

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE  
DIREKTOR: PROF. DR. HANS J. SCHLITT  
LEITER EXPERIMENTELLE CHIRURGIE: PROF. EDWARD K. GEISSLER, PHD

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Der Einfluss im Mausmodell identifizierter  
T-Zellsubpopulationen und marginaler Organe  
auf den frühen Ischämie-Reperfusionsschaden  
der humanen Lebertransplantation**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
**Anja Gröll**

**2017**

**Dekan:**

**Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert**

**1. Berichterstatter:**

**Prof. Edward K. Geissler, PhD**

**2. Berichterstatter:**

**Prof. Dr. Thomas Hehlhans**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**28. September 2017**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Indikationen zur Lebertransplantation.....	2
1.2 Allokation von Organen und Problematik des Organmangels.....	3
1.3 Der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden.....	6
1.3.1 Funktion und Aufbau des hepatobiliären Systems.....	6
1.3.2 Aufgaben des Immunsystems.....	7
1.3.3 Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens.....	10
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>17</b>
<b>3 Material</b> .....	<b>19</b>
3.1 Mausstämme.....	19
3.2 Patientendaten und Leberbiopsien.....	19
3.3 Geräte und sonstige Materialien.....	20
3.4 Operationsmaterialien.....	21
3.5 Verbrauchsmaterialien.....	22
3.6 Chemikalien und sonstige Stoffe.....	24
3.7 Kits.....	26
3.8 Antikörper.....	26
3.9 Primer.....	27
3.10 Puffer und Lösungen.....	27
3.11 Computersoftware und Datenbanken.....	28
<b>4 Methoden</b> .....	<b>29</b>
4.1 Methoden im Tiermodell.....	29
4.1.1 Tiermodell des Ischämie-Reperfusionsschadens.....	29
4.1.2 Laborchemische Diagnostik.....	31
4.1.2.1 GPT-Assay.....	31
4.1.3 Leberaufarbeitung.....	32
4.1.4 Histologische Färbungen.....	35
4.1.4.1 HE-Färbung von Paraffinschnitten.....	36
4.1.4.2 Immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten.....	37
4.1.5 Genexpressionsanalyse.....	38
4.1.5.1 Messenger-RNA-Isolierung und reverse Transkription.....	38
4.1.5.2 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.....	40

4.1.6	Enzymimmunoassay.....	43
4.1.6.1	TNF- $\alpha$ .....	43
4.1.6.2	IL-17A .....	45
4.1.7	Durchflusszytometrie .....	47
4.1.8	Statistische Auswertung .....	50
4.2	Methoden der klinischen Studie.....	51
4.2.1	Datenerfassung .....	51
4.2.1.1	Spenderdaten .....	51
4.2.1.2	Empfängerdaten .....	51
4.2.2	Histologische Färbungen .....	52
4.2.2.1	HE-Färbung von Paraffinschnitten .....	52
4.2.2.2	Immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten .....	52
4.2.3	Laborchemische Diagnostik.....	53
4.2.4	Genexpressionsanalyse .....	54
4.2.4.1	Messenger-RNA-Isolierung und reverse Transkription .....	54
4.2.4.2	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion.....	55
4.2.5	Statistische Auswertung .....	56
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
5.1	Ergebnisse des partiellen warmen IRS im Tiermodell .....	59
5.1.1	Der partielle warme IRS im Tiermodell .....	59
5.1.2	Immunzellinfiltration im Zusammenhang mit dem IRS .....	60
5.1.3	Zytokine und Transkriptionsfaktoren des IRS im Tiermodell.....	62
5.1.4	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK1.1 <sup>-</sup> CD27 <sup>-</sup> $\gamma$ $\delta$ TCR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> - und CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen als Effektorzellen des IRS .....	65
5.2	Ergebnisse des IRS der humanen Lebertransplantation .....	68
5.2.1	Häufigkeit des histopathologischen IRS.....	69
5.2.2	Einfluss der Spendercharakteristika auf den IRS.....	72
5.2.2.1	Basischarakteristika .....	72
5.2.2.2	Vorerkrankungen und Lebensstil .....	73
5.2.2.3	Laborchemische Parameter .....	74
5.2.2.4	Bedeutung der Allokation marginaler Organe .....	75
5.2.3	Empfängercharakteristika .....	78
5.2.3.1	Basischarakteristika .....	78
5.2.3.2	Grunderkrankungen.....	79
5.2.3.3	Allokationskriterien.....	80

5.2.3.4	Abstoßungsreaktionen und Re-Lebertransplantationen .....	81
5.2.3.5	Überlebensdaten .....	82
5.2.4	Laborchemische Verläufe lebertransplantiertter Patienten .....	87
5.2.4.1	GPT, GOT und GLDH.....	88
5.2.4.2	Bilirubin, $\gamma$ -GT und AP .....	92
5.2.4.3	Faktor V und Laktat.....	94
5.2.5	Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse.....	95
5.2.5.1	Infiltration CD3 <sup>+</sup> -Zellen.....	96
5.2.5.2	Exemplarische Darstellung der Infiltration $\gamma\delta$ TCR <sup>+</sup> -Zellen.....	98
5.2.6	Bedeutung TBX-21 <sup>-</sup> RORc <sup>+</sup> TCR $\gamma$ <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen beim humanen IRS.....	100
5.2.6.1	mRNA-Expressionslevel von CD3 .....	101
5.2.6.2	mRNA-Expressionslevel von TNF- $\alpha$ und CXCL-1 .....	102
5.2.6.3	mRNA-Expressionslevel von TBX-21, RORc und TCR $\gamma$ .....	105
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>111</b>
6.1	Der partielle warme IRS im Tiermodell .....	112
6.2	Der IRS im Rahmen der humanen Lebertransplantation .....	118
6.2.1	Bedeutung des frühen IRS im menschlichen Organismus.....	118
6.2.2	Einfluss von Spenderfaktoren auf den IRS .....	120
6.2.3	Rolle der Empfängercharakteristika im Hinblick auf den IRS.....	125
6.2.4	Bedeutung der laborchemischen Verläufe .....	129
6.2.5	Bedeutung der Infiltration CD3 <sup>+</sup> - und $\gamma\delta$ TCR <sup>+</sup> -Zellen.....	131
6.2.6	Diskussion der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse .....	133
6.2.7	$\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext anderer Erkrankungen .....	137
6.3	Ausblick.....	143
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>147</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>173</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>175</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>177</b>
<b>Veröffentlichungen .....</b>		
<b>Danksagung .....</b>		
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>		

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
Ap	Aktivatorprotein
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2-associated X, apoptosis regulator
BMI	Body mass index
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CINC	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant
CK	Creatine kinase
CKMB	Creatine kinase muscle-brain
C <sub>p</sub>	Crossing point
C <sub>T</sub>	Cycle threshold
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
DAMP	Danger-associated molecular pattern
DNA	Deoxyribonucleic acid
DN	Doppelt negativ
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECD	Extended criteria donor
Egr	Early growth response
ELAS	Eurotransplant liver allocation system
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELTR	European Liver Transplant Registry
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
EVG	Elastica van Gieson
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSc	Forward scatter
γ-GT	γ-Glutamyltransferase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA	Guanin-Adenin-Thymin-Adenin
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
Gp	Glykoprotein
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Gro	Growth-regulated oncogene
HE	Hämalaun-Eosin
HLA	Human leukocyte antigen
HMGB	High-mobility group box
HO	Hämoxygenase
HSP	Hitzeschockprotein
HU	High urgency
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICU	Intensive care unit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INR	International normalized ratio
IRF	Interferon regulatory factor
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KC	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA	Leukocyte function-associated antigen

## Abkürzungsverzeichnis

---

LIX	Lipopolysaccharide-induced CXC chemokine
LTx	Lebertransplantation
M	Marginal
MAC	Macrophage-1 antigen
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MAP	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MARS	Molecular adsorbent recirculating system
MELD	Model for end-stage liver disease
MHC	Major histocompatibility complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPT	Mitochondrial permeability transition
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle
NM	Nicht marginal
n. d.	Nicht detektiert
n. s.	Nicht signifikant
PAF	Platelet activating factor
PAS	Periodic acid-Schiff
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PELD	Pediatric end-stage liver disease
PMA	Phorbol myristate acetate
POT	Postoperativer Tag
Präop.	Präoperativ
PRR	Pattern recognition receptor
R.	Reperfusion
RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
RNA	Ribonucleic acid
ROR	Retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor
ROS	Reactive oxygen species
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
SBZ	Sekundär biliäre Zirrhose
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SOC	Store-operated calcium channel
SSc	Side scatter
SSC	Sekundär sklerosierende Cholangitis
STAT	Signal transducers and activators of transcription
T-bet	T-box expressed in T cells
TBX	T-box transcription factor
TCR	T cell receptor
TCRG	T cell receptor gamma
TGF	Transforming growth factor
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIM	T cell immunoglobulin mucin
TLR	Toll-like receptor
T <sub>m</sub>	Melting temperature
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tissue plasminogen activator
TPG	Transplantationsgesetz
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing interferon- $\beta$
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UW	University of Wisconsin
WT	Wildtyp



# 1 Einleitung

Die Lebertransplantation (LTx) stellt die einzige etablierte kausale Therapiemodalität bei akutem Leberversagen und bei verschiedenen chronischen Lebererkrankungen im Endstadium dar. Jedoch ist die Transplantatfunktion häufig durch den sogenannten Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) limitiert. Bereits 1975 wurde der ischämische Schaden im Rahmen tierexperimenteller Studien als klinisch relevante, pathologische Störung detektiert.<sup>1</sup> Jedoch wurde bis Mitte der 1980er Jahre der Begriff des Reperfusionsschadens nicht generell in der Literatur verwendet.<sup>2</sup> Der IRS beschreibt das Phänomen, bei dem es zu einer zellulären Schädigung in einem hypoxischen Organ kommt, akzentuiert durch das nachfolgende Wiedereinsetzen der Sauerstoffversorgung.<sup>2</sup> Der IRS kann im Rahmen von Transplantation<sup>3</sup>, Traumata<sup>4,5</sup> und operativen Resektionen<sup>6</sup> eine Rolle spielen. Neben primärer Nichtfunktion, früher schlechter Transplantatfunktion,<sup>7</sup> höherer Inzidenz akuter und chronischer Abstoßungsreaktionen<sup>7-9</sup> sowie Leberversagen<sup>10</sup> ist der IRS mit einer höheren Morbidität<sup>7</sup> assoziiert. Dabei stellt der Mangel an Spenderorganen ein zentrales Problem dar. 2013 wurden in Deutschland insgesamt 970 LTx durchgeführt.<sup>11</sup> Demgegenüber standen im Jahr 2013 1.534 Patienten auf der Warteliste für eine LTx, wobei in diesem Berichtsjahr 1.305 Patienten neu auf der Warteliste für eine Leber angemeldet wurden.<sup>11</sup> Damit wird der vorherrschende Organmangel ersichtlich. Aus diesem Grund werden zunehmend sogenannte marginale Organe transplantiert,<sup>12-14</sup> um den Spenderpool zu erweitern<sup>7</sup>. Darunter versteht man Organe minderer Organqualität, die im Vergleich zu voll funktionsfähigen Organen von gesunden Spendern eine eingeschränkte Funktion im Empfänger zeigen. Allerdings bergen solche marginalen Organe beispielsweise ein größeres Risiko für einen schweren IRS, was häufig in einer primären Nichtfunktion oder einer frühen schlechten Transplantatfunktion resultiert.<sup>7</sup> Mit der Erforschung von IRS-Mediatoren und neuen molekularen Signalwegen wurde das Zusammenspiel von angeborenem Immunsystem, adaptivem Immunsystem und der Organregeneration in Bezug auf die langfristige Transplantatfunktion erkannt.<sup>15</sup> Die Prävention und Therapie des IRS sowie die Erforschung der immunologischen Faktoren, die zu dem IRS beitragen, stellen somit eine Herausforderung an die Transplantationsmedizin dar und spielen eine immer entscheidendere Rolle, speziell im Hinblick auf die Allokation marginaler Organe.

## 1.1 Indikationen zur Lebertransplantation

Obwohl sich die Transplantationsmedizin schon weit entwickelt hat, ist sie doch noch eine relativ junge Wissenschaft, wenn man bedenkt, dass die ersten tierexperimentellen LTx-Versuche nur knapp sechs Jahrzehnte zurückliegen<sup>16–18</sup>. Die erste humane orthotopie LTx wurde 1963 in Denver von dem amerikanischen Chirurgen Starzl durchgeführt.<sup>19,20</sup> Bereits im Jahre 1983 erklärten die National Institutes of Health die LTx nicht länger für ein experimentelles Verfahren, sondern für eine geeignete Therapie vieler Patienten mit schweren Lebererkrankungen.<sup>21</sup>

Bis heute hat sich die LTx als das standardisierte Therapiekonzept zur Behandlung des akuten Leberversagens und der terminalen Leberinsuffizienz durchgesetzt. Entsprechend der Datenerhebung des ELTR stellen bei Kindern im Alter von 0–2 Jahren beziehungsweise 2–18 Jahren cholestatische Erkrankungen mit 71,2 % beziehungsweise 34,1 % die häufigste Indikation dar (1988–2015),<sup>22</sup> wobei die LTx am häufigsten im Rahmen einer Gallengangsatresie<sup>23</sup> indiziert ist. Da viele Stoffwechselerkrankungen auch extrahepatische Störungen mit sich bringen, ohne notwendigerweise zu einer Leberzirrhose zu führen, ist vor allem in dieser Gruppe das Feld der Indikationen in den letzten Jahren vergrößert worden. So folgen auf Platz zwei bei den 0–2-Jährigen beziehungsweise 2–18-Jährigen die metabolischen Erkrankungen mit 8,5 % beziehungsweise 23,4 % (1988–2015).<sup>22</sup>

Laut den Statistiken des ELTR von 1988–2015 stellen bei den primären Erkrankungen, die in Europa zu einer LTx führen, die Leberzirrhosen mit 56,1 % die häufigste Indikation dar,<sup>24</sup> wobei 36,9 % der Leberzirrhosen virusassoziiert sind, gefolgt von 33,6 % mit alkoholischer Leberzirrhose<sup>25</sup>. Dahingegen ist in Deutschland die alkoholische Leberkrankheit im Jahr 2012 sogar auf Platz eins der Indikationen.<sup>26</sup> Neben den Leberzirrhosen stellen Krebserkrankungen 16,5 % und cholestatische Erkrankungen 9,9 % der gesamten Indikationen dar (1988–2015).<sup>24</sup> Hinsichtlich der Transplantationsindikation im Rahmen von Malignomen bestehen allerdings Einschränkungen. So müssen Patienten mit hepatozellulärem Karzinom die Milan-Kriterien erfüllen, dürfen keine extrahepatischen Metastasen und keine makrovaskuläre Invasion aufweisen, um für eine LTx gelistet zu werden.

