauerstoffverbrauch zum Zeitpunkt 120 Minuten der Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

6.7.3 Vakuolisierung

Der Grad der Vakuolisierung zum Zeitpunkt 0 Minuten korrelierte negativ mit der Produktion von Galleflüssigkeit zwischen 60 und 90 Minuten (Abb. 42) und zwischen 90 und 120 Minuten (Abb. 43). Die Vakuolisierung korrelierte zusätzlich auch positiv mit der Dauer des Fastens (Abb. 44).

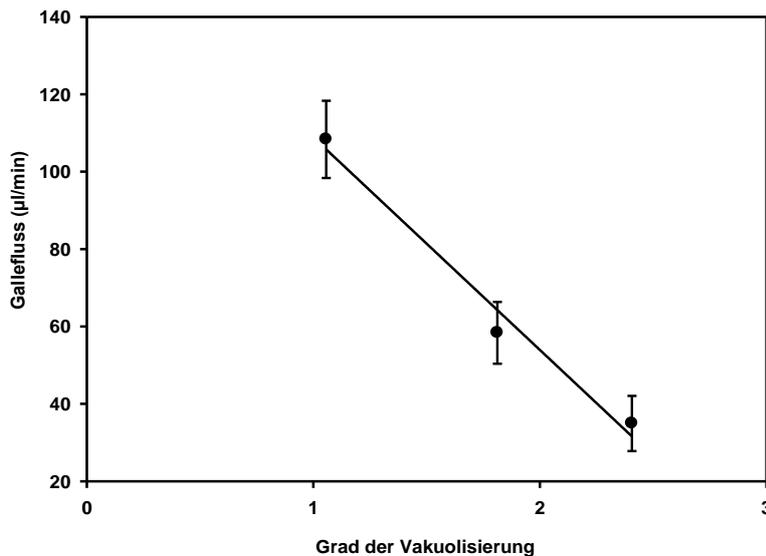


Abb. 42 Negative Korrelation zwischen dem Grad der Vakuolisierung (0: keine; 1: <10%; 2: 10-40%; 3: 40-70%; 4: >70% Hepatozyten mit Vakuolen) und der Produktion von Galleflüssigkeit zwischen 60 und 90 Minuten der Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

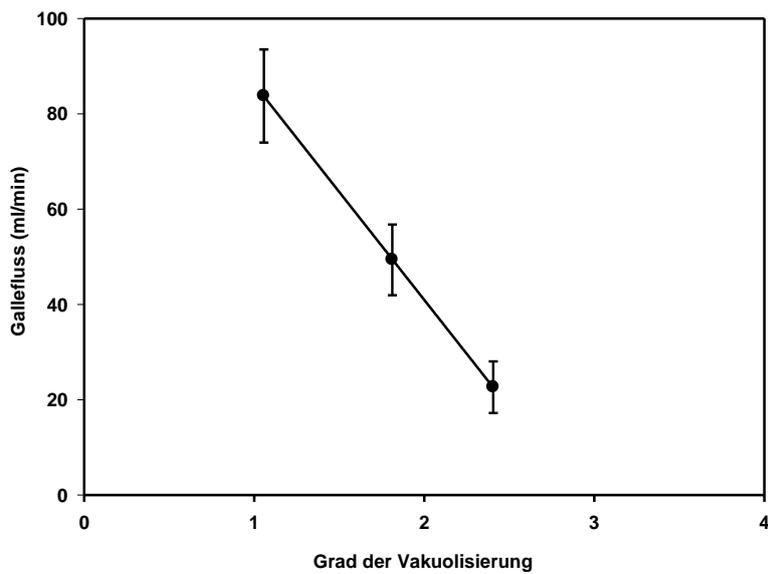


Abb. 43 Negative Korrelation zwischen dem Grad der Vakuolisierung (0: keine; 1: <10%; 2: 10-40%; 3: 40-70%; 4: >70% Hepatozyten mit Vakuolen) und der Produktion von Galleflüssigkeit zwischen 90 und 120 Minuten der Reperfusion nach 24h HTK-Konservierung (4°C).
Mittelwert +/- SEM.

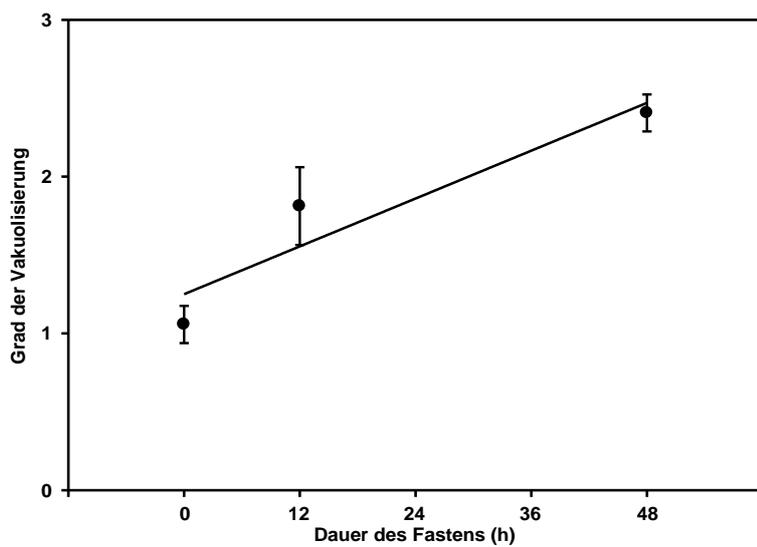


Abb. 44 Positive Korrelation zwischen der Dauer des Fastens und dem Grad der Vakuolisierung (0: keine; 1: <10%; 2: 10-40%; 3: 40-70%; 4: >70% Hepatozyten mit Vakuolen) nach 24h HTK-Konservierung (4°C).
Mittelwert +/- SEM.

6.7.4 Caspase-3-Expression

Die Anzahl der immunhistochemisch positiv gefärbten Hepatozyten pro Gesichtsfeld korrelierte negativ mit der Dauer des Fastens (Abb. 45) und positiv mit dem Lebergewicht bei Explantation (Abb. 46).