Die auf dem Organmangel beruhende Diskrepanz zwischen der Anzahl der Patienten auf der Warteliste und der geringen Spenderanzahl beziehungsweise der im Vergleich dazu niedrigeren Anzahl durchgeführter LTx lässt nicht nur die Diskussion um die Indikationsstellung, sondern auch die gerechte Allokation der verfügbaren Transplantate in ein anderes Licht rücken.

## 1.2 Allokation von Organen und Problematik des Organmangels

### Verfahren der Allokation von Organen

In den 1950er und frühen 1960er Jahren existierte in Deutschland noch kein institutionell organisiertes Transplantationssystem, sodass das Aufbringen der Spenderorgane und der Transplantationsprozess allein in den Händen der transplantierenden Krankenhäuser lag.<sup>27</sup> Mit dem 1997 in Kraft getretenen TPG wurde Eurotransplant als offizielle Vermittlungsstelle für die Bundesrepublik Deutschland eingesetzt.<sup>28</sup> Die Bundesärztekammer richtete die Ständige Kommission Organtransplantation ein, die mithilfe von Eurotransplant die Richtlinien zur Organvermittlung festlegt.<sup>28</sup> Daneben stellt die Deutsche Stiftung Organtransplantation die nationale Koordinierungsstelle in Deutschland dar und übermittelt alle notwendigen Spenderdaten an Eurotransplant.<sup>28</sup>

Die Organisation Eurotransplant mit Sitz in Leiden wurde 1967 durch den niederländischen Immunologen und Transplantationsmediziner van Rood gegründet<sup>28</sup> mit der Zielsetzung, eine zentrale Datenbank zu erstellen und die Organe bestmöglich zu verteilen<sup>29</sup>. Schon während der 70er Jahre begann Eurotransplant mit der Verteilung von Lebertransplantaten.<sup>29</sup> Heute stellt die Organisation mit 72 Transplantationszentren in den Ländern Österreich, Belgien, Kroatien, Deutschland, Ungarn, Niederlande, Luxemburg und Slowenien<sup>30</sup> den Inbegriff einer supranationalen Organvermittlung dar. Während bis Mitte der 60er Jahre die Organe basierend auf einer Warteliste nach Blutgruppenkompatibilität verteilt wurden, wählte van Rood mit dem HLA-System einen neuen Ansatz.<sup>29</sup> In den Jahren 2000–2006 verteilte Eurotransplant die Organe nach dem patientenorientierten ELAS<sup>31,32</sup>. Dabei wurden mehrere Dringlichkeitsstufen eingeführt.<sup>31</sup> Jedoch stieg laut den Statistiken der Jahresberichte von Eurotransplant die Mortalität auf der Warteliste zwischen 2002–2006 von 363 auf 479 Fälle pro Jahr,<sup>32</sup> was einem Zuwachs von fast einem Drittel entspricht. Um die Mortalität zu reduzieren, übernahm Eurotransplant im Jahr 2007 das amerikanische Allokationssystem und implementierte den MELD-Score zur Priorisierung elektiv transplantabler Patienten.<sup>32</sup> Der MELD-Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der Patienten im Endstadium einer Lebererkrankung innerhalb von drei Monaten versterben.<sup>33</sup> Mit dem MELD-Score wurden die zuvor verwendeten Dringlichkeitsstufen ersetzt.<sup>33</sup> Lediglich die HU-Stufe für Patienten in akut lebensbedrohlichen Situationen wurde beibehalten.<sup>33</sup> Diese Patienten werden nicht über den MELD-Score zugeteilt, sondern behalten ihre internationale Priorität.<sup>33</sup>

In Deutschland sieht der Allokationsalgorithmus Folgendes vor, dass zuerst HU-Patienten transplantiert werden.<sup>34</sup> Falls zum Zeitpunkt des Transplantatangebots mehrere Patienten HU gelistet sind, fällt die HU-Wartezeit ins Gewicht.<sup>34</sup> Als Nächstes werden die Multiorgantransplantationen wieder unter Berücksichtigung der Wartezeit bei mehr als einer Nachfrage berücksichtigt.<sup>34</sup> Dann folgen basierend auf dem MELD-Score Patienten in den Ländern, die zuvor einem anderen Land ein Organ überlassen haben und damit noch eine offene Verpflichtung aussteht, gefolgt von Patienten im eigenen Spenderland und schließlich Patienten anderer Eurotransplant-Mitgliedsländer.<sup>34</sup> In diesem Allokationsalgorithmus werden pädiatrische Patienten immer vor erwachsenen Patienten priorisiert.<sup>34</sup> Der MELD-Score berechnet sich aus den drei Laborparametern Kreatinin, Gesamtbilirubin und der Prothrombinzeit INR<sup>35</sup> und wird somit als Lab-MELD bezeichnet.<sup>33</sup> Um auch Erkrankungen zu berücksichtigen, die nicht mit einer Veränderung der oben genannten Laborparameter einhergehen,<sup>36</sup> beispielsweise dem hepatozellulären Karzinom, wurde der sogenannte Exceptional-MELD<sup>37</sup> eingeführt. Neben dem MELD-Score wurde der PELD-Score entwickelt, um die Prognose pädiatrischer Patienten, die auf eine LTx warten, vorherzusagen.<sup>38</sup> 2005 veröffentlichten Freeman et al., dass sich die Überlebensraten seit der Einführung des MELD-basierten Allokationssystems im Jahr 2002 in den Vereinigten Staaten nicht verschlechterten.<sup>39</sup>

### **Problematik des Organmangels und der Allokation marginaler Organe**

Der Bedarf an Spenderorganen hat infolge der zunehmenden Inzidenz von Organversagen deutlich zugenommen, während das Angebot optimaler, verstorbener Spender zu niedrig und ungenügend geblieben ist, um dem steigenden Bedarf gerecht zu werden. Im Jahr 1995 waren 387 Patienten der Länder Österreich, Belgien, Deutschland und Niederlande auf der Warteliste für eine LTx.<sup>40</sup> Am Ende des Jahres 2013 waren es hingegen 2.041 Patienten der Länder Österreich, Belgien, Kroatien, Deutschland, Ungarn, Niederlande und Slowenien,<sup>41</sup> was etwa einem 5-fachen Anstieg innerhalb von 18 Jahren entspricht. Während im Jahr 1995 148 Patienten<sup>40</sup> entsprechend 38 % aller Patienten auf der Warteliste für eine LTx starben, waren es 2013 mit 487 Patienten<sup>41</sup> leider immer noch nahezu ein Viertel. Daher gibt es viele Ansätze den Spenderpool zu erweitern, um damit dem vorherrschenden Organmangel gerecht zu werden. So gab es bereits ab dem Jahr 1988 den Versuch mittels Aufteilung von Organen in Form von Teil-LTx,<sup>42</sup> Leberlebenspenden<sup>43</sup> sowie Dominotransplantationen<sup>44</sup> die stetig wachsende Nachfrage zu decken. Außerdem wurde im Jahr 2012 das TPG dahingehend modifiziert, dass insbesondere die Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung und die Krankenkassen die Bevölkerung über die Möglichkeiten der Organ- und Gewebespende aufzuklären haben.

Aufgrund des Organmangels steigt auch das Interesse an Organen herztoter Spender,<sup>7</sup> wobei aber in Deutschland im Gegensatz zu einigen Nachbarländern die Organentnahme nach Herztod verboten ist. Die Organe herztoter Spender für die Transplantation werden jedoch aufgrund verlängerter warmer Ischämiezeiten vor der kalten Konservierung als suboptimal betrachtet.<sup>7</sup> Aber auch der Hirntod des Spenders birgt Nachteile und führt zur Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  sowie MIP-1 $\alpha$ , und damit zu einem schwerer ausgeprägten IRS.<sup>45</sup> Dennoch stellt die Verwendung marginaler Organe eine geeignete Methode zur Erweiterung des Spenderpools und zur Reduktion der Wartelistensterblichkeit dar.<sup>46</sup>

In der Vergangenheit wurden schon sämtliche Faktoren untersucht, die zur Marginalität der Spenderorgane beitragen und damit die Organfunktion nach Transplantation beeinflussen. So bergen marginale Organe beispielsweise ein größeres Risiko für einen schweren IRS, resultierend in einer primären Nichtfunktion oder einer frühen schlechten Transplantatfunktion.<sup>7</sup> Um solche marginalen Organe transplantieren zu können, werden erweiterte Spenderkriterien verwendet.<sup>7</sup> So gelten für die LTx spezifizierte erweiterte Kriterien für die Spender, welche auch als sogenannte ECD bezeichnet werden (5.2.2.4, Tab. 5-4). Trifft mindestens eines dieser Spenderkriterien zu, so wird die Spenderleber von Eurotransplant als marginales Organ definiert.<sup>34</sup> Allerdings hat diese ECD-Einteilung keine Konsequenz für die Allokation innerhalb von Eurotransplant,<sup>47</sup> sondern stellt vielmehr eine explorative Komponente der Organqualität dar. Dieser Terminus wird kontrovers diskutiert, da es keine anerkannte Definition eines ECD gibt.<sup>47</sup> Neben der ECD-Einteilung existieren von der Bundesärztekammer definierte allgemeine »Kriterien für die Einschränkung der Vermittlungsfähigkeit« von Organen, die die Vorgeschichte des Spenders betreffen.<sup>48</sup> Dazu gehören insbesondere maligne Tumoren in der Anamnese, Drogenabhängigkeit, Virushepatitis, Sepsis mit positiver Blutkultur und Meningitis.<sup>48</sup> Dabei muss die Vermittlungsfähigkeit von den an der Organentnahme beteiligten Ärzten beurteilt werden.<sup>48</sup>

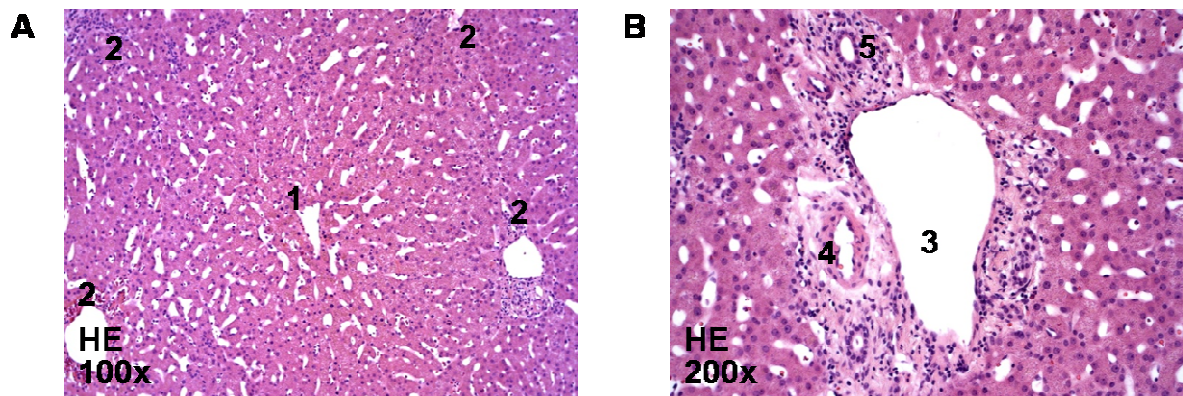
Unter dem Aspekt, dass marginale Organe häufiger mit schwerwiegenden Komplikationen, wie einem ausgeprägten IRS, einhergehen, stellt die Erforschung der dahinterstehenden Pathophysiologie die Basis für das Verständnis und die Entwicklung von Therapien dar. Nur so kann die optimale Konditionierung und Verwendung marginaler Organe realisiert werden, um künftig zu einer weiteren Nutzbarmachung solcher Organe beitragen zu können.