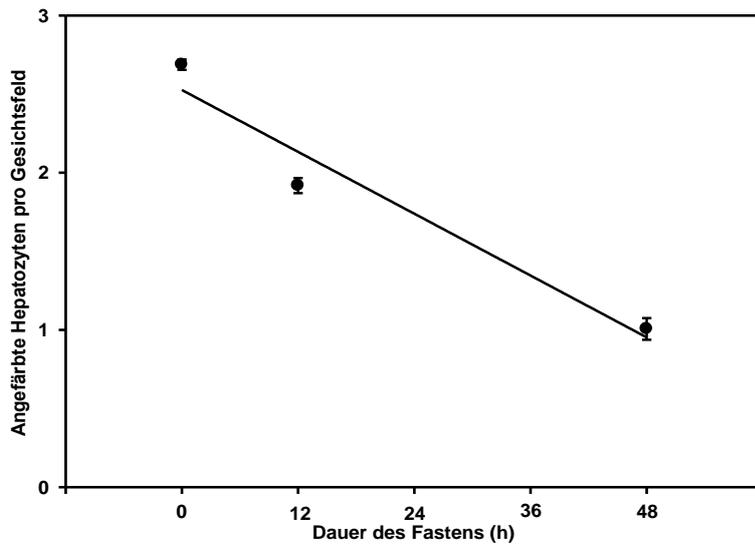


Abb. 45 Negative Korrelation zwischen der Dauer des Fastens und den angefärbten Hepatozyten pro Gesichtsfeld nach Caspase-3-Färbung nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

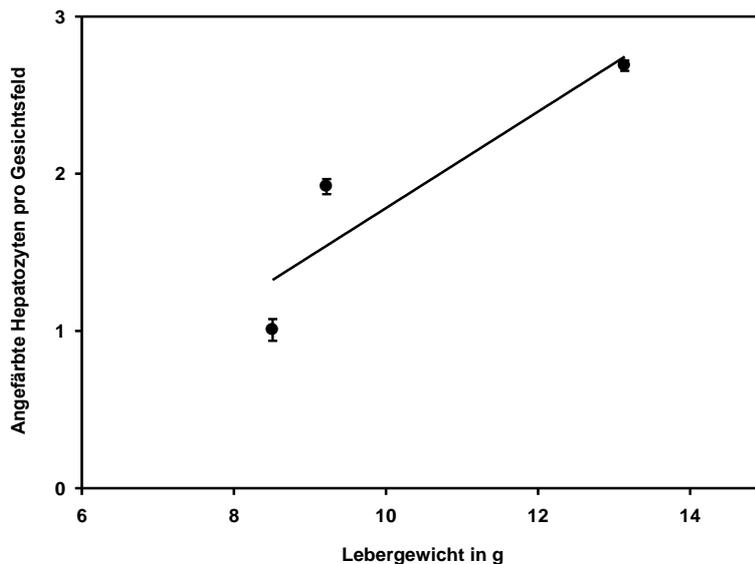


Abb. 46 Positive Korrelation zwischen dem Gewicht der Leber bei Explantation und den angefärbten Hepatozyten pro Gesichtsfeld nach Caspase-3-Färbung nach 24h HTK-Konservierung (4°C). Mittelwert +/- SEM.

6.7.5 Glykogenspeicherung

Die Dauer des Fastens korrelierte erwartungsgemäß negativ mit dem Ausmaß der PAS-Färbung (Abb. 47).

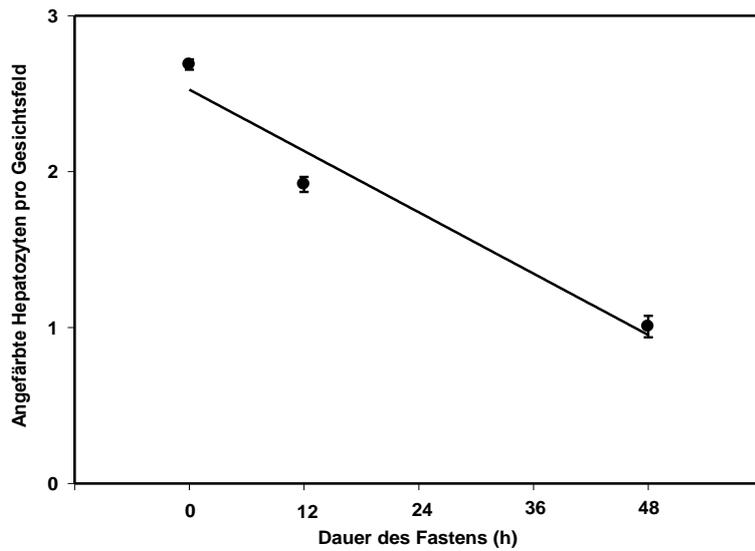


Abb. 47 Negative Korrelation zwischen der Dauer des Fastens und der Anzahl der PAS-positiven Hepatozyten. Mittelwert +/- SEM.

7. Diskussion

7.1. Diskussion von Material und Methoden

7.1.1. Diskussion des Modells

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, bewirkt die mit der Lebertransplantation verbundene Ischämie, die Konservierung und die Reperfusion eine massive Beeinträchtigung der Funktion der zu transplantierenden Leber. Ziel der vorliegenden Untersuchung war herauszufinden, auf welche Art die Parenchymzelle während der Reperfusion geschädigt wird. Im Rahmen der Durchführung der Versuche konnten mit dem Modell der isoliert perfundierten Leber die in der Initialphase der Leberreperfusion auftretenden Gewebsschäden und die Besonderheiten des Stoffwechsels adäquat erfasst werden (BRADFORD et al., 1986; JAESCHKE, 1991). Kritisch bedacht werden muss allerdings, dass dieses Modell eine ex vivo Perfusion darstellt und damit zeitlich begrenzt ist. Es gelingt nicht, wie bei einer Lebertransplantation am lebenden Organismus, die Beobachtungen über einen längeren Zeitraum durchzuführen. Dagegen lässt sich das Organ eingehender untersuchen, weil die Gewinnung von histologischen Proben oder die auflichtmikroskopische ex situ Analyse ohne großen Aufwand ermöglicht wird. Da gerade die frühe Phase der Reperfusion einen kritischen Zeitpunkt für den Erfolg der Transplantation darstellt, kann die isolierte Perfusion als ideales Modell zur Erweiterung der gegebenenfalls bedeutsamen Erkenntnisse für den Reperfusionsschaden angesehen werden.

Als Konservierungslösungen eignen sich University of Wisconsin Lösung (UW-Lösung), Euro-Collins-Lösung (EC-Lösung) und die in dieser Untersuchung verwendete Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK-Lösung). Im Vergleich zur UW-Lösung und EC-Lösung ist HTK eine kaliumarme Lösung und enthält Histidin und Mannitol als osmotisch wirksame Bestandteile. Ferner hat die Aminosäure Histidin bei niedrigen Temperaturen eine sehr hohe Pufferkapazität, die allerdings bei Temperaturen über 10°C deutlich abnimmt (SCHILLING et al., 1996). Ein bedeutender Vorteil von HTK-Lösung ist ihre Fließeigenschaft. Sie hat eine wasserähnliche Viskosität, die eine optimale Perfusion des Mikrogefäßsystems der Leber gewährleistet (HOWDEN et al., 1989). Vergleichende Studien mit UW- und EC-Lösung haben ergeben, dass HTK-Lösung in der Tat die besten Fließeigenschaften aufwies (AMINALAI et al., 1992), sich indessen mit UW-Lösung die besten Ergebnisse bei Konservierungszeiten über 24 Stunden erzielen ließen. Dabei konnten

aber keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellvitalität, der Apoptose oder der Nekrose festgestellt werden (STRAATSBURG et al., 2002). Ferner wirkt HTK-Lösung im Vergleich zu den anderen Lösungen unterdrückend auf die Aktivierung von Kupfferzellen. Da diese Zellen eine bedeutende Rolle in der Generierung von Gewebeschäden verursachenden Entzündungsmediatoren spielen, wird unterstellt, dass HTK über seine anti-entzündliche Wirkung zur Verbesserung der Stoffwechselfunktionen von Lebern nach Transplantation beiträgt (SPIEGEL et al., 1998).