## 1.3 Der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden

### 1.3.1 Funktion und Aufbau des hepatobiliären Systems

Die Leber übernimmt als zentrales Stoffwechselorgan und größte Drüse des Körpers lebenswichtige Funktionen. Sie ist Teil des hepatobiliären Systems, welches sich aus Leber, Gallenblase und Gallenwegen zusammensetzt.<sup>49</sup> Nährstoffe aus dem Gastrointestinaltrakt werden über die Pfortader aufgenommen und verwertet, womit die Leber in den Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel eingebunden ist.<sup>49</sup> Ferner dient die Leber als Speicher-, Entgiftungs- sowie Metabolisierungsorgan, ist mit der Harnstoffsynthese an der Säure-Base-Regulation involviert und übernimmt bereits in der Fetalperiode mit ihrer Beteiligung an der Blutbildung eine essentielle Aufgabe.<sup>49</sup>

Diese Vielfalt an Aufgaben spiegelt sich in der Komplexität des anatomischen Aufbaus wider. Histologisch wird das Leberparenchym in Leberläppchen unterteilt, die sich jeweils um eine Zentralvene anordnen und eine etwa 2mm<sup>3</sup> große Einheit bilden<sup>49</sup> (Abb. 1 A). Zwischen den Leberläppchen sind bindegewebige Portalfelder lokalisiert, in denen sich die Glisson-Trias aus zuführenden portalvenösen Gefäßen, den Venae interlobulares, aus arteriellen Gefäßen, den Arteriae interlobulares, sowie aus den ableitenden Gallengängen, den Ductuli biliferi interlobulares, befinden<sup>49</sup> (Abb. 1 B).



**Abb. 1. HE-gefärbte, humane Leberstanzbiopsie.** Darstellung eines Zentralvenenläppchens mit der Zentralvene (1) im Mittelpunkt, umgeben von Portalfeldern (2) (A). Darstellung eines Portalfelds mit der Glisson-Trias aus Vena interlobularis (3), Arteria interlobularis (4) und Ductus biliferus interlobularis (5) (B).

Die Hepatozyten bilden das Leberparenchym und sind unter anderem für den Lebermetabolismus und die Entgiftung von Stoffen verantwortlich.<sup>49</sup> Dabei stellen in der adulten Leber 60–80 % der Zellen Hepatozyten dar.<sup>50</sup> Die restlichen Zellen bestehen zu 50 %

aus Endothelzellen, zu 25 % aus Lymphozyten, zu 20 % aus Kupfferzellen, zu 5 % aus biliären Zellen und zu weniger als 1 % aus Sternzellen, auch Ito-Zellen genannt.<sup>50</sup>

Anhand der Komplexität des Aufbaus ist es nachvollziehbar, dass die Leberfunktion auf lange Zeit gesehen nicht maschinell ersetzbar ist. Anders als bei der Niereninsuffizienz, die mittels Dialyse über Jahre symptomatisch therapiert werden kann,<sup>51</sup> dienen bei der Leberinsuffizienz das MARS<sup>52</sup> sowie das Prometheus-System<sup>53</sup> nur zur Überbrückung der Zeit bis zur LTx. Die orthotope LTx stellt mit 1-Jahresüberlebensraten von 90 % und 5-Jahresüberlebensraten von 75 %<sup>54</sup> eine gute und die einzig effektive Therapie der terminalen Leberinsuffizienz dar. Die Leber nimmt auch eine spezielle Rolle als immunologisch aktives Organ ein. Dies ist insbesondere im Hinblick auf den hepatischen IRS bei der orthotopen LTx von großer Relevanz.

### 1.3.2 Aufgaben des Immunsystems

Das Immunsystem hat die Funktion inne, den Körper vor körperfremden Organismen und Substanzen zu schützen. Allerdings kann es auch in Abwesenheit von Mikroorganismen beispielsweise im Rahmen von Traumata, chemisch induziertem Schaden oder eben im Zusammenhang mit Ischämie und Reperfusion zu einer sogenannten sterilen Entzündung kommen.<sup>55</sup> Dabei kommt es ähnlich wie bei der mikrobiell induzierten Entzündung zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen sowie zur Freisetzung von Zytokinen.<sup>55</sup> Granulozyten und Makrophagen werden zusammen mit T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen zu den weißen Blutkörperchen, den sogenannten Leukozyten, gezählt.<sup>56</sup> Die Komponenten des Immunsystems werden über das Blut- und Lymphsystem transportiert.<sup>57</sup> Dabei erfolgen die Steuerung der Immunreaktion sowie die Interaktion zwischen den einzelnen Komponenten des Immunsystems mittels Zytokinen.<sup>57</sup> Darunter zusammengefasst werden unter anderem IL, Chemokine, IFN, TNF und TGF.<sup>57</sup>

Auf der Oberfläche der Körperzellen kommen MHC vor, auch bekannt unter dem Begriff des HLA, die eine wichtige Rolle im Rahmen der Immunerkennung, der immunologischen Individualität und der Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen spielen.<sup>57</sup> Körperfremde Strukturen werden markiert, indem Faktoren des Komplementsystems oder Antikörper im Rahmen der Opsonisierung angelagert werden und Antigene über MHC-I- oder MHC-II-Rezeptoren auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen, wie Makrophagen und dendritischen Zellen, dargestellt werden.<sup>57</sup> Monozyten, Makrophagen und

Granulozyten erkennen mittels verschiedener Rezeptoren in der Plasmamembran pathogene Strukturen, wobei die sogenannten TLR die bekanntesten sind.<sup>57</sup>

Das Immunsystem wird in ein unspezifisches (angeborenes) und ein spezifisches (erworbenes) Immunsystem eingeteilt, wobei beide jeweils aus einer zellulären, das heißt zellgebundenen, und einer humoralen, das heißt an Faktoren des Blutplasmas gebundenen, Komponente bestehen.<sup>57</sup> Während das angeborene Immunsystem eine schnelle Immunabwehr gegen ein breites Spektrum von Pathogenen initiiert, erkennt das erworbene Immunsystem bestimmte Oberflächenstrukturen mit hoher Spezifität und kann eine gezielte Immunabwehr durch spezielle Zellen hervorrufen.

### **Das angeborene Immunsystem**

Die humoralen Komponenten des angeborenen Immunsystems setzen sich aus dem Komplementsystem, Lysozym, Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen zusammen.<sup>57</sup> Die beteiligten Zellen des angeborenen Immunsystems sind Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen.<sup>57</sup> Neutrophile Granulozyten gehören zu den Phagozyten und werden durch Chemotaxine dazu stimuliert, im Rahmen der Emigration aus der Blutbahn ins Gewebe einzuwandern, um dort unter anderem opsonisierte Antigene zu phagozytieren.<sup>57</sup> Monozyten haben die Funktion, ins Gewebe einzuwandern und sich zu ortsständigen Makrophagen zu differenzieren, die speziell in der Leber als Kupfferzellen bezeichnet werden.<sup>57</sup> Neben ihrer ausgeprägten Phagozytoseaktivität erkennen Makrophagen Pathogene über TLR und treiben die lokale Entzündung durch Freisetzung von Zytokinen, wie IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , voran.<sup>57</sup> Ferner werden Immunzellen anhand der An- oder Abwesenheit bestimmter immunphänotypischer Oberflächenmerkmale, die als CD bezeichnet werden, typisiert. So werden beispielsweise NK-Zellen auch als CD3<sup>-</sup>-Lymphozyten bezeichnet, da ihr Rezeptor im Gegensatz zu den CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nicht mit dem Oberflächenrezeptor CD3 assoziiert ist.<sup>57</sup>

### **Das erworbene Immunsystem**

Die humoralen Komponenten des erworbenen Immunsystems setzen sich aus Antikörpern und Zytokinen zusammen.<sup>57</sup> Zu den beteiligten Zellen des erworbenen Immunsystems gehören B- und T-Lymphozyten.<sup>57</sup> B-Lymphozyten sorgen für die spezifische humorale Immunabwehr, indem sie nach der Differenzierung zur Plasmazelle spezifische Antikörper bilden, die wiederum durch Bindung Antigene neutralisieren, opsonisieren und das Komplementsystem aktivieren, welches zur Lyse von Pathogenen und zur Aktivierung von Leukozyten beiträgt.<sup>57</sup> Dahingegen sind T-Lymphozyten beispielsweise CD4<sup>+</sup>-Th-Zellen oder CD8<sup>+</sup>-T-Killerzellen. Th-Zellen interagieren mit antigenpräsentierenden

Zellen über MHC-II, während T-Killerzellen über MHC-I interagieren.<sup>57</sup> T-Zellen besitzen einen TCR, der unter anderem aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette sowie dem Oberflächenrezeptor CD3 besteht.<sup>57</sup> Eine kleine Minderheit der T-Zellen besitzt statt eines  $\alpha\beta$ -Heterodimers ein  $\gamma\delta$ -Heterodimer.<sup>57</sup> Weiterhin werden die Th-Zellen entsprechend ihres Zytokinprofils unter anderem in Th1-, Th2- und Th17-Zellen unterteilt.<sup>58</sup> Dabei fördern Th1-Zellen eine proinflammatorische, zellvermittelte Immunität.<sup>58</sup> In den Prozess der Differenzierung zu Th1-Zellen sind IL-12, IFN- $\gamma$  und die Transkriptionsfaktoren STAT-1, STAT-4 und T-bet involviert,<sup>58</sup> wobei der Transkriptionsfaktor T-bet auch als TBX-21<sup>59</sup> bezeichnet wird. Th1-Zellen bilden hauptsächlich IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  und Lymphotoxin.<sup>58</sup> Th2-Zellen hingegen sind an der nicht inflammatorischen, direkten Immunreaktion beteiligt und bilden IL-4, -5, -6, -10 und -13.<sup>58</sup> Die Differenzierung in Th2-Zellen erfolgt durch IL-4 in Kombination mit den Transkriptionsfaktoren STAT-6 und GATA-3.<sup>58</sup> Dagegen stellen Th17-Zellen die erste Gruppe dar, die während einer Infektion generiert werden.<sup>58</sup> In Anwesenheit von TGF- $\beta$ , IL-6 und IL-23 kommt es über die Transkriptionsfaktoren ROR $\gamma$ t und ROR $\alpha$  sowie STAT-3 zur Differenzierung CD4<sup>+</sup>-Zellen zu Th17-Zellen.<sup>58</sup> Dabei entspricht der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t in der Maus dem humanen Homolog RORc.<sup>60</sup> Th17-Zellen bilden das proinflammatorische IL-17A, was durch IL-23 induziert wird.<sup>58</sup> IL-17 führt über verschiedene Zytokine zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen,<sup>58</sup> womit die lokale Entzündungsreaktion vorangetrieben wird.

### **Immunzellen der Leber**

Abgesehen von den parenchymbildenden Hepatozyten sind nahezu die Hälfte der restlichen Zellen Immunzellen.<sup>50</sup> 25 % der nicht parenchymatösen Leberzellen sind Lymphozyten.<sup>50</sup> Diese wiederum bestehen zu 63 % aus T-Zellen, zu 31 % aus NK-Zellen und zu 6 % aus B-Zellen.<sup>50</sup> Die T-Zellen werden noch weiter unterteilt in konventionelle T-Zellen, die positiv für die Oberflächenantigene CD4 und CD8 sind, und in unkonventionelle T-Zellen.<sup>50</sup> Die konventionellen T-Zellen umfassen MHC-I-a-abhängige CD8<sup>+</sup>- $\alpha\beta$ -T-Zellen und MHC-II-abhängige CD4<sup>+</sup>- $\alpha\beta$ -T-Zellen.<sup>61</sup> Die unkonventionellen T-Zellen ohne NK-Zellmarker werden neben diversen anderen Zellen als  $\gamma\delta$ -T-Zellen bezeichnet.<sup>50,61</sup> Die unkonventionellen T-Zellen, die bestimmte NK-Zellmarker exprimieren, werden als NKT-Zellen bezeichnet.<sup>50,61</sup> Des Weiteren befinden sich in der Leber Zellen des mononukleären Phagozytensystems, wie beispielsweise Kupfferzellen, die antigenpräsentierende Makrophagen darstellen, im Verband mit Sinusendothelzellen stehen und eine Rolle bei der Beseitigung von Zelltrümmern, Bakterien und Fremdkörpern spielen.<sup>49</sup> All diese Immunzellen in der Leber ermöglichen es, eine Vielfalt von Akute-Phase-Proteinen, Chemokinen und Zytokinen zu generieren, womit die Leber neben seiner Rol-

le als Stoffwechselorgan eine wichtige immunologische Funktion einnimmt, insbesondere unter dem Aspekt der immunologischen Ursachen eines IRS.

### 1.3.3 Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens

Der IRS im Lebertransplantat stellt einen multifaktoriellen Prozess dar, der sowohl Elemente des kalten als auch des warmen IRS beinhaltet.<sup>62</sup> Der kalte IRS entsteht durch die kalte Konservierung des Spenderorgans, gefolgt von der Reperfusion nach Implantation.<sup>3</sup> Dahingegen tritt der warme IRS beispielsweise beim Abklemmen der Perfusion im Rahmen operativer Leberresektionen auf<sup>6</sup> und stellt im Rahmen der LTx den Zeitraum von der Implantation bis zur Reperfusion dar.

#### Hypoperfusion und Störungen des Natrium-, Calcium- und Wasserstoffhaushalts

Der ischämische Schaden stellt einen Prozess zellulärer metabolischer Störungen dar aufgrund von Glykogenverbrauch, mangelnder Sauerstoffversorgung und ATP-Abbau.<sup>62</sup> Der ischämisch induzierte ATP-Mangel<sup>63</sup> in Hepatozyten, Kupferzellen und Sinusendothelzellen führt zu einer Störung der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-ATPase und somit wird Natrium unzureichend aus den Zellen befördert<sup>64</sup>. Die erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration und die damit einhergehende Zellschwellung führen zu einer zunehmenden Störung der Perfusion.<sup>64</sup> Zusätzlich kommt es zu einer Verminderung von Stickstoffmonoxid, am ehesten im Rahmen einer verminderten Funktion der Stickstoffmonoxid-Synthase.<sup>65</sup> Da Stickstoffmonoxid eine vasodilatatorische Funktion ausübt,<sup>66</sup> kommt es mit dessen Verminderung zu einer zusätzlichen Verengung der Sinusoide. Neben Zellschwellung und vermindertem Stickstoffmonoxid führt der IRS zu einer Zunahme von Endothelin und Thromboxan-A<sub>2</sub><sup>67</sup>, die eine Vasokonstriktion und damit eine weitere Hypoperfusion herbeiführen.

Im Rahmen des IRS kommt es nicht nur zu Störungen der Natriumkonzentration, sondern auch zu Störungen der Calcium- und Wasserstoffhomöostase.<sup>68</sup> Calcium befindet sich hauptsächlich im Zytosol, in den Mitochondrien und im ER.<sup>64</sup> Durch Calciumeintritt über die Aktivierung von SOC-Kanälen<sup>69</sup> in der Plasmamembran und Calciumaustritt aus dem ER ins Zytosol durch die Aktivierung von Ryanodinrezeptoren in der ER-Membran kommt zu einer Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration<sup>70</sup>. Zudem werden im Rahmen der kalten Ischämie die Calcium-ATPasen der Plasmamembran und des ER inhibiert, die normalerweise die zytosolische Calciumkonzentration senken.<sup>71</sup> Durch diesen zytosolischen Calciumanstieg kommt es über Calciumuniporter auch zum Anstieg

der Calciumkonzentration in den Mitochondrien,<sup>72</sup> woraus eine Reduktion des mitochondrialen Transmembranpotenzials<sup>68</sup> resultiert. Die ATP-Synthase hydrolysiert ATP, um Energie für andere Ionenpumpen bereitzustellen und das Transmembranpotenzial damit aufrechtzuerhalten.<sup>73</sup> Die mitochondriale Calciumüberladung führt letztendlich zur Bax-Translokation vom Zytosol zu den Mitochondrien<sup>74</sup> und subsequent zur MPT-Formation, Cytochrom-C-Freisetzung und Apoptose<sup>75,76</sup>.

Der vorherrschende Sauerstoffmangel resultiert in einer anaeroben Respiration der Hepatozyten, wodurch eine intrazelluläre Azidose<sup>77</sup> hervorgerufen wird. Um den intrazellulären pH-Wert zu stabilisieren, wird der Natrium-Wasserstoff-Austauscher in den Hepatozyten aktiviert, wodurch die Natriumkonzentration in der Zelle zunimmt.<sup>77</sup> Auf der anderen Seite wird dadurch dem protektiven Effekt eines sauren pH-Werts entgegengewirkt, da dieser die MPT-Formation unterdrückt.<sup>78</sup> Diese Elektrolytverschiebungen resultieren letztendlich in einer Zellschwellung, Nekrose und Apoptose der Hepatozyten.

### **Frühe Phase des IRS wird durch ROS von Kupfferzellen dominiert**

Der Reperfusionsschaden entsteht aufgrund direkt und indirekt zytotoxischer Mechanismen.<sup>62</sup> Dabei wird ein Mangel des antioxidativ wirkenden Glutathions mit dem Reperfusionsschaden in Zusammenhang gebracht.<sup>79</sup> Auf zellulärer Ebene wird der ex-vivo-entstehende kalte IRS durch Sinusendothelzellschaden und Störung der Mikrozirkulation dominiert,<sup>80</sup> wobei MMP eine wichtige Rolle bezüglich des Sinusendothelzellschadens spielen<sup>81</sup>. Dahingegen wird der warme hepatozelluläre Schaden in situ vor allem durch kupfferzellabhängige zytotoxische Moleküle vermittelt.<sup>82</sup> Trotz der Tatsache, dass Ischämie und Reperfusion normalerweise in einer sterilen Umgebung auftreten, kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems,<sup>55</sup> wobei die hauptsächlich beteiligten Zellen aus Kupfferzellen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten, T-, NK- und NKT-Zellen<sup>62</sup> bestehen.

Der hepatische IRS besteht aus einer frühen und einer subakuten Phase. In der akuten Frühphase innerhalb der ersten 6 Stunden nach Reperfusion führt die Bildung der ROS durch Kupfferzellen<sup>84–85</sup> zu einem milden hepatozellulären Schaden.<sup>83</sup> So werden nach Reperfusion erhöhte Level der ROS, wie Superoxide<sup>86–88</sup>, Wasserstoffperoxid<sup>87,88</sup> und Hydroxylradikale<sup>87</sup>, detektiert. Die zellulären Quellen dieser reaktiven Sauerstoffspezies stellen neben dem mitochondrialen Metabolismus<sup>86,87</sup> die Xanthinoxidase<sup>86,87,89</sup> der Hepatozyten sowie die kupfferzell-, neutrophilen-, und sinusendothelzell-assoziierte NADPH-Oxidase<sup>86,88</sup> dar. Diese ROS schädigen Membranlipide mit der Folge von Zellschwellung und Zelltod<sup>90</sup> und können an zellulären Reaktionen bei Entzündungen beteiligt sein<sup>87</sup>.

Letztendlich führt das oxidative Umfeld zur Nekrose von Hepatozyten und Sinusendothelzellen.<sup>90</sup>

In der Leber ansässige Kupfferzellen und dendritische Zellen werden durch DAMP-Moleküle, auch Alarmine genannt<sup>62</sup>, aktiviert<sup>64,68</sup> die durch den zellulären Schaden und die Schädigung der extrazellulären Matrix freigesetzt werden<sup>68</sup>. Im Rahmen des IRS können solche DAMP-Moleküle in mehrere Gruppen von TLR-Liganden eingeteilt werden. Zum einen diejenigen, die von nekrotischen Zellen freigesetzt werden, wie HSP-60, HSP-70, Gp-96, HMGB-1<sup>91-93</sup> und DNA<sup>93</sup>- oder RNA-Komplexe<sup>62</sup>. Zum anderen diejenigen, die von degradierter extrazellulärer Matrix freigesetzt werden, einschließlich Heparansulfat, Hyaluronsäure<sup>94</sup>, Fibrinogen, Fibronectin-A-Domäne und Tenascin-C.<sup>62</sup> Des Weiteren können der zytoplasmatische Calciumregulator S-100<sup>95</sup> sowie ATP<sup>92</sup> als DAMP fungieren.

Die DAMP-Moleküle binden an PRR sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma.<sup>68</sup> Diese PRR werden konstitutiv auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert und initiieren nach Bindung von DAMP-Molekülen eine inflammatorische Antwort.<sup>68</sup> Die folgenden zwei Klassen initiieren und propagieren die inflammatorischen Antworten im Rahmen des IRS: die TLR und der RAGE.<sup>68</sup> Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass TLR-4 auf Kupfferzellen<sup>96</sup> und dendritischen Zellen<sup>97</sup> vorkommt. Mit eingeschlossen in den Prozess der TLR-4-Aktivierung sind Adapterproteine wie TRIF,<sup>98</sup> die MAP-Kinase JNK<sup>91</sup> sowie Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B<sup>91,98-100</sup>, Ap-1<sup>100</sup> und STAT<sup>101</sup>. Dahingegen kommt TLR-9 auf neutrophilen Granulozyten vor und wird sowohl durch HMGB-1 als auch durch bakterielle und endogene DNA aktiviert.<sup>93</sup> TLR-9 dient als Sensor von Gewebsnekrosen, welches zu einer Exazerbation des angeborenen Immunsystems der Leber führt.<sup>93</sup> Daneben könnten auch die Sinusendothelzellen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielen.<sup>62</sup> So konnte gezeigt werden, dass vaskuläre Endothelzellen direkt auf TLR-2-Liganden ansprechen.<sup>102</sup>

Der RAGE wird innerhalb der Leber hauptsächlich auf dendritischen Zellen und in einem geringeren Ausmaß auf Kupfferzellen exprimiert.<sup>103,104</sup> Der hepatische IRS führt zu einer erhöhten Expression des RAGE und Anbindung endogener DAMP, wie HMGB-1, mit darauffolgendem hepatozellulärem Schaden.<sup>104</sup> Die HMGB-1-Bindung an den RAGE führt zu einer Signalkaskade, bei der die JNK/ERK aktiviert wird, was die Expression und Aktivierung des induzierbaren Transkriptionsfaktors Egr-1 verstärkt.<sup>68</sup> Dabei fungiert Egr-1 als ein koordinierender Regulator verschiedener Genfamilien, der im Setting des hepatischen IRS MIP-2, auch als CXCL-2 bezeichnet, beinhaltet, welches Immunzellen in die postischämische Leber rekrutiert<sup>104</sup>. Die Aktivierung des RAGE durch andere DAMP resultiert in der Aktivierung anderer intrazellulärer Entzündungsmediatoren, wie

p38-MAP-Kinase, und der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT-3 und Ap-1 mit einer darauffolgenden Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$ <sup>103</sup>. Während der frühen Phase des IRS wird also angenommen, dass die Bildung von Oxidantien zur Aktivierung redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B und Ap-1, führt,<sup>100</sup> die wiederum die Expression proinflammatorischer Mediatoren, wie IL-12<sup>105</sup> und TNF- $\alpha$  von Kupferzellen<sup>106–108</sup>, aktivieren. Zudem fördert Ap-1 die Apoptose von Leberzellen durch Aktivierung von Caspase-3 und Freisetzung von Cytochrom-C<sup>109</sup>.

Zusammenfassend wird die akute Frühphase des IRS innerhalb der ersten 6 Stunden nach Reperfusion also durch ROS von Kupferzellen<sup>84–85</sup> dominiert,<sup>83</sup> wobei die Kupferzellen von aus Gewebsschäden hervorgehenden DAMP-Molekülen über Rezeptoren, wie die TLR und der RAGE<sup>64,68</sup>, aktiviert werden.

### **Subakute Phase des IRS mit Infiltration neutrophiler Granulozyten**

Die subakute Phase stellt den Zeitraum von etwa 20 Stunden nach Reperfusion dar.<sup>110,111</sup> TNF- $\alpha$  stellt einen zentralen Mediator dar, der neben anderen Mediatoren die subakute Phase einleitet, indem die Produktion und Freisetzung von CXC-Chemokinen stimuliert und Adhäsionsmoleküle auf vaskulären Endothelzellen induziert werden.<sup>83</sup>

In der subakuten Phase werden inflammatorische Mediatoren induziert, welche die Aktivierung, Diapedese und Migration neutrophiler Granulozyten in das Leberparenchym erleichtern. Die für die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten verantwortlichen Mediatoren sind beispielsweise TNF- $\alpha$ <sup>112</sup>, IL-1<sup>113</sup>, aktivierte Komplementfaktoren, wie C5a<sup>114</sup>, und PAF<sup>115</sup>. Des Weiteren dienen CXC-Chemokine,<sup>116</sup> wie beispielsweise IL-8<sup>117</sup>, welches dem CINC in Ratten strukturell ähnlich ist<sup>118</sup>, sowie CXCL-1 und -2 von aktivierten Kupferzellen<sup>119</sup> als solche Mediatoren. Thrombozyten und neutrophile Granulozyten adhären vermehrt an Endothelzellen der Leber aufgrund hochregelter Endothelzell-adhäsionsmoleküle, wie verschiedener Selektine<sup>121</sup> und ICAM-1<sup>120, 83</sup> sowie L-Selektin auf Leukozyten<sup>121,122</sup>. Im Falle der neutrophilen Granulozyten werden die initialen selektinvermittelten Interaktionen durch eine noch stärkere Interaktion zwischen Integrinen, wie MAC-1 (CD11b/CD18) auf neutrophilen Granulozyten<sup>123</sup>, und Immunglobulinen, wie ICAM-1 auf Endothelzellen, verstärkt<sup>89</sup>. Bei der selektinvermittelten Bindung der Thrombozyten an die Sinusendothelzellen kommt es zu einer Apoptose der Letztgenannten, wodurch eine Dysfunktion der Leber hervorgerufen wird.<sup>124</sup> Die infiltrierenden neutrophilen Granulozyten lassen Oxidantien und Proteasen frei, die zu einer Schädigung von Hepatozyten und vaskulären Endothelzellen führen.<sup>125</sup> Dadurch verstopfen die hepatischen Sinusoide, resultierend in einer hepatischen Minderperfusion.<sup>125</sup> Vermutlich werden Hepatozyten mit ICAM-1 über die Verbindung mit MAC-1 auf neutrophilen Granulo-

zyten sogar mittels direktem Zellkontakt abgetötet.<sup>126</sup> Im Anschluss an den IRS kommt es zu einer Aktivierung zytoprotektiver Mechanismen, einschließlich der Produktion von HO-1,<sup>127</sup> welches dem HSP-32<sup>128</sup> entspricht. HO-1 degradiert die Häm-Gruppe, um zweiwertiges Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid zu produzieren, die präkonditionierende protektive Eigenschaften besitzen.<sup>129</sup> Dabei stellen mononukleäre Zellen die Hauptproduzenten von HO-1 in der Leber dar,<sup>130</sup> wobei es Hinweise gibt, dass sich die HO-1- und TLR-4-vermittelten Effekte antagonisieren<sup>127</sup>.

Zusammenfassend bewirken in der subakuten Phase des IRS<sup>110,111</sup> Zelladhäsionsmoleküle und inflammatorische Mediatoren, wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , eine vermehrte Infiltration neutrophiler Granulozyten<sup>83</sup>, die durch Oxidantien und Proteasen das Leberparenchym schädigen<sup>125</sup>. Dabei stimuliert TNF- $\alpha$  die Produktion und Freisetzung von CXC-Chemokinen<sup>83</sup>, wie CXCL-1, was die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten hervorruft<sup>119</sup>.