Im Modell der isoliert perfundierten Leber ist die adäquate Sauerstoffversorgung ein weiterer entscheidender Faktor. Bei der Leberperfusion der hier vorliegenden Untersuchung bleibt zu beachten, dass die verwendete erythrozytenfreie Krebs-Henseleit-Puffer Lösung, mit der die Organe mit einer Flussrate von 2 ml/min x g Leber perfundiert wurden, eine nicht optimale Sauerstoffversorgung des Gewebes herbeigeführt haben könnte. Von der Arbeitsgruppe um Cheung wird für erythrozytenfreie Lösungen eine Flussrate von 6 ml/min x g Leber empfohlen, um optimale Ergebnisse bei der Sauerstoffversorgung zu erzielen. Alternativ kann bei einer Flussrate von 2 ml/min x g Leber eine Lösung, die 20 % Erythrozyten enthält, verwendet werden (CHEUNG et al., 1996).

7.1.2. Diskussion der Methoden

7.1.2.1. Apoptose und Nekrose

Unter dem Begriff der Apoptose versteht man den programmierten Zelltod. Zu diesem Begriff gehört morphologisch, dass nur einzelne, individuelle Zellen in einem sonst gesunden Organ absterben. Ihr Sterben beginnt mit einer Schrumpfung des Zellkerns, relativ spät kommt es zum Zerfall der Plasmamembran in viele Vesikel und so zur Auflösung der Zelle. Die DNA der betroffenen Zelle wird rasch abgebaut und bildet häufig Bruchstücke, die den Nucleosomen-assoziierten DNA-Teilen entsprechen. Die abgestorbenen Zellen beziehungsweise das aus ihnen stammende Material wird von benachbarten Makrophagen phagozytiert, wobei keine Entzündungsreaktionen und keine Antikörperbildung induziert werden. Biochemisch ist die Apoptose ein durch TNF, das Tumor-Suppressor-Protein p53, zytotoxische T-Zellen und beispielsweise Glucocorticoide induzierbarer, energieabhängiger Prozess mit gesteigerter RNA- und Proteinbiosynthese. Dies macht die Apoptose unterscheidbar von der Zellnekrose, die häufig mehrere benachbarte Zellen eines geschädigten Organs betrifft, indem es zur Zellschwellung und zum Verlust der Plasmamembranintegrität, aber erst relativ spät zum DNA-Abbau kommt.

Allerdings muss auch zur Kenntnis genommen werden, dass Nekrose und Apoptose Grundzüge und Mechanismen teilen können, so dass eine Unterscheidung zuweilen schwierig wird (JAESCHKE and LEMASTERS, 2003). Im Modell der vorliegenden Untersuchungen wurde die Morphologie der Zellen nach Markierung mit Höchst-Farbstoff beurteilt. In einer vorhergehenden in vitro Studie konnte gezeigt werden, dass die durch Höchst-Farbstoff markierte und durch ultraviolette, auflichtmikroskopisches Licht sichtbar gemachte Kondensierung und Fragmentierung von Kernchromatin in der Tat Apoptose anzeigen, und der bewährten Methode der Elektronenmikroskopie zur standardisierten Analyse von Apoptose durchaus ebenbürtig ist (KATSEN et al., 1998).

Im Rahmen der wissenschaftlichen Arbeiten, die sich mit dem Parenchymschaden nach Reperfusion befassen, stellt sich immer wieder die Frage nach der vorherrschenden Art des Zelltodes. Während einige Arbeiten von einer irrelevanten Anzahl apoptotischer Zellen nach Reperfusion berichten (GUJRAL et al., 2001), stellen andere Verfasser in ihren Arbeiten eine Apoptoserate von 17 % nach 24 Stunden kalter Konservierung und zweistündiger Reperfusion fest (EL-GIBALY et al., 2004). Bei der vorliegenden Untersuchung betrug die Apoptoserate unter gleichen Bedingungen zwischen 3 und 4%. Die Anzahl der apoptotischen

Zellen pro Gesichtsfeld lag im Mittel maximal zwischen 3 und 4. Bei der 48 Stunden Fastengruppe zeigte sich im Vergleich zu den anderen Gruppen sogar nur eine Apoptoserate von 1 und 2%. Dass diese Gruppe in der PAS-Färbung den niedrigsten Glykogengehalt aufwies, bestätigt, dass zur Induktion der Apoptose Glykogen von der Zelle als Energiequelle zur Synthese von ATP benötigt wird. Ist wenig Glykogen vorhanden, hat die Zelle wenig ATP und der wie oben beschriebene energieverbrauchende Prozess der Apoptose bleibt aus (PILKIS et GRANNER 1992; PALOMBO et al., 1988; SADAMORI et al., 1995; BOUDJEMA et al., 1991). Die Zellen gehen in Nekrose. Dies wird in der vorliegenden Studie unter anderem durch die massive Freisetzung von LDH in das Effluat nach 24 Stunden kalter Konservierung und 2-stündiger Reperfusion belegt.

Die Bestimmung der Transaminasen GOT, GPT sowie LDH in diesem Versuch, wie in anderen Untersuchungen, ist ein wichtiger Bestandteil zur Beurteilung des Gewebeschadens nach kalter Konservierung und Reperfusion (SMERKOVA et al., 2000). Wichtig dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich um ein in vitro Modell handelt, welches sich in einigen grundlegenden Faktoren von den in vivo Untersuchungen unterscheidet. So fehlen im Modell der isolierten Perfusion die Leukozyten und Blutplättchen, die die Induktion der Apoptose deutlich verstärken können (EIPEL et al., 2004).

Ein weiterer Marker zur Ermittlung des apoptotischen Zelltod ist die Aktivität des Enzyms Caspase-3. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Hemmung der Caspase-3 mit einer Abnahme des Gewebeschadens nach Konservierung und Reperfusion einhergeht (EL-GIBALY et al., 2004; CONTRERAS et al., 2004). Des weiteren können noch die Beurteilung der Vakuolisierung der Zelle, sowie der Endothelablösungen als Kriterium für einen bestehenden oder sich entwickelnden Zellschaden sein.

7.1.2.2. Galleproduktion

Zur Überprüfung der Funktion der Leberzelle wird in vielen Untersuchungen von unterschiedlichen Arbeitsgruppen der Gallefluss bestimmt (BOUDJEMA et al., 1991; NUR et al., 1995). Da die Galleflüssigkeit in vitalen Leberzellen produziert wird, lässt sich von der Produktionsmenge auf den Funktionszustand der Leberzelle schließen. In früheren Untersuchungen von Krustev et al. wurde herausgefunden, dass infolge von Nahrungskarenz in unterernährten Zellen die Zellorganellen hochgradig geschädigt und zerstört werden. Folge ist eine reduzierte bis aufgehobene Syntheseleistung der Zelle (KRUSTEV 1976). Diese Beobachtung konnte auch in dem hier diskutierten Modell nachvollzogen werden. Je länger gefastet wurde, desto schlechter war die Galleproduktion bei der Reperfusion. Interessanterweise wird die Galleproduktion in den Literaturstellen, die für die vorliegende Untersuchung von Belang waren, stets auf das Lebergewicht umgerechnet (SANKARY et al., 1991; MORGAN et al., MORGAN et al., 1991; LINDELL et al., 1996). Bezieht man sie aber auf das Gewicht der Lebern, die von Tieren einer Fastengruppe stammen, steht eine geringere Gallenmenge einem kleineren Organgewicht gegenüber. Das führt zu höheren Werten.

Da die Versuchstiere nach 48 Stunden Nahrungskarenz nicht relevant Gewicht verlieren, und eine entsprechende Gallesekretion benötigen, ist es empfehlenswert und eindeutiger, die Galleproduktion isoliert ohne Bezug auf das Lebergewicht zu betrachten. Durch diese Betrachtungsweise lassen sich eindeutiger Ergebnisse bezüglich der exkretorischen Leistungsfähigkeit einer Leber für das Gesamtergebnis erzielen. Eine Alternative, die nur schwer umsetzbar wäre, stellt eine Umrechnung der Werte auf die Anzahl der vitalen Leberzellen dar. So könnte man die tatsächliche Leistungsfähigkeit der einzelnen Zellen aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen exakt vergleichen und beurteilen.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung lassen erkennen, dass Nahrungskarenz, insbesondere bis zu 48 Stunden, keinen positiven Einfluss auf die Leber hat. Es hat sich vielmehr gezeigt, dass der Konservierungs- und Reperfusionsschaden verstärkt wird. Insbesondere bei den Tieren, die 48 Stunden vor der Explantation der Leber gefastet haben, wird deutlich, dass deren Organe denen der Tiere aus der 0-Stunden- beziehungsweise 12-Stunden-Gruppe unterlegen sind. Das äußert sich unter anderem in einem beträchtlich reduzierten Sauerstoffverbrauch sowie einer stark herabgesetzten Sauerstoffaufnahme der 48-Stunden Gruppe bereits nach 90 Minuten Reperfusion. Ferner produzierten die Lebern in dieser Gruppe wesentlich weniger Galleflüssigkeit, und zwar zu jedem Zeitpunkt der Reperfusion, und hatte einen im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erniedrigten portalvenösen Widerstand. Der Zellschaden war bei dieser Gruppe ebenfalls am höchsten, wie die hohen Werte für die Transaminasen insbesondere für die LDH und die histologische Auswertung belegen.

Diese Erkenntnis deckt sich mit Berichten in der Literatur. Hier gibt es Hinweise, dass Nahrungskarenz den Konservierungs- beziehungsweise Reperfusionsschaden verstärkt, weil dadurch der intrazelluläre Gehalt an Antioxidantien wie alpha-Tocopherol, Glutathion und Ascorbinsäure reduziert wird. Diesen Substanzen kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Bewältigung der oxidativen Schädigung von Membranfettsäuren zu, wie sie bei der Reperfusion durch entstehende Sauerstoffradikale verursacht werden kann (LIU et al., 1993; MORIKAWA et al., 1998; GRATTAGLIANO et al., 2000). Weiter werden die Mitochondrien, die für den Sauerstoffstoffwechsel der Zelle von erheblicher Bedeutung sind, durch längere Fastenperioden in ihrer Ultrastruktur geschädigt. Ferner wurden bei Lebern von nahrungskarenten Organismen deutlich erhöhte Werte für Serumtransaminasen festgestellt, wie sie im Rahmen von zellulären Leberschäden vorkommen (DOMENICALI et al., 2001). Histologisch zeigen sich bei diesen gefasteten Lebern ödematös geschwollene Zellen und Leukozyteninfiltrationen (LIU et al., 1993).

Diesen negativ zu beurteilenden Erkenntnissen steht die durch Nahrungskarenz begünstigte Inaktivierung von Kupfferzellen gegenüber. Dieser Zellpopulation wird eine entscheidende Bedeutung für die Induktion des Reperfusionsschaden zugeschrieben.

So werden durch aktivierte Kupfferzellen vermehrt Cytokine, wie TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) freigesetzt.

Diese Cytokine bedingen die Freisetzung von Gewebefaktoren an Endothelzellen, die die vaskuläre Permeabilität erhöhen und die koagulative Aktivität und die Bindung der Thrombozyten in Sinusoiden steigern. Dies führt in der Konsequenz zu einem ausgeprägten Reperfusionsschaden (SANKARY et al., 1995; SHIINO et al., 1998; ISHIKAWA et al., 1998; UCHIDA et al., 2000; SUN et al., 2001), der sich in der vorliegenden Untersuchung deutlich in der Vakuolisierung der Hepatozyten, der Endothelablösung in Venolen und der Caspase-3 Expression widerspiegelt. Ferner wurde festgestellt, dass Zellen von gefasteten Lebern weniger Glykogen enthalten. Diesbezüglich besteht in der Literatur Einigkeit. Uneinigkeit besteht indes über die Bedeutung, die dieser niedrige Glykogengehalt für die Funktion der Leber hat. Einerseits wird Glykogen insbesondere in der kritischen Phase der Reperfusion als wichtiger Baustein für die Gewinnung von ATP gesehen, (VREUGDENHIL et al., 1993; SADAMORI et al., 1995; MORIMOTO et al., 1996; CHAIB et al., 2003) andererseits soll der Glykogengehalt keinen Einfluss auf die Vitalität der Leberzellen haben. In Versuchen wurde beobachtet, dass auch Zellen mit sehr niedrigem Glykogengehalt in ihrer Vitalität nach Reperfusion unbeeinflusst blieben (SUMIMOTO et al., 1996).

Des Weiteren sind die für die Energiegewinnung der Leberzelle wichtigen Enzymsysteme des Zitratzyklus, wie der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, bei Zellen von gefasteten Lebern quantitativ reduziert. Auch darin ist eine Ursache für den niedrigeren Energiegehalt dieser Zellen zu sehen (CHUNG et al., 2001; HUAG et al., 2003; SHIMIZU et al., 2003). Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Substitution von Glukose vor Explantation der Leber ein um 240 % höherer Glykogengehalt der Leber erreicht werden kann, hierdurch aber keine Veränderung des Funktionszustands der Leber nach Reperfusion festgestellt werden konnte (SUMIMOTO et al., 1993; SUMIMOTO et al., 1996). Andere Arbeitsgruppen haben nach Glukosesubstitution vor der Lebertransplantation jedoch eine höhere Überlebensrate der Empfängertiere ermittelt (LINDELL et al., 1996). Dabei ist es von Bedeutung, ob die Glukose einem fastenden oder nicht fastenden Tier substituiert wird.