### **T-Zellen des IRS**

Die Vielzahl der erforschten involvierten Faktoren verdeutlicht die Komplexität der Mechanismen des IRS. Neben den oben aufgeführten Mechanismen, die mit den Kupferzellen der akuten Frühphase und den neutrophilen Granulozyten der subakuten Phase weitgehend die Faktoren des angeborenen Immunsystems einschließen, spielen auch Komponenten des spezifischen Immunsystems eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des IRS. So konnten bisherige Untersuchungen mit T-Zell-defizienten Mauslinien eine Abhängigkeit der Infiltration neutrophiler Granulozyten und des Leberschadens von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zeigen.<sup>111</sup> Zu den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gehören unter anderem klassische NKT-Zellen, die CD1d-restriktiv sind und sowohl den TCR als auch NK-Marker, wie NK1.1, exprimieren.<sup>61</sup> Weiterhin werden die CD1d-restriktiven NKT-Zellen in Typ-I und -II eingeteilt,<sup>131,132</sup> wobei die Typ-1-NKT-Zellen den IRS fördern, während die Aktivierung von Typ-2-NKT-Zellen den IRS vermindern sollen<sup>133</sup>.

Seither besteht die Annahme, dass hauptsächlich konventionelle CD3<sup>+</sup>-T-Zellen des CD4<sup>+</sup>-Effektorphänotyps<sup>134</sup> entscheidend in der frühen akuten IRS-bezogenen Immunantwort sind<sup>111,135,136</sup>. Im Hinblick auf die Differenzierung der T-Zelluntergruppen haben weitere Analysen einen Bedarf des STAT-4-Signalwegs für den warmen IRS in Mäusen gezeigt, was auf eine wahrscheinliche Th1-Polarisierung IRS-vermittelnder Effektorzellen hindeutet.<sup>137</sup> In diesem Kontext wurde ebenfalls gezeigt, dass TIM-1 auf aktivierten Th1-Zellen IFN- $\gamma$  triggert, welches darauffolgend über den indirekten Signalweg Makrophagen aktiviert.<sup>134</sup> Währenddessen kann TIM-1 auf Th2-Zellen mit dessen korrespondie-

renden Liganden TIM-4<sup>138</sup> auf Makrophagen interagieren, um diese über den direkten Signalweg<sup>134</sup> zu aktivieren. Dabei wird TIM-1 unter anderem über den TLR-4 aktiviert.<sup>139</sup> Über die wichtige mechanistische Rolle von Th1- und Th2-Zellen beim IRS hinaus deuten jüngste Daten darauf hin, dass Th17-Zellen auch entscheidend daran beteiligt sind,<sup>110</sup> da die Neutralisierung von IL-17 oder die genetische Defizienz die Einwanderung neutrophiler Granulozyten reduzieren und den hepatischen IRS verringern<sup>135</sup>. Somit wurde bisher angenommen, dass konventionelle CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen die Hauptquelle für IL-17A im Rahmen des IRS sind.<sup>110</sup> Die Mechanismen, die dem IL-17-vermittelten hepatischen IRS zugrunde liegen, sind weitgehend unbekannt. Die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen wird durch vielfache Mechanismen reguliert. Angeblich induziert ein proinflammatorisches Zytokinmilieu bestehend aus TGF- $\beta$  und IL-6 die Th17-Differenzierung<sup>140,141</sup> durch die Induktion von ROR $\gamma$ t,<sup>60,142</sup> den kennzeichnenden Transkriptionsfaktor von Th17, der STAT-3 nachgeschaltet ist<sup>143</sup>. In Bezug auf diese Zellen agiert IL-17A auf eine Vielfalt von Zellen durch seine universellen Rezeptoren IL-17RA und IL-17RC.<sup>144</sup> IL-17A ist ein entscheidender Mediator der Infiltration und Migration neutrophiler Granulozyten durch die Induktion der Granulopoese und Produktion neutrophiler Chemokine,<sup>145</sup> einschließlich LIX, KC und MIP-2<sup>144</sup>. Interessanterweise können neben den CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine zusätzliche potenzielle Quelle der IL-17A-Produktion sein,<sup>144</sup> weil sie dafür bekannt sind, umgehend IL-17A ohne Bindung an den TCR freizulassen<sup>146</sup>, womit sie eine führende Rolle bei der Abwehr von Pathogenen, autoimmuner Entzündung und potenziell beim frühen IRS einnehmen.

### **Therapieansätze**

Bezüglich der Strategien zur Minimierung des IRS gibt es noch keinen Konsens der Transplantationszentren, was auf den Mangel randomisiert kontrollierter Studien und die beschränkte Evidenz in Bezug auf den gesundheitsökonomischen Benefit hindeutet.<sup>129</sup> So besteht bereits eine Vielzahl an Versuchen der Manifestation eines IRS entgegenzuwirken. Beispielsweise soll durch den Einsatz verschiedener Konservierungs- und Perfusionstechniken das Spenderorgan bestmöglich erhalten werden,<sup>129,147,148</sup> wobei die normotherme Maschinenperfusion die Vorteile bietet, dass ECD-Organ länger konserviert werden können<sup>148-150</sup>. Weitere Strategien zur Prävention des IRS stellen die ischämische,<sup>151</sup> die heterotopische<sup>152</sup> und die pharmakologische Präkonditionierung dar, wobei Letztere Substanzen wie Adenosin<sup>153</sup> oder Prolyl-Hydroxylase-Inhibitoren<sup>129,154</sup> verwendet. Der IRS geht mit einem prokoagulatorischen Zustand einher, aber trotz des routinemäßigen Einsatzes von Heparin zur Thromboseprophylaxe des Empfängers besteht nur wenig Evidenz<sup>155</sup> in Bezug auf die IRS-Prävention.<sup>129</sup> Tierexperimentell konnte mit Antithrom-

bin,<sup>156</sup> Streptokinase<sup>157</sup> und dem Endothelin-Rezeptorantagonisten TAK-044<sup>158</sup> eine Verbesserung der mikrovaskulären Versorgung erreicht werden, während in klinischen Studien Urokinase<sup>159</sup> und TPA<sup>160</sup> ebenso verbessernde Ansätze zeigten. Darüber hinaus existieren Ansätze zur Anwendung zytoprotektiver und antioxidativer Strategien, wie der Einsatz der Calcium-modulierenden Substanzen Verapamil<sup>161</sup> und Nimodipin<sup>162</sup>. Daneben soll durch die Modulation der Konservierungs- und Perfusionslösung, wie beispielsweise Kohlenstoffmonoxid-supplementierte UW-Lösung,<sup>163</sup> Zusatz des Pan-Caspase-Inhibitors Emricasan (IDN-6556)<sup>164</sup> sowie Glycin<sup>165</sup>, eine Reduktion des Zellschadens herbeigeführt werden. Mit dem Einsatz einer rekombinanten Superoxiddismutase soll die zelluläre antioxidative Kapazität gesteigert werden.<sup>129,166–169</sup> Weitere Substanzen mit antioxidativem Potenzial stellen Sevofluran<sup>170,171</sup>, Vitamin-E<sup>129,172</sup>, auch als Tocopherol bezeichnet, Trimetazidin<sup>173,174</sup> sowie N-Acetylcystein<sup>175,176</sup> dar.

Zusammenfassend besteht eine Vielfalt an Therapieansätzen, die den hepatischen IRS eindämmen sollen. Häufig sind die zugrunde liegenden Mechanismen zwar im Tiermodell untersucht, jedoch fehlt die klinische Evidenz, diese Ansätze standardisiert in der humanen Transplantationsmedizin umzusetzen. Auf der anderen Seite wird mit wachsendem Know-how im Hinblick auf den tierexperimentellen und humanen, hepatischen IRS die Durchführung klinischer Studien zunehmend ermöglicht.

## 2 Zielsetzung

Häufig stellt eine LTx die Ultima Ratio vieler Lebererkrankungen im Endstadium dar. Jedoch ist die Organfunktion nach Transplantation in einer beträchtlichen Anzahl der Fälle eingeschränkt oder unzureichend. Dabei stellt der IRS nach wie vor eine relevante Komplikation dar. Die Situation wird dadurch verschlimmert, dass in Anbetracht des vorherrschenden Organmangels eine zunehmende Allokation von Organen minderer Organqualität, sogenannter marginaler Organe, stattfindet. Denn marginale Organe bergen ein größeres Risiko für einen schweren IRS.<sup>7</sup> Die Aufklärung des Pathomechanismus ist daher ein wichtiger Schritt zur Entwicklung therapeutischer Strategien. Daher soll der frühe hepatische IRS in Bezug auf die LTx sowohl in einem Tiermodell als auch im Rahmen einer klinischen, retrospektiven, explorativen und monozentrischen Fall-Kontroll-Studie Forschungsgegenstand dieser Arbeit sein. Dabei werden auch die Kriterien der Marginalität im Zusammenhang mit dem IRS analysiert.

T-Lymphozyten spielen eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Vermittlung des frühen IRS in Mausexperimenten.<sup>62</sup> Darüber hinaus werden  $\gamma\delta$ -T-Zellen als wichtige Effektorzellen mit dem IRS in Zusammenhang gebracht.<sup>110</sup> Im Tiermodell des partiellen warmen IRS dieser Dissertation zeigen sich tatsächlich in histologischen, molekularbiologischen und durchflusszytometrischen Analysen unkonventionelle IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, sogenannte DN-T-Zellen, als die Effektorzellen des IRS. Diese sind von dem Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t abhängig und agieren über einen IL-17A-bedingten Mechanismus. Zudem ist der IRS im Tiermodell mit signifikant erhöhten mRNA-Expressionslevel für TNF- $\alpha$  und CXCL-1 assoziiert. Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit lautet, ob die im Tiermodell involvierten Faktoren gleichermaßen beim hepatischen IRS der humanen LTx eine Rolle spielen. Der IRS wurde histopathologisch anhand der beiden humanen Leberbiopsien am Ende der Kaltpräparation und 2 Stunden nach Reperfusion diagnostiziert. Zudem wurden 2nd-Look-Biopsien, die innerhalb von 1–2 Tagen nach LTx entnommen wurden, analysiert. Die Biopsien wurden histologisch auf CD3<sup>+</sup>- und  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen sowie molekularbiologisch auf den Oberflächenrezeptor CD3, das Zytokin TNF- $\alpha$ , das Chemokin CXCL-1, den Th1-kennzeichnenden Transkriptionsfaktor TBX-21, den Transkriptionsfaktor RORc und den TCR $\gamma$  hin untersucht. Unter dem Aspekt der zunehmenden Allokation marginaler Organe wird in dieser Arbeit unter anderem auf Spendercharakteristika und Marginalitätskriterien eingegangen. Weiterhin werden Empfängercharakteristika, die Prävalenzen akuter Abstoßungsreaktionen und Re-LTx sowie das Patientenüberleben im Zusammenhang mit dem IRS und der Allokation marginaler Organe analysiert.



## **3 Material**

### **3.1 Mausstämme**

Wildtypmäuse des C57BL/6-Stamms<sup>140</sup> im Alter von 6–8 Wochen wurden von Charles River Laboratories International Inc. (Sulzfeld) erworben. Die Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien des National Research Council<sup>177</sup> und den Rechtsverordnungen der Oberpfalz durchgeführt.

### **3.2 Patientendaten und Leberbiopsien**

Zur Aufklärung des adaptiven Pathomechanismus der ischämie-reperusionsbedingten Leberschädigung im Rahmen der humanen LTx wurden retrospektiv Daten und Materialien von 46 orthotopen LTx analysiert, die im Zeitraum vom 27.7.2011 bis einschließlich 14.5.2013 am Universitätsklinikum Regensburg durchgeführt wurden. Tatsächlich sind in der Studie 44 Patienten eingeschlossen. Da bei 2 dieser Patienten jeweils zweimal eine LTx stattfand, die jeweils beide in der Studie eingeschlossen sind, handelt es sich somit um insgesamt 46 in die Studie eingeschlossene LTx. Im Folgenden werden daher immer 46 Patientenfälle betrachtet. Die Verwendung von Leberbiopsien und Blutproben lebertransplantierter Patienten für IRS-bezogene genetische, histologische und laborchemische Analysen wurde von der Ethikkommission der Universitätsklinik Regensburg genehmigt (Zulassungsnummer der Ethikkommission 11-101-0163, Registriernummer des Zentrums für Klinische Studien in Regensburg Z-2012-0048-6). Alle eingeschlossenen Patienten sind erwachsene Empfänger AB0-kompatibler, ganzer Lebertransplantate, die ausschließlich von verstorbenen Spendern stammen. Pädiatrische Patienten, Empfänger von geteilten Lebern Verstorbener sowie Leberlebendspenden wurden aus der Studie ausgeschlossen. Es wurden von allen 46 Patienten zwei perioperative Biopsien des Transplantats histopathologisch untersucht. Die erste Biopsie wurde vor der Reperfusion am Ende der Kaltpräparation entnommen, während die zweite Biopsie nach der Reperfusion kurz vor dem abdominalen Bauchverschluss am Ende der Operation gewonnen wurde. Die Biopsien der Lebertransplantate von 21 der 46 Patienten wurden jeweils in zwei Teile geteilt, die dann separat in Formaldehydlösung (3.6) beziehungsweise RNA-Stabilisierungsreagenz (3.6) eingelegt wurden, um den histologischen (4.2.2) und genetischen Analysen (4.2.4) unterzogen zu werden. Von 6 Patienten wurden auch 2nd-Look-Biopsien ausgewertet, die im Zeitraum zwischen 1–2 Tagen nach Transplantation entnommen wurden.

### 3.3 Geräte und sonstige Materialien

**Tab. 3-1. Geräte und sonstige Materialien**

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer	FACS Canto™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eismaschine	Ziegra-Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Färbekammer mit Deckel	–	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen im Breisgau
Färbeküvette	–	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Färbeschiffchen	–	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gewebedissoziator	GentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Gewebeeinbettautomat	Shandon Hypercenter XP	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Heizplatte	Thermal Pad Model 712.0000.03	Shor-Line, Kansas City, Kansas, USA
Immunhistochemiefärbungsmodul	BenchMark Ultra Automated IHC/ISH slide staining system Ventana®	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA
Klinisch-chemisches Analysegerät	Dimension Vista® 1500 Analyzer	Siemens AG, München
Kryostat	Leica CM 1900	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kühlplatte	CP 60	Thermo Fisher Scientific, Microm International GmbH, Walldorf
Kühlzentrifuge	Heraeus® Megafuge® 1.0 R	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Magnetwand	MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research® Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroplattenlesegerät	EMax® Endpoint ELISA Microplate Reader	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riss
Mikroskop	Leica M 651	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom	Thermo Scientific™ Microm HM 350 S	Thermo Fisher Scientific, Microm International GmbH, Walldorf
Pipetten, 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1.000 µl	Eppendorf Research® Plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Präzisionswaage	LC 620 P	Sartorius AG, Göttingen
Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Thermocycler	LightCycler® 480 Real-Time PCR Instrument	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Thermomixer	ThermoMixer® compact	Eppendorf AG, Hamburg

**Tab. 3-1. Geräte und sonstige Materialien (Fortsetzung)**

Thermoseparator	ThermoMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Tischrundschtüttler	Certomat® R	Sartorius AG, Göttingen
Tischzentrifuge	PerfectSpin Mini	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Trockenschrank	ED 53	Binder GmbH, Tuttlingen
Ultraschallhomogenisator mit Ultraschallwandler	Sonopuls HD 2070 MS 72 UW 2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Umkehrmikroskop	Zeiss AxioVision Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Wärmestrahler	S-29-04	Albert Kerbl GmbH, Buchbach
Wasserbad	HIR-3	Kunz Instruments AB, Nynäshamn, Schweden

### 3.4 Operationsmaterialien

**Tab. 3-2. Operationsmaterialien**

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
Dewar	Dewar Transportgefäß Typ B	KGW-Isotherm Glastechnisches Werk – Schieder GmbH, Karlsruhe
Klemme	Aesculap® Yasargil® Phynox Aneurysm Clip	Aesculap AG, Tuttlingen
Klemmenhalter	Aesculap® Aneurysm Clip Applier	Aesculap AG, Tuttlingen
Nadelhalter, groß	Rochester Pean Forceps, 16 cm	Aesculap AG, Tuttlingen
Nadelhalter, klein	TC Mayo Hegar Needle Holder, BM 65	Aesculap AG, Tuttlingen
Ohrmarkenzange	Kleine Ohrmarkenzange	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Pinzette, gebogen	Octagon Forceps, Curved	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Pinzette, spitz	Mueller Micro Forceps, Black, 0,2 mm, 110 mm	Aesculap AG, Tuttlingen
Pinzette, stumpf, 13 cm	Stumpfe Pinzette, 18/8 Stahl	Laborinstrumente Gerd Schneider, Solingen
Pinzette, stumpf, 26 cm	Stumpfe Pinzette, 18/8 Stahl	Bochem Instrumente GmbH, Weilburg
Schere, spitz	Fine Scissors-Tungsten Carbide, Straight, 9 cm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Wundspreizer	Moria 7699 Speculum Retractor	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg

### 3.5 Verbrauchsmaterialien

**Tab. 3-3. Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Bezeichnung	Hersteller
Adhäsionsobjektträger	SuperFrost® plus	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen
ALT-96-Lochplatte	Costar® cell culture plate, 96 wells	Corning GmbH, Wiesbaden
Citrat-Monovette®	S-Monovette®, Gerinnung Citrat, 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Deckglas	DK22	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Einwegmikrotomklinge	Feather Disposable Microtome Blades	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Einwegmikrotomklinge	Leica Disposable Microtome Blades	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Einwegskalpell	Disposable scalpel Standard No. 10	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Einbettenschälchen für Paraffinschnitte	Histosette® I Biopsy Processing/Embedding Cassettes M 499-7	Simport Scientific Inc., Beloeil, Kanada
Einbettenschälchen für Kryostatschnitte	Cryomold® Intermediate, 15 x 15 x 5 mm	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen im Breisgau
ELISA-96-Lochplatte	Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Faden	GL 889 Polysorb™, 75cm, violet	Tyco Healthcare Deutschland GmbH, Neustadt an der Donau
Fettstift	Dako Pen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Gefäß, 0,5 ml	Multiply® Pro Gefäß, 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Gefäß, 1,5 ml	Safe-Lock Tube, 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Gewebedissoziationsröhrchen	gentleMACS™ C Tubes	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Glaskapillare	–	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Kanüle	BD Microlance™ Kanüle 30G ½, 0,29 x 13 mm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kleiner Probenbehälter	Small Sample Container Dimension Vista® System	Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn
Kompresse, 7,5 x 7,5 cm	ES-Kompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kompresse, 10 x 10 cm	ES-Kompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
24-Lochplatte	Costar® 24-well cell culture plate	Corning GmbH, Wiesbaden
Magnetsäule	MACS® M Column	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mikrofilter	MACS® LysateClear Column µ	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Natriumfluorid-Monovette®	S-Monovette®, Natriumfluorid, 2,7 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht

**Tab. 3-3. Verbrauchsmaterialien** (Fortsetzung)

Objektträger	SuperFrost® Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Ohrmarke	Ohrmarken für Labortiere	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
PCR-96-Loch-Mikrotiterplatte	LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Petrischale	Corning® Cell Culture Dish, 60 x 15 mm	Corning GmbH, Wiesbaden
Pflaster, 2,5 cm x 5 m	3M™Durapore™ Surgical Tape	3M Deutschland GmbH, Neuss
Pflaster, 1,25 cm x 9,1 m	3M™Durapore™ Surgical Tape	3M Deutschland GmbH, Neuss
Pipette, serologisch, 10 ml	Costar® 10 ml Stripette® Serological Pipets	Corning GmbH, Wiesbaden
Pipettenspitze, 0,1-10 µl	SafeSeal-Tips® premium, 0,1-10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitze, 20 µl	ART® Aerosol-Resistant Tips 20P Pipet Tips	Promega GmbH, Mannheim
Pipettenspitze, 100 µl	–	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitze, 200 µl	ART® Aerosol-Resistant Tips 200 Pipet Tips	Promega GmbH, Mannheim
Pipettenspitze, 1.000 µl	ART® Aerosol-Resistant Tips 1000 Pipet Tips	Promega GmbH, Mannheim
Pipettenspitze weiß, < 10 µl	Pipettenspitzen Sarstedt	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitze gelb, < 100 µl	Pipettenspitzen Sarstedt	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Pipettenspitze blau, < 1.000 µl	Pipettenspitzen Sarstedt	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Probenröhre, 5 ml	Flow Cytometry tube	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Rundbodenröhrchen, 2 ml	Corning® 2 ml External Threaded Polypropylene Cryogenic Vial	Corning GmbH, Wiesbaden
Röhrchen, Polypropylen, 15 ml	15 ml PP Cellstar® Tube	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhrchen, Polypropylen, 50 ml	50 ml PP Cellstar® Tube	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Salbe	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Serum-Monovette®	S-Monovette®, Serum Gerinnungsaktivator, 5,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Spritze	BD Plastipak™, Spritze, 1 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Verschlussfolie	LightCycler® 480 Sealing foil	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Wattestäbchen	Bel® Premium Wattestäbchen	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Zellfilter	BD Falcon™ Cell Strainers, 100 µm	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

### 3.6 Chemikalien und sonstige Stoffe

**Tab. 3-4. Chemikalien und sonstige Stoffe**

Reagenzien	Summenformel	Hersteller
Aceton, ≥ 99 %	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
α-Ketoglutar säure, ≥ 99 %	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Antikörperverdünnungslösung – Antibody Diluent	–	Ventana Medical Systems Inc., Tucson, Arizona, USA
BD GolgiStop™	–	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BSA (bovine serum albumin) – Blockierungslösung	–	Biomol GmbH, Hamburg
Calciumchlorid (0,5 M)	CaCl <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid)	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> ·2HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat, ≥ 99 %	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinitrophenylhydrazin, ≥ 99 %	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
D-L-Alanin, ≥ 99 %	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNase I	–	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) disodium salt dihydrate BioChemica	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> · 2H <sub>2</sub> O	AppliChem GmbH, Darmstadt
Einbettmedium – Tissue-Tek® OCT™ Compound	–	Sakura Finetek Germany GmbH, Stauf im Breisgau
Entellan – Entellan® Neu Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie	–	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin-Lösung, Eosin G-Lösung, 0,5 % wässrig für die Mikroskopie	–	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Erythrozyten-Auflösungspuffer – Erythrocyte Lysis Buffer	–	Qiagen GmbH, Hilden
Essigsäure, 100 %	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
FBS (fetal bovine serum)	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fixierungs-/ Permeabilisierungslösung – Fixation/Permeabilization solution	–	eBioscience Inc., Frankfurt
Fluoreszenzeindeckmedium – Dako® Fluorescence mounting Medium	–	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Formaldehydlösung, 4 % mit Natriumphosphatpuffer	CH <sub>2</sub> O	SG Planung, Holzkirchen
GIBCO® RPMI Medium 1640	–	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutamin	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hämalaunlösung – Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie	–	Merck KGaA, Darmstadt

**Tab. 3-4. Chemikalien und sonstige Stoffe (Fortsetzung)**

Hepes – 4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure	$C_8H_{18}N_2O_4S$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hydrogenchlorid (1 M)	HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ionomycin, 550 ng/ml	$C_{41}H_{70}CaO_9$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isofluran, $\geq 99\%$	$C_3H_2ClF_5O$	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Isopropanol, 70 %	$C_3H_8O$	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid	KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhydrogenphosphat, $\geq 99\%$	$KH_2PO_4$	Merck KGaA, Darmstadt
Ketamin, 5 %	–	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen
Kollagenase Typ 4 – Collagenase Type 4, 280 u/mg CLS4	–	CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf
Magnesiumchlorid (0,2 M)	MgCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mastermix – 2x QuantiFast® SYBR® Green PCR Master Mix	–	Qiagen GmbH, Hilden
Natriumcarbonat	$Na_2CO_3$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchloridlösung, isotone, 0,9 %	NaCl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat (100 mM)	–	Thermo Fisher Scientific Life Technologies GmbH, Darmstadt
Paraffin – Paraplast®, Bulk	–	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
PBS – Phosphatgepufferte Kochsalzlösung – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin-Streptomycin	$C_{21}H_{39}N_7O_{13}$ . $C_{16}H_{18}N_2O_4S$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Permeabilisierungspuffer – eBioscience™ Permeabilization Buffer (10x)	–	eBioscience Inc., Frankfurt
Phosphorsäure	$H_3PO_4$	Merck KGaA, Darmstadt
PMA – Phorbol-12-myristat-13-acetat, 50 ng/ml	$C_{36}H_{56}O_8$	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNase Dekontaminationsreagenz – RNase-ExitusPlus™	–	AppliChem GmbH, Darmstadt
RNase freies Wasser – RNase-free water	–	Qiagen GmbH, Hilden
RNA-Stabilisierungsreagenz – RNAlater® RNA Stabilization Reagent	–	Qiagen GmbH, Hilden
Schwefelsäure	$H_2SO_4$	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylbenzidin	$C_{16}H_{20}N_2$	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau, 0,5 %	–	Biochrom GmbH, Berlin
Tween – TWEEN® 20	–	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasser, steril – Millipore Sterile	–	Merck KGaA, Darmstadt

**Tab. 3-4. Chemikalien und sonstige Stoffe (Fortsetzung)**

Wasserstoffperoxid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Xylazin, 2 %	–	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Xylol (Isomerengemisch)	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	Merck KGaA, Darmstadt
Ziegenserum – goat serum	–	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 3.7 Kits

**Tab. 3-5. Kits**

Kit	Hersteller
Mouse IL-17 DuoSet® ELISA	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA Set BD OptEIA™	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
qMACS™ mRNA Isolation Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
qMACS™ One-step cDNA Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### 3.8 Antikörper

**Tab. 3-6. Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen**

	Antikörper	Hersteller
<b>Maus</b>	Alexa594	eBioscience Inc., Frankfurt
	CD 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
	Gr-1	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b>Human</b>	CD 3	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
	γδTCR	BioLegend GmbH, Fell

**Tab. 3-7. Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen**

	Antigen	Fluorochrom	Nummer	Hersteller
<b>Oberfläche</b>	CD3	APC-Cy7	47-0032	eBioscience Inc., Frankfurt
	CD4	APC	17-0041	eBioscience Inc., Frankfurt
	CD4	PE	12-0042	eBioscience Inc., Frankfurt
	CD8	PB (eFluor450)	48-0081	eBioscience Inc., Frankfurt
	CD27	PE-Cy7	25-0271	eBioscience Inc., Frankfurt
	γδTCR	APC	17-5711	eBioscience Inc., Frankfurt
	NK1.1	PE	12-5941	eBioscience Inc., Frankfurt
	NK1.1	PE-Cy7	25-5941	eBioscience Inc., Frankfurt
<b>Intrazellulär</b>	IFN-γ	FITC	11-7311	eBioscience Inc., Frankfurt
	IL-17A	PB	560522	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
	IL-17A	PE	12-7177	eBioscience Inc., Frankfurt