Bei Nichtfasten hat Glukose keine Auswirkung auf die Vitalität der Leberzelle nach Reperfusion. Bei fastenden Tieren zeigt die Glukose einen positiven Einfluß auf die Zellvitalität nach Reperfusion. Dies liegt an dem höheren intrazellulären Glukosegehalt der Zellen im Gegensatz zu gefasteten Zellen ohne Glukose, bei denen der Glukoseeinstrom bereits kurz nach Beginn der Reperfusion deutlich abnimmt (LE COUTEUR et al., 1994). Ein weiterer Indikator zur Beurteilung des Funktionszustands der Leber ist der parenchymatöse Zellschaden. Die Freisetzung der Lebertransaminasen geben Aufschluss über das Ausmaß des Schadens.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass insbesondere bei den Lebern aus der 48-Stunden Fastengruppe die Werte für die Transaminasen und im besonderen die für die LDH erhöht waren. Ähnliches wird in weiten Teilen der Literatur beschrieben. Hier wurde ebenfalls ein Anstieg der Transaminasen beobachtet, der teilweise sogar signifikant war. Die Fastendauer wird dabei zwischen 12 und 72 Stunden angegeben (BOUDJEMA et al., 1990; MORGAN et al., 1991; SUN et al., 2001; ARNAULT et al., 2002). Im Gegensatz dazu stehen die Erkenntnisse der Arbeitsgruppe um Lindell. Diese fand heraus, dass Lebern von fastenden Spendern eine höhere Überlebensrate haben als Organe, die von Spendern stammen, die nicht gefastet hatten. In der Tat zeigten bei dieser Untersuchung die Organe bessere Ergebnisse, die von Spender stammten, die eine Nahrungskarenz von 96 Stunden eingehalten hatten. Bei Organen von Spender mit kürzerer Nahrungskarenz waren dagegen keine besseren Ergebnisse im Vergleich zu Organen von Spendern ohne Nahrungskarenz zu erzielen.(LINDELL et al., 1996).

Auch die Arbeitsgruppe um Sumimoto beschrieb vergleichbare Ergebnisse. Fasten zwischen 24 und 72 Stunden steigert die Anzahl an vitalen Leberzellen nicht. 96 Stunden und länger andauerndes Fasten hat einen guten Einfluss auf die Anzahl der vitalen Leberzellen. Allerdings ist diese Anzahl wieder von der Dauer der Konservierung abhängig. Bei Versuchen der Gruppe Sumimoto betrug die Konservierungsdauer zwischen 30 und 44 Stunden. Auffällig war, dass bei der nichtfastenden Gruppe die Transaminasen nach 30 und 44 Stunden am höchsten waren (SUMIMOTO et al., 1993; SUMIMOTO et al., 1994) Diese Ergebnisse werden auch von der Arbeitsgruppe um Nishihara bestätigt. Dessen Arbeitsgruppe, bei der die Fastendauer 72 Stunden und die Konservierungsdauer 30 Stunden betrug, fand heraus, dass die Fastenlebern bezüglich der Transaminasen im Effluat die besseren Ergebnisse aufwiesen (NISHIHARA et al., 1996).

Ähnlich kontrovers müssen die Ergebnisse bei den apoptotischen Zellschäden diskutiert werden. Im Fall der vorliegenden Untersuchung hat die prozentuale Auswertung der apoptotischen Zellen im Durchschnitt einen Prozentsatz zwischen 0 und 3 Prozent ergeben. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Tessitore, die herausgefunden hat, dass durch Fasten Apoptose induziert wird. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen bleibt mit Werten bis zu 1 Prozent insgesamt aber niedrig (TESSITORE et al., 1999).

Andere Arbeitsgruppen berichten von gegensätzlichen Ergebnissen. Dort wurden Apoptoseraten zwischen 10 und 70 Prozent festgestellt (EL-GIBALY et al., 2004). Um in der vorliegenden Arbeit bei der auflichtmikroskopischen Betrachtung eventuelle Verfälschungen durch eine erhöhte Anzahl an sichtbaren Zellen bei gefasteten Lebern, die über weniger Glykogen verfügen, zu vermeiden, wurden die apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld bestimmt. Hierbei bestätigte sich jedoch das zuvor ermittelte Ergebnis. Auffällig war auch hier, dass bei den 48 Stunden gefasteten Lebern die Anzahl an Apoptosen geringer war als bei denen der 12 Stunden Fastengruppe. Eine Ursache ist in einem niedrigeren Energiegehalt der Zellen zu sehen. Für den energieverbrauchenden Prozess der Apoptose steht keine Energie mehr zur Verfügung (JAESCHKE et al., 2003).

Einigkeit herrscht dagegen bezüglich der Ergebnisse des Parameters Galleproduktion. Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung wird durchweg in der herangezogenen Literatur bestätigt. Stets war der gemessene Gallefluss in vivo oder in vitro bei Lebern von Tieren, die eine längere Fastenperiode durchgemacht hatten, geringer als bei Tieren mit freiem Nahrungszugang. Weiter wurde in der Literatur dargestellt, dass kurzfristiges Fasten bis zu 24 Stunden keinen negativen Einfluß auf die Galleproduktion hat (SANKARY et al., 1991; MORGAN et al., MORGAN et al., 1991; LINDELL et al., 1996). In dem hier diskutierten Modell war bereits nach 12 Stunden Fasten die Produktionsleistung der Lebern eingeschränkt. Von einer vermehrten Galleproduktion berichtet demgegenüber die Arbeitsgruppe Sumimoto (SUMIMOTO et al., 1993). Hier sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die vorgenannten Autoren die Galleproduktion stets in das Verhältnis zum Lebergewicht gesetzt haben. Kritisch bedacht werden sollte in diesem Zusammenhang, dass die Galleproduktion am ehesten nicht von dem Organgewicht abhängt, sondern von der Anzahl der vitalen Parenchymzellen.

Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen zeigt sich auch bei den in dieser Untersuchung ermittelten Ergebnisse für Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffaufnahme. Es zeigt sich, dass die Sauerstoffaufnahme und der Sauerstoffverbrauch der Hepatozyten bei lange gefasteten Organen, insbesondere nach längerer Perfusionszeit stark abfällt (FATH et al., 1991; LIU et al., 1993; TANIGAWA et al., 1999).

Gleiches gilt für die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bezüglich des Kalium-Efflux. In Referenzartikeln wird bestätigt, dass der Kalium-Efflux bei Lebern, die einer Gruppe mit längerer Fastendauer zugeordnet waren, größer war als bei Lebern von Tieren, die keiner Fastengruppe zugeordnet waren. Ferner wird festgestellt, dass dies als Zeichen für einen ausgeprägten Zellschaden gewertet werden muss (TANIGAWA et al., 1999).

7.3. Schlussfolgerung

Bei ausgewogener Betrachtung des hier diskutierten in vitro Modells der perfundierten Rattenleber ist deutlich geworden, dass Fasten über 48 Stunden vor der Explantation keinen Nutzen für die Reperfusionphase bringt. Es ist im Gegenteil schädlich, da diese Lebern im Verlauf der Reperfusion in ihrer Funktion stark eingeschränkt waren. Das wurde durch Sauerstoff- und Elektrolytstoffwechsel, durch Galleproduktion, durch Auswertung der Transaminasen und Apoptosen sowie der histomorphologischen Parameter eindeutig belegt. Darüber hinaus kann man sagen, dass Fasten über 12 Stunden vor der Explantation keinen großen Nachteil bei der Reperfusionphase darstellt. Organe dieser Tiere hatten zwar insgesamt schlechtere Werte als die Lebern von Tieren mit freiem Nahrungszugang. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

Fasten stellt also nach diesen Beobachtungen keine Möglichkeit dar eine Funktionseinschränkung oder einen völligen Funktionsverlust wie bei der primary non function zu verhindern. Ein angemessener Ernährungszustand des Spenderorganismus ist demzufolge für das Gelingen einer Lebertransplantation unabdingbar.

8. Literatur

1. Adam R, McMaster P, O'Grady JG, Castaing D, Klempnauer JL, Jamieson N, Neuhaus P, Lerut J, Salizzoni M, Pollard S, Muhlbacher F, Rogiers X, Garcia Valdecasas JC, Berenguer J, Jaeck D, Moreno Gonzales E (2003) Evolution of liver transplantation in Europe: report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transpl* 9: 1231-43
2. Alpers DH, Sabesin SM, White HM (1993) Fatty liver: biochemical and clinical aspects. *Dis Liver*: 825-855
3. Aminali A, Kehrer G, Grossman, Richter J, Bretschneider HJ (1992) Morphological investigation of the porcine liver directly following preservation with Euro-Collins, University of Wisconsin and Bretschneider's HTK solution. *Langenbecks Arch Chir* 377: 81-88
4. Arnault I, Bao YM, Dimicoli JL, Lemoine A, Sebagh M, Adam R (2002) Combined effects of fasting and alanine on liver function recovery after cold ischemia. *Transplant Int* 15: 89-95
5. Bellentani S, Tiribelli C, Saccoccio G, Sodde M, Fratti N, De Martin C, Christianini G (1994) Prevalence of chronic liver disease in the general population of northern Italy: the Dionysos Study. *Hepatology* 20: 1442-9
6. Belzer FO, Southard JH (1988) Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45: 673-6
7. Boudjema K, Lindell SL, Belzer FO, Southard JH (1991) Effects of method of preservation on functions of livers from fed and fasted rabbits. *Cryobiology* 28: 227-36
8. Boudjema K, Lindell SL, Southard JH, Belzer FO (1990) The effects of fasting on the quality of liver preservation by simple cold storage. *Transplantation* 50: 943-8
9. Bradford BU, Marotto M, Lemasters JJ, Thurman RG (1986) New simple models to evaluate zone-specific damage due to hypoxia in the perfused liver: time course and effect of nutritional state. *J Pharmacol Exp Ther* 236: 263-268

-
10. Bretschneider HJ, Helmchen U, Kehrer G (1988) Nierenprotektion. *Klin Wochenschrift* 66: 817-827
 11. Busutil RW, Tanaka K (2003) The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl* 9: 651-63
 12. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferraresso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P (1997) The protective effects of L-arginine after liver ischemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 183: 477-85
 13. Chaib S, Charrueau C, Neveux N, Nakib S, Chaumeil JC, Cynober L, De Bandt JP (2003) Effect of apoE/ATP-containing liposomes on hepatic energy state. *Liver Int* 23: 379-385
 14. Cheung K, Hickman PE, Potter JM, Walker NI, Jericho M, Haslam R, Roberts MS (1996) An optimized model for rat liver perfusion studies. *J Surg Res* 66: 81-89
 15. Chung (2001) Lack of Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) Induction in the Rat Liver by Starvation without Coprophagy. *DMD* 29: 213-216
 16. Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, Bilbao G, Anthony Thompson J, Eckhoff DE (2004) Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice. *Surgery* 136: 390-400
 17. Domenicali M, Caraceni P, Vendemiale G, Grattagliano I, Nardo B, Dall'Agata M, Santoni B, Trevisani F, Cavallari A, Altomare E, Bernardi M (2001) Food deprivation exacerbates mitochondrial oxidative stress in rat liver exposed to ischemia-reperfusion injury. *J Nutr* 131: 105-110
 18. Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B (2004) Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: 769-76

-
19. El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, Vollmar B (2004) Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necroptosis. *Hepatology* 39: 1553-62
20. Fath J, Parker B, Sorensen V, Gaymer J, Macdonald M, Warren R, Tkach D, Fernandez F, Block D, Konstantinides F, Bivins B (1991) Fasted state impedes recovery of porcine hepatic oxygen consumption after warm hepatic ischemia. *Surgery* 110: 742-52
21. Fevery J (1998) Liver transplantation: problems and perspectives. *Hepatogastroenterology* 45: 1039-44
22. Grattagliano I, Vendemiale G, Caraceni P, Domenicali M, Nardo B, Cavallari A, Trevisani F, Bernardi M, Altomare E (2000) Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. *J Nutr* 130: 2131-6
23. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H (2001) Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology* 33: 397-405
24. Howden B, Jablonski P, Grossman H, Marshall VC (1989) The importance of hepatic artery in the liver transplantation. *Transplantation* 47: 428-431
25. Huang B, Wu P, Popov KM, Harris RA (2003) Starvation and diabetes reduce the amount of pyruvate dehydrogenase phosphatase in rat heart and kidney. *Diabetes* 52: 1371-1376
26. Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, Bilodeau M (2004) Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 39: 1110-9
27. Ishikawa T, Yagi T, Sadamori H, Ishine N, Sasaki H, Oishi M, Tanaka N (1998) Kupffer cell activation in the survival discrepancy between liver grafts from enterally and parenterally fed donors. *Transplant Int* 11: 410-6

-
28. Jaeschke H (1991) Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem Biol Interact* 79: 115-136
29. Jaeschke H, Lemasters JJ (2003) Apoptosis Versus Oncotic Necrosis in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Gastroenterology* 125: 1246-1257
30. Katsen AD, Vollmar B, Mestres-Ventura P, Menger MD (1998) Cell surface and nuclear changes during TNF-alpha-induced apoptosis in WEHI 164 murine fibrosarcoma cells. A correlative light, scanning, and transmission electron microscopical study. *Virchows Arch* 433: 75-83
31. Keefe EB (2000) Liver transplantation at the millenium. Past, present, and future. *Clin Liver Dis* 4: 241-55
32. Keefe EB (2001) Liver transplantation: current status and novel approaches to liver replacement. *Gastroenterology* 120: 749-62
33. Kohlhaw K, Schwarz R, Lubke P, Hartwig T, Berr F, Hauss J (2000) Clinical studies in liver transplantation. *Chirurg* 71: 667-75
34. Kramer L (2004) Acute liver failure. *Wien Klin Wochenschr* 116: 67-81
35. Krustev LP (1976) Cell Autophagy of the Liver in Starvation and Undernutrition. *Bibl Nutr Dieta* 23: 145-154
36. Le Couteur DG, Rivory LP, Pond SM (1994) Glucose transport and hypoxia-reoxygenation injury in the perfused rat liver. *J Gastroenterol Hepatol* 9: 385-390
37. Lindell SL, Hansen T, Rankin M, Danielewicz R, Belzer FO, Southard JH (1996) Donor nutritional status-a determinant of liver preservation injury. *Transplantation* 61: 239-247
38. Liu PT, Symons AM, Howarth JA, Boulter PS, Parke DV (1994) Studies in surgical trauma: oxidative stress in ischämia-reperfusion of rat liver. *Clin Sci* 86: 453-60