### 3.9 Primer

Tab. 3-8. Primer

	Bezeichnung	Gen	Nummer	Hersteller
<b>Maus</b>	Mm_CxCl1_1_SG	CXCL-1	QT00115647	Qiagen GmbH, Hilden
	Mm_GAPDH_3_SG	GAPDH	QT01658692	Qiagen GmbH, Hilden
	Mm_IL17a_2_SG	IL-17A	QT00103278	Qiagen GmbH, Hilden
	Mm_RORC_1_SG	RORC	QT00197722	Qiagen GmbH, Hilden
	Mm_TNF_1_SG	TNF- $\alpha$	QT00104006	Qiagen GmbH, Hilden
<b>Human</b>	Hs_CD3G_1_SG	CD3	QT00001477	Qiagen GmbH, Hilden
	Hs_CxCl1_1_SG	CXCL-1	QT00199752	Qiagen GmbH, Hilden
	Hs_GAPDH_2_SG	GAPDH	QT01192646	Qiagen GmbH, Hilden
	Hs_RORC_1_SG	RORC	QT00097888	Qiagen GmbH, Hilden
	Hs_TBX21_1_SG	T-Box 21	QT00042217	Qiagen GmbH, Hilden
	Hs_TNF_3_SG	TNF	QT01079561	Qiagen GmbH, Hilden
	Hs_TCRG_F	TCR $\gamma$ , vorwärts, Sequenz: cccccaagcccactattttc		F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz
	Hs_TCRG_R	TCR $\gamma$ , rückwärts, Sequenz: caagaagacaaaggtatgttccag		F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Schweiz

### 3.10 Puffer und Lösungen

Tab. 3-9. Puffer und Lösungen

<b>Beschichtungspuffer für den TNF<math>\alpha</math>-ELISA (maximal 7 Tage bei 2–8 °C lagern)</b>	
7,13 g NaHCO <sub>3</sub> (3.6)	pH bei 9,5 mit 10 N NaOH (3.6)
1,59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,1 M, pH 9,5) (3.6)	mit sterilem Wasser auf 1 l auffüllen
<b>KRB – Krebs-Ringer-Puffer – Krebs ringer buffer</b>	
9 g NaCl (3.6)	2,1 g NaHCO <sub>3</sub> (3.6)
0,4175 g KCl (3.6)	21 ml HEPES (10 M) (3.6)
0,99 g Glucose (3.6)	mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen
<b>Kulturmedium</b>	
500 ml GIBCO® RPMI Medium 1640 (3.6)	5 ml Glutamin (3.6)
5 ml Penicillin-Streptomycin (3.6)	10 % FBS (3.6)
<b>MACS-Puffer</b>	
0,37 g EDTA (3.6)	500 ml PBS (3.6)
2,5 g BSA (3.6)	
<b>PBS für die immunhistochemische Färbung der Mausleber</b>	
7,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (141,96 M) (3.6)	2,15 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (136,09 M) (3.6)
36 g NaCl (58,44 M) (3.6)	5 l destilliertes Wasser
<b>Probenverdünnungslösung (maximal 3 Tage bei 2–8 °C lagern)</b>	
PBS (3.10)	mit 10 % FBS (3.6), pH 7,0
<b>Vollmedium</b>	
4 $\mu$ l BD GolgiStop™/6 ml Endvolumen (3.6)	0,55 $\mu$ l Ionomycin/ml Endvolumen (3.6)
1 $\mu$ l PMA/ml Endvolumen (3.6)	Kulturmedium (3.10)

**Tab. 3-9. Puffer und Lösungen (Fortsetzung)**

<b>Waschpuffer für den IL-17- und TNF-<math>\alpha</math>-ELISA (maximal 3 Tage bei 2–8 °C lagern)</b>	
PBS (3.6)	mit 0,05 % Tween, pH 7,2–7,4 (3.6)
<b>Waschpuffer für die durchflusszytometrischen Analysen</b>	
100 $\mu$ l Permeabilisierungspuffer (3.6)	900 $\mu$ l steriles Wasser (3.6)

### 3.11 Computersoftware und Datenbanken

**Tab. 3-10. Computersoftware und Datenbanken**

<b>Produkt</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Bildverarbeitungsprogramm für die immunhistochemische Quantifizierung	ImageJ	Wayne Rasband von den National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
Durchflusszytometriesoftware	FlowJo®	Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA
GPT-Assay- und ELISA-Software	SoftMax® Pro 4	Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riss
Literaturverwaltungsprogramm	Citavi 3.3.0	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Patientendatenmanagementsystem	SAP®	SAP Deutschland SE & Co. KG, Walldorf
Patientendatenmanagementsystem für ICU, OP, Notfall	iMDsoft MetaVision®	Hillus Engineering KG, Krefeld
Schreibprogramm	Microsoft® Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Spender- und Transplantatdaten	Eurotransplant International Foundation	Eurotransplant International Foundation, Leiden, Niederlande
Statistiksoftware, klinische Studie	IBM® SPSS® Statistics 20	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
Statistiksoftware, Tiermodell	GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
Thermocycler-Software	LightCycler® 480 Software release 1.5.0	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Umkehrmikroskopsoftware	AxioVision Rel. 4.8.2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena

## **4 Methoden**

### **4.1 Methoden im Tiermodell**

#### **4.1.1 Tiermodell des Ischämie-Reperfusionsschadens**

Um die Schädigung der Leber durch Ischämie und Reperfusion erforschen zu können, wurde entsprechend dem Modell nach Abe et al.<sup>178</sup> ein partieller warmer IRS in Wildtypmäusen (3.1) induziert.

##### **Anästhesie**

Zur Betäubung der Tiere wurde eine Mischung aus 8 ml 5%igem Ketamin (3.6), 1 ml 2%igem Xylazin (3.6) und 1 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung (3.6) hergestellt. Das Gewicht der Tiere wurde jeweils vor der Injektion mithilfe einer Präzisionswaage (3.3) bestimmt. Mit einer Spritze (3.5) wurden jeweils 0,07 ml pro 20–23 g Körpergewicht in den rechten unteren Quadranten des Tieres intraperitoneal injiziert.

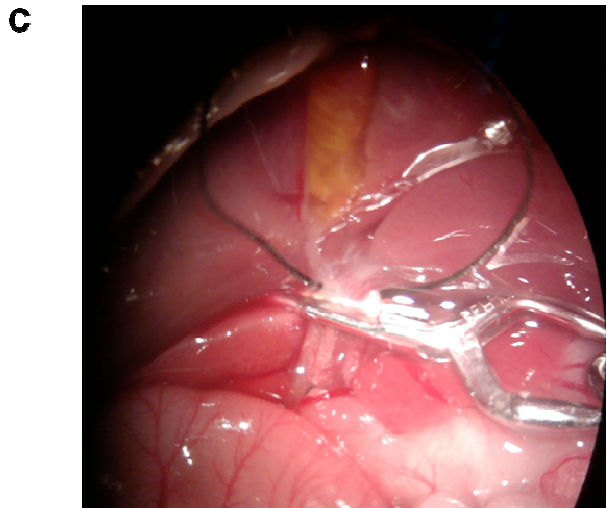
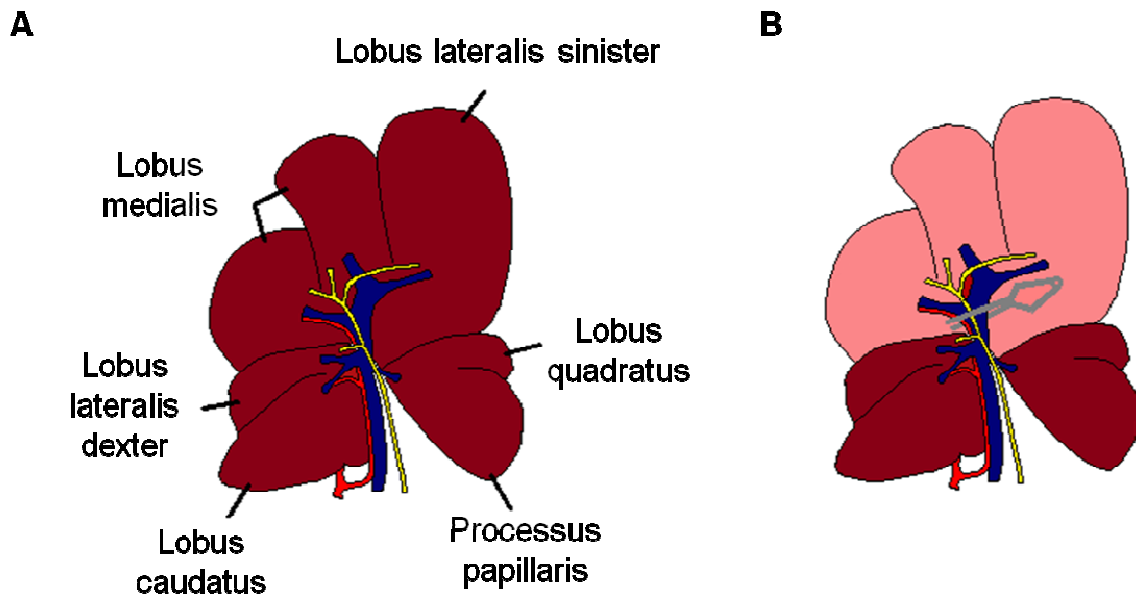
##### **Vorbereitung**

Die Tiere wurden mit Ohrmarken (3.5) mittels einer Ohrmarkenzange (3.4) gekennzeichnet. Das Fell der Tiere wurde bis knapp oberhalb des Xiphoids entfernt und die Haut mit Kompressen (3.5) und 70%igem Isopropanol (3.6) gereinigt. Um einer Auskühlung der Tiere entgegenzuwirken, wurden diese auf einer Heizplatte (3.3) operiert und dort für den Zeitraum der 90-minütigen Ischämie gelagert. Außerdem wurde zum Schutz der Augen eine Salbe (3.5) aufgetragen. Die Tiere wurden mit Pflaster (3.5) auf einer Unterlage fixiert. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde mittels fehlender Reaktion des Tieres auf manuellen Druck auf die untere Extremität sichergestellt.

##### **Laparotomie**

Mit einer spitzen Schere (3.4) und einer stumpfen Pinzette (3.4) wurde die Haut des Tieres beginnend in der Mittellinie unterhalb der Leber nach kranial bis oberhalb des Xiphoids inzidiert. Im nächsten Schritt wurde das Bauchfell mit einer gebogenen Pinzette (3.4) angehoben und eingeschnitten. Um die Wunde offen zu halten, wurden ein Wundspreizer (3.4), ein am Xiphoid und am Mikroskop (3.3) fixierter Nadelhalter (3.4) sowie ein an der Unterlage fixiertes Pflaster (3.5) eingesetzt. Um das Austrocknen der Bauchhöhle zu verhindern, wurde diese mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (3.6) angefeuchtet. Im nächsten Schritt wurden zwei Wattestäbchen (3.5) mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (3.6) angefeuchtet, um damit den Lobus medialis und Lobus lateralis sinister (Abb. 2 A) an

das Diaphragma nach kranial zu mobilisieren und das Darmkonvolut vorsichtig nach kaudal zu verschieben. Anschließend wurde mit einer spitzen Pinzette (3.4) das interlobuläre Bindegewebe zwischen Lobus lateralis sinister und Lobus quadratus (Abb. 2 A) vorsichtig getrennt, um die portale Trias besser zugänglich zu machen.



**Abb. 2. Anatomie der Mausleber.** Schematische Darstellung der Anatomie der Mausleber (A) und der Ischämie von Lobus medialis und Lobus lateralis sinister durch Abklemmen der Trias aus Vena portae (blau), Arteria hepatica propria (rot) und Ductus hepaticus communis (gelb), modifiziert nach Abe et al.<sup>178</sup> (B). Fotografie der ischämischen Lobus medialis und Lobus lateralis sinister. Der eingelegte Faden markiert die oben genannte Trias. Die im Bereich der entfärbten Lobus medialis und Lobus lateralis sinister liegende Gallenblase stellt sich gelb dar (C).

### Ischämie und Reperfusion

Zur Induktion der Ischämie wurde mithilfe eines Klemmenhalters (3.4) die Klemme (3.4) knapp proximal der Abzweigung zum Lobus lateralis dexter an der Vena portae, der Arteria hepatica propria und dem Ductus hepaticus communis angesetzt (Abb. 2 B und C). Der Lobus medialis und Lobus lateralis sinister, die zusammen ungefähr 70 % der Leber repräsentieren<sup>178</sup>, zeigten eine deutliche Entfärbung (Abb. 2 B und C). Während der

ischämischen Phase wurde die geöffnete Bauchhöhle mit einer angefeuchteten Kompresse (3.5) temporär bedeckt.

Nach 90-minütiger Ischämie wurde die Klemme (3.4) entfernt und die Leber reperfundiert. Die Reperfusion konnte visuell verifiziert werden, indem die blasse Farbe der ischämischen Leber innerhalb weniger Sekunden in das ursprüngliche Rotbraun umschlug.<sup>178</sup> Dann wurde nach erneutem Anfeuchten der Bauchhöhle die Wunde mit einem Faden (3.5) in durchgängiger Naht verschlossen. Postoperativ wurde die Körpertemperatur der Tiere durch einen Wärmestrahler (3.3) aufrechterhalten. Die scheinoperierten Tiere wurden derselben Prozedur unterzogen, inbegriffen der Anästhesie und Laparotomie, jedoch ohne Abklemmen der portalen Trias.