-
39. Mair W, Goymer P, Pletcher SD, Partridge L (2003) Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science* 301: 1731-1733
40. Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B (1999) Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepato-Gastroenterology* 46: 1452-1457
41. Mor E, Klintmalm GB, Gonwa TA, Solomon H, Holman MJ, Gibbs JF, Watemberg I, Goldstein RM, Husberg BS (1992) The use of marginal donors for liver transplantation. A study of 365 liver donors. *Transplantation* 53: 383-6
42. Morgan GR, Sanabria JR, Clavien PA, Phillips MJ, Edwards C, Harvey PRC, Strasberg SM (1991) Correlation of donor nutritional status with sinusoidal lining cell viability and liver function in the rat. *Transplantation* 51: 1176-1183
43. Morikawa N, Suematsu M, Kyokane T, Goda N, Kumamoto Y, Okitsu T, Ishimura Y, Kitajima M (1998) Discontinuous Total Parenteral Nutrition Prevents Postischemic Mitochondrial Dysfunction in Rat Liver. *Hepatology* 28: 1289-1299
44. Morimoto Y, Kamiike W, Nishida T, Hatanaka N, Shimizu S, Huang TP, Hamada E, Uchiyama Y, Yoshida Y, Furuya E, Matsuda H (1996) Improvement of rat liver graft function by insulin administration to donor. *Gastroenterology* 111: 1071-1080
45. Nashan B, Luck R, Becker T, Grannas G, Strassburg C, Schneider A, Melter M, Strassburg A, Klempnauer J (2002) Expansion of the donor pool in liver transplantation: the Hannover experience 1996-2002. *Clin Transpl* 2002: 221-8
46. Nishihara M, Sumimoto R, Asahara T, Fukuda Y, Southard JH, Dohi K (1996) Effect of Donor Fasting on Survival of Pancreas and Heart Grafts after Warm Ischemia. *Hiroshima J Med Sci* 45: 93-97
47. Nur T, Sela I, Webster NJG, Madar Z (1995) Starvation and Refeeding Regulate Glycogen Synthase Gene Expression in Rat Liver at the Posttranscriptional Level. *J Nutr* 125: 2457-2462

-
48. Oreopoulos GD, Wu H, Szaszi K, Fan J, Marshall JC, Khadaroo RG, He R, Kapus A, Rotstein OD (2004) Hypertonic preconditioning prevents hepatocellular injury following ischemia/reperfusion in mice: a role for interleukin 10. *Hepatology* 40: 211-20
49. Palombo JD, Hirschberg Y, Pomposelli JJ, Blackburn GL, Zeisel SH, Bistrian BR (1988) Decreased loss of liver adenosine triphosphate during hypothermic preservation in rats pretreated with glucose: implication for organ donor management. *Gastroenterology* 95: 1043-9
50. Palombo JD, Pomposelli JJ, Hirschberg Y, Blackburn GL, Bistrian BR (1989) Glycolytic support of adenine nucleotides in rat liver flush-preserved with UW or Collins'II. *Transplantation* 48: 901-905
51. Pichlmayr R, Bretschneider HJ, Kirchner E, Ringe B, Lamesch P, Gubernatis G, Hauss J, Niehaus KJ, Kaukemüller J (1988) Ex-situ-Operation an der Leber – eine neue Möglichkeit in der Leberchirurgie. *Langenbecks Arch Chir* 373: 106-112
52. Pilgis SJ, Granner DK (1992) Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54: 885-909
53. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechte SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M (1993) Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation—a multivariate analysis. *Transplantation* 55: 807-13
54. Post S, Palma P, Rentsch M, Gonzales AP, Menger MD (1993) Differential impact of Carolina rinse and University of Wisconsin solutions on microcirculation, leukocyte adhesion, Kupffer cell activity and biliary excretion after liver transplantation. *Hepatology* 18: 1490-1497
55. Puhl G, Schaser KD, Pust D, Kohler K, Vollmar B, Menger MD, Neuhaus P, Settmacher U (2004) The delay of rearterialization after initial portal reperfusion in living donor liver transplantation significantly determines the development of microvascular graft dysfunction. *J Hepatology* 41: 299-306

-
56. Que X, Debonera F, Xie J, Furth EE, Aldeguer X, Gelman AE, Olthoff KM (2004) Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model. *J Surg Res* 116: 262-8
57. Roberts S, Miller J, Pineiro L, Jennings L (2003) Total parenteral nutrition vs oral diet in autologous hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* 32: 715-721
58. Rosen HR, Shackleton CR, Martin P (1996) Indications for and timing of liver transplantation. *Med Clin North Am* 80: 1069-102
59. Sadamori H, Tanaka N, Yagi T, Inagaki M, Orita K (1995) The effects of nutritional repletion on donors for liver transplantation in pigs. *Transplantation* 60: 317-21
60. Sankary H, Foster P, Brown E, Bhattacharyya A, Williams J (1991) Relevance of the nutritional status of donors in viability of transplanted hepatic allografts. *Transpl* 54: 170-172
61. Sankary HN, Chong A, Foster P, Brown E, Shen J, Kimura R, Rayudu G, Williams J (1995) Inactivation of Kupffer cells after prolonged donor fasting improves viability of transplanted hepatic allografts. *Hepatology* 22: 1236-42
62. Schilling M, Redaelli C, Friess H, Laeffer J, Büchler M (1996) Temperature dependence of proton buffering capacity of HTK, Euro-Collins and UW solution. *Transplant Proc* 28: 343-344
63. Selzner N, Selzner M, Jochum W, Clavien PA (2003) Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism. *Hepatology* 39: 55-61
64. Settmacher U, Theruvath T, Pascher A, Neuhaus P (2004) Living-donor liver transplantation European experiences. *Nephrol Dial Transplant* 19: 16-21
65. Shiino Y, Nakamura J, Okamoto T, Ishii Y, Inagaki Y, Aoki T (1998) Improved quality of fatty liver allografts by starvation in rats. *Transpl Proceedings* 30: 3294-3295