## 4.1.2 Laborchemische Diagnostik

Mithilfe der GPT als leberspezifischer Transaminase kann das Ausmaß des induzierten IRS der Leber in den Tieren näher betrachtet und quantifiziert werden. Die Tiere wurden 24 Stunden nach der Reperfusion in einem verschließbaren Glasbehälter inhalativ mit Isofluran (3.6) betäubt und mithilfe einer Glaskapillare (3.5) Blut aus dem retrobulbären Venenplexus gewonnen. Im Anschluss wurde das Blut jeweils in 1,5-ml-Gefäße (3.5) mit Granulat aus Serum-Monovetten® (3.5) überführt, 2-mal für 3 min bei 6.000 rpm zentrifugiert (3.3) und das Serum abpipettiert (3.3; 3.5), während die Blutbestandteile mit hoher Dichte am Boden des Gefäßes verworfen wurden. Das gewonnene Serum wurde sowohl zur laboreigenen Bestimmung der GPT im Rahmen des GPT-Assay (4.1.2.1) als auch im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg mit einem klinisch-chemischen Analysegerät (3.3) gemessen. Die Proben zur Bestimmung im Institut für Klinische Chemie wurden zuvor in einem kleinen Probenbehälter (3.5) 1:3 verdünnt, indem 167 µl Serum mit 333 µl PBS (3.6) vermischt wurden.

### 4.1.2.1 GPT-Assay

#### Probenvorbereitung

Das aus der retrobulbären Blutentnahme gewonnene Serum wurde 1:5 verdünnt, indem 5 µl Serum mit 20 µl PBS (3.6) in einem 1,5-ml-Gefäß (3.5) vermischt wurden. Anschließend wurde 100 µl Substratlösung ( $C_3H_7NO_2$  (3.6) (0,2 M in PBS, pH 7,5),  $C_5H_6O_5$  (3.6) (1,8 M in PBS, pH 7,5)) dazugegeben. Schließlich folgte ein einstündiger Inkubationsschritt auf einem Thermomixer (3.3) bei 37 °C und 1.400 rpm.

## Standard

Um eine Standardkurve mit den Konzentrationen 0, 23, 50, 83 und 125 pg/ml zu erhalten, wurden von der Standardlösung bestehend aus Natriumpyruvat (1,5 M in PBS, pH 7,5) (3.6) 0, 10, 20, 30 und 40 µl in 1,5-ml-Gefäße (3.5) pipettiert (3.3; 3.5), jeweils mit Substratlösung ( $C_3H_7NO_2$  (3.6) (0,2 M in PBS, pH 7,5),  $C_5H_6O_5$  (3.6) (1,8 M in PBS, pH 7,5)) auf 100 µl aufgefüllt und zu jeder Verdünnungsstufe zusätzlich 20 µl bidestilliertes Wasser hinzugefügt.

## Durchführung

Sowohl zu den Proben als auch zu den Standardverdünnungen wurden jeweils 100 µl Farbreagenz ( $C_6H_6N_4O_4$  (3.6) (20 mg/100 ml in 1 M HCL (3.6))) dazugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um nach diesen 20 min die Farbreaktion zu beenden, wurde 1 ml 0,4 M Natriumhydroxid (3.6) hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurden von den Proben und Standardverdünnungen jeweils 200 µl pro Vertiefung als Triplikate in eine ALT-96-Lochplatte (3.5) überführt und für 1 min bei 1.200 rpm zentrifugiert (3.3).

## Auswertung

Die Auswertung fand an einem Mikroplattenlesegerät (3.3) mithilfe einer GPT-Assay- und ELISA-Software (3.11) bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 490 nm statt. Nach manueller Eingabe der Probenlokalisierung, der Standardverdünnungen, des Verdünnungsfaktors 5 für die Proben sowie der Standardkonzentrationen wurden nach automatischer Erstellung der Standardkurve die Ergebnisse generiert.

### 4.1.3 Leberaufarbeitung

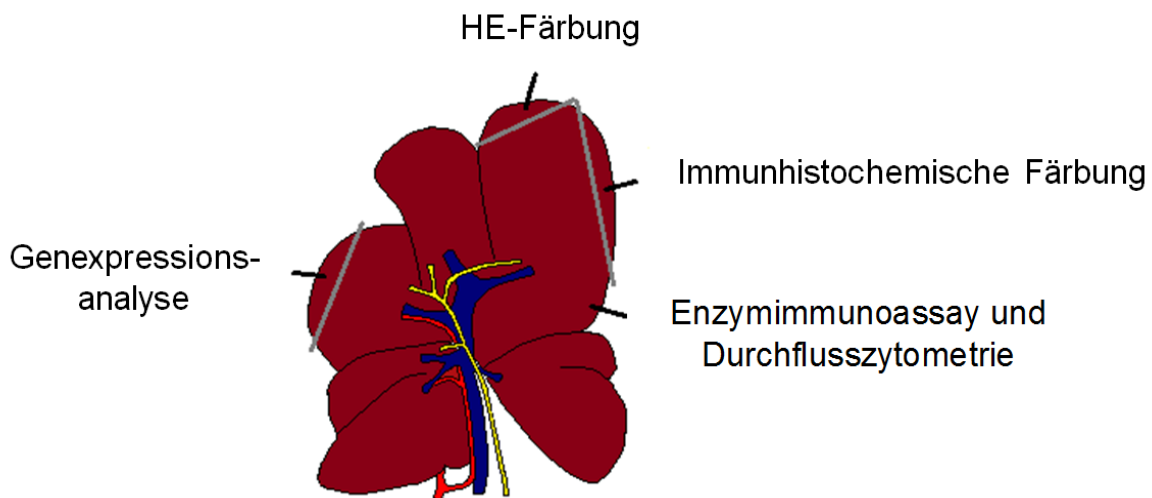
Um das Lebergewebe weiteren aufwendigen Analysen, wie histologischer, molekularbiologischer und durchflusszytometrischer Untersuchungen, zugänglich zu machen, bedurfte es zuvor einer sorgfältigen Entnahme und Aufteilung des Gewebes.

## Euthanasie

Die Euthanasie der Tiere wurde in einem durchsichtigen Behälter mittels ansteigender Kohlenstoffdioxidkonzentration durchgeführt. Die ansteigende Kohlenstoffdioxidkonzentration führt durch den direkt narkotisierenden Effekt zunächst zur Bewusstlosigkeit und schließlich durch die Hypoxie zum Tod.<sup>179</sup>

## Hepatektomie

Die Tiere wurden in Rückenlage mittels Kanülen (3.5) an den Extremitäten auf einer Korkplatte befestigt. Nach Befeuchtung des Fells mit 70%igem Isopropanol (3.6) wurden die Tiere mit einer spitzen Schere (3.4) ventral vom Beckenrand ausgehend nach kranial bis oberhalb des Xiphoids erneut eröffnet. Mit einem Wattestäbchen (3.5) wurden die ischämischen Leberlappen, bestehend aus Lobus medialis und Lobus lateralis sinister (Abb. 2), nach kranial mobilisiert, sodass der Blick auf die Porta hepatis mit der Arteria hepatica propria, der Vena portae und dem Ductus hepaticus communis frei wurde. Anschließend wurden die Porta hepatis sowie abgehende Gefäße der Leber mit einer spitzen Schere (3.4) durchtrennt, sodass die ischämischen Leberlappen mithilfe einer an der Gallenblase fixierten, gebogenen Pinzette (3.4) entnommen werden konnten. In einer kleinen Petrischale (3.5) wurden mit einem Einwegskalpell (3.5) drei kleine Leberanteile von der ischämischen Mausleber für die HE-Färbung von Paraffinschnitten (4.1.4.1), die immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten (4.1.4.2) sowie die Genexpressionsanalyse (4.1.5) abgetrennt (Abb. 3).



**Abb. 3. Ischämische Anteile der Tierleber zur weiteren Analyse.** Modifiziert nach Abe et al.<sup>178</sup>.

Der verbliebene Rest des Lobus medialis und Lobus lateralis sinister wurde mittels Präzisionswaage (3.3) gewogen, nach Entfernung der Gallenblase aufgearbeitet und anschließend für den Enzymimmunoassay (4.1.6), kurz ELISA, und die Durchflusszytometrie (4.1.7), kurz FACS, verwendet. Bis zur Weiterverarbeitung wurde der Leberanteil für die RT-PCR (4.1.5.2) in 2-ml-Rundbodenröhrchen (3.5) aufbewahrt. Der Anteil für die immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten (4.1.4.2) wurde mit Einbettmedium

(3.6) in Einbettenschälchen (3.5) fixiert, temporär in flüssigem Stickstoff im Dewar (3.4) gefroren und dann bei  $-80\text{ °C}$  aufbewahrt. Der Anteil für die HE-Färbung von Paraffinschnitten (4.1.4.1) wurde zunächst in Einbettenschälchen (3.5) gelagert und in Formaldehydlösung (3.6) fixiert.

### **Einzelzellsuspensionsgewinnung**

Nach Abtrennung der drei Leberanteile für die oben genannten experimentellen Verfahren wurden die übrig gebliebenen Anteile des Lobus medialis und Lobus lateralis sinister mit der MACS®-Technologie zur Erstellung von Einzelzellsuspensionen aufgearbeitet, womit eine hohe und reine Zellausbeute während der Zelltrennung erreicht werden kann<sup>180</sup>. Zur Abmessung der Volumina wurde eine Pipettierhilfe (3.3) verwendet. Die Gewebedissoziationsröhrchen (3.5) wurden zunächst mit einem Inkubationsmix, bestehend aus 4,4 ml KRB (3.10), 500  $\mu\text{l}$  Kollagenase-IV (3.6), 50  $\mu\text{l}$  Magnesiumchlorid (3.6), 20  $\mu\text{l}$  Calciumchlorid (3.6) und 25  $\mu\text{l}$  DNase (3.6), befüllt und für 30 min bei  $37\text{ °C}$  auf einem Tischrundschtüttler (3.3) inkubiert. Dann wurde die zuvor mit KRB (3.10) gewaschene Leber in den Inkubationsmix gegeben und in einem Gewebedissoziator (3.3) mit dem ersten Leberprogramm zerkleinert, für 30 min bei  $37\text{ °C}$  auf einem Tischrundschtüttler (3.3) inkubiert und anschließend ein zweites Mal im Gewebedissoziator (3.3) mit dem zweiten Leberprogramm weiter zerkleinert. Im nächsten Schritt wurde die Probe im Gewebedissoziationsröhrchen (3.5) für 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert (3.3), um dann den Überstand zu verwerfen. Anschließend wurden zur Resuspension 5 ml PBS (3.6) verwendet. Das resuspendierte Gewebe wurde im nächsten Schritt über einen Zellfilter (3.5) in ein 50-ml-Röhrchen (3.5) filtriert, verbliebene Leberreste im Gewebedissoziationsröhrchen (3.5) in weiteren 5 ml PBS (3.6) gelöst und in dasselbe 50-ml-Röhrchen (3.5) filtriert. Um kontaminierende Hepatozyten in dem 50-ml-Röhrchen (3.5) aus der Probe zu entfernen, wurde diese für 5 min bei 300 rpm zentrifugiert (3.3), sodass sich die Hepatozyten am Boden absetzten. Der Überstand wurde mit einer serologischen 10-ml-Pipette (3.3; 3.5) in ein weiteres 50-ml-Röhrchen (3.5) überführt, welches im nächsten Schritt für 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert (3.3) wurde. Der dabei entstandene Überstand wurde dann verworfen. Um das sich am Boden des 50-ml-Röhrchens (3.5) befindliche Pellet zu resuspendieren, wurden 1 ml PBS (3.6) und 9 ml erwärmter Erythrozyten-Auflösungspuffer (3.6) dazugegeben, mittels Schüttler (3.3) vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach schloss sich eine 5-minütige Zentrifugierung (3.3) bei 1.500 rpm an, um dann den Überstand wieder zu verwerfen. Anschließend wurde das Pellet mit 10 ml PBS (3.6) in dem 50-ml-Röhrchen (3.5) wieder resuspendiert und davon 10  $\mu\text{l}$  verwendet, um die enthaltenen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer zu quantifizieren. Zur Quantifizie-

ung wurden zu den 10 µl des mit PBS (3.6) resuspendierten Pellets 90 µl Trypanblau (3.6) gegeben und die entstandene 1:10-Verdünnung in einer ELISA-96-Lochplatte (3.5) gemischt. Dann wurden 10 µl der gemischten Verdünnung in die Zählkammer gegeben, die äußeren vier Quadranten ausgezählt und daraus die Zellzahl pro ml errechnet. Nach Wegnahme der 10 µl von dem resuspendierten Pellet für die Quantifizierung wurde der Rest noch 2-malig mit jeweils 5-minütiger Zentrifugierung (3.3), erneuter Zugabe von 10 ml PBS (3.6) und Verwerfung des Überstands gewaschen.

### **Zellaktivierung**

Unter einer Sterilbank wurde das aufgearbeitete resuspendierte Pellet aus der Einzellsuspensionsgewinnung in 1 ml Kulturmedium (3.10) überführt und gemischt, um dann in einer 24-Lochplatte (3.5) mit jeweils 100 µl Vollmedium (3.10) versetzt zu werden. Danach wurden die Zellen für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Vollmedium (3.10) enthält neben Kulturmedium auch PMA, Ionomycin und BD-GolgiStop™. Unter der Annahme, dass die Anzahl von Zellen, die ein bestimmtes Zytokin produzieren, sehr klein ist, wird eine externe Aktivierung durch unspezifische Stimulatoren, wie PMA oder Ionophor, erreicht.<sup>181</sup> Um dann die Zytokinsekretion und -akkumulation in der Zelle zu vermeiden, wird GolgiStop, auch Monesin genannt, verwendet.<sup>181</sup>

Im Anschluss an die abgeschlossene Inkubation wurden die Zellen aus der 24-Lochplatte (3.5) abgeerntet und bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert (3.3). Der dabei entstandene Überstand wurde jeweils in 1,5-ml-Gefäße (3.5) aliquotiert und für den ELISA (4.1.6) weiterverwendet, während das Pellet für die durchflusszytometrische Analyse (4.1.7) weiterverarbeitet wurde.

#### **4.1.4 Histologische Färbungen**

Neben der Beurteilung des Leberschadens anhand