-
66. Shimzu M, Matsushita R, Matsumoto Y, Fukuoka M (2003) 4'-Hydroxylation of Flurbiprofen by Rat Liver Microsomes in Fasting and Feeding Conditions. *Biol Pharm Bull* 26: 1448-1454
67. Skullman S, Ihse I, Larsson J (1990) Influence of malnutrition on regeneration and composition of the liver in rats. *Acta Chir Scand* 156: 717-722
68. Smerkova R, Vajdova K, Kukan M, Ulicna O, Lutterova M, Wsolova L, Horecky J (2000) A rapid, simple, and reliable cost-effective method for screening liver preservation solutions in the rat. *Transplantation* 70: 430-435
69. Spiegel HU, Schleimer K, Kranz D, Oldhafer KJ (1998) Organ preservation with EC, HTK, and UW solution in orthotopic liver transplantation in syngenic rats. Part I: Functional parameters. *J Invest Surg* 11: 49-56
70. Sterling RK, Fisher RA (2001) Liver transplantation. Living donor, hepatocyte, and xenotransplantation. *Clin Liver Dis* 5: 431-60
71. Straatsburg I, Abrahamse SL, Song SW, Hartmann RJ, Van Gulik TM (2002) Evaluation of rat liver apoptotic and necrotic cell death after cold storage using UW, HTK, and Celsior. *Transplantation* 74: 458-464
72. Strasberg SM, Howard TK, Molmenti EP, Hertl M (1994) Selecting the donor liver: risk factors for poor function after orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 20: 829-38
73. Sumimoto R, Jamieson NV, Wake K, Kamada N (1989) 24-hour rat liver preservation using UW solution and some simplified variants. *Transplantation* 48: 1-5
74. Sumimoto R, Southard JH, Belzer FO (1993) Livers from fasted rats acquire resistance to warm and cold ischemia injury. *Transplantation* 55: 728-32
75. Sumimoto R, Fukuda Y, Gambiez L, Oshiro H, Dohi K, Southard JH, Belzer FO (1994) Successful 48-h liver preservation by controlling nutritional status of donor and recipient. *Transplantation* 7: 499-502

-
76. Sumimoto R, Fukuda Y, Nishihara M, Asahara T, Dohi K (1996) Liver glycogen in fasted rat livers does not improve outcome liver transplantation. *Transpl Int* 9: 541-5
77. Sun X, Kimura T, Kobayashi T, Noriki S, Imamura Y, Fukuda M, Yamaguchi A (2000) Viability of liver grafts from fasted donor rats: relationship to sinusoidal endothelial cell apoptosis. *J Hepatology Pancreat Surg* 8: 268-273
78. Tanigawa K, Kim YM, Lancaster JR, Zar HA (1999) Fasting augments lipid peroxidation during reperfusion after ischemia in the perfused rat liver. *Crit Care Med* 27: 401-406
79. Tessitore L, Tomasi C, Greco M (1999) Fasting-induced apoptosis in rat liver is blocked by cycloheximide. *Eur J Cell Biol* 78: 573-579
80. Trotter JF (2000) Expanding the donor pool for liver transplantation. *Curr Gastroenterol Rep* 2: 46-54
81. Uchida Y, Tamaki T, Tanaka M, Konoeda Y, Kaizu T, Takahashi Y, Kakita A, Kawamura A (2000) De Novo Protein Synthesis Induced by Donor Nutritional Depletion Ameliorates Cold Ischemia and Reperfusion Injury in Rat Liver. *Transpl Proceedings* 32: 1657-1659
82. Vreugdenhil PK, Marsh DC, Mack VE, Belzer FO, Southard JH (1993) Effect of fasting on hepatocytes cold stored in University of Wisconsin solution for 24 hours. *Transplantation* 56: 1454-1459
83. Wolff M, Kalff JC, Schwarz NT, Lauschke H, Minor T, Tolba RH, Hirner A (2003) Liver transplantation in Germany. *Zentralbl Chir* 128: 831-41

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für klinische und experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes bedanken. Durch die gute Zusammenarbeit und tatkräftige Mitarbeit ist mir die Erstellung der vorliegenden Arbeit erleichtert worden.

Besonderer Dank gebührt Herrn Professor Dr. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für klinische und experimentelle Chirurgie der medizinischen Fakultät für die Überlassung des Themas meiner Arbeit. Professor Dr. Menger stand mir stets hilfreich mit konstruktiver Kritik und abstrakter Analyse zur Seite.

Meinem Betreuer Dr. Amr El-Gibaly sage ich ebenfalls Dank. Er war mir bei der Anleitung und Durchführung meiner Versuche eine wertvolle Hilfe. Bei der Auswertung der Ergebnisse und bei deren Analyse gab er mir gute Ratschläge. Präzision und Genauigkeit waren mir ein Vorbild.

Mein Dank gilt auch Frau Claudia Scheuer, Biologin und wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut. Auch sie war durch ihr organisatorisches Talent eine wesentliche Stütze während meiner Zeit im Labor.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Janine Becker, Frau Christina Marx und insbesondere Frau Elisabeth Gluding, den Medizinisch Technischen Assistentinnen des Instituts für deren Unterstützung im Labor.

Dank auch dem Team der Tierpflege des Instituts. Zu nennen sind da insbesondere Frau Kati Jordan und Herr Eniz Kabiljagic. Sie sorgten durch Organisationstalent und Weitblick stets für einen reibungslosen Ablauf der Versuche.

Meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums großzügig unterstützt haben sage ich an dieser Stelle ganz besonders lieben Dank.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Nachname: Huth
Vorname: Henning
Geschlecht: männlich
Geburtstag: 11.08.1977
Geburtsort: Münster
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: römisch-katholisch
Eltern: Dr. med. dent. Marianne Huth
Dr. med. Hanno Huth
Adresse: Bökelstraße 121
41063 Mönchengladbach
Telefon: 0 21 61 / 2 30 78
E-Mail: HenningHuth@gmx.de

Sprachen

Deutsch: Muttersprache
Englisch: Fließend
Französisch: Grundkenntnisse

Schulische Laufbahn

1997 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife
1988-1997 Gymnasium, Mönchengladbach
1984-1988 Grundschule, Mönchengladbach

Wehrdienst

1997-1998 Wehrdienst in Burg und Mönchengladbach

Studium und Qualifikationen

2005 Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin

2005 3. medizinisches Staatsexamen an der RWTH Aachen

2004 Praktisches Jahr am evangelischen Krankenhaus Bethesda, Mönchengladbach, Akademisches Lehrkrankenhaus der RWTH Aachen

Weiterführung des Studiums der Humanmedizin an der RWTH Aachen

2. medizinisches Staatsexamen an der Universität des Saarlandes

2003

Famulatur in der Medizinischen Klinik des Queen Elizabeth Hospital King`s Lynn England

2002

1. medizinisches Staatsexamen an der Universität des Saarlandes
Famulaturen in der anästhesiologischen und chirurgischen Abteilung des evangelischen Krankenhauses Bethesda Mönchengladbach

2001-2004

Moniteur im anatomischen Präparierkurs

2001

Ärztliche Vorprüfung an der Universität des Saarlandes
Famulatur in der Medizinischen Klinik des Kamillianer Krankenhauses Mönchengladbach

1998-2004

Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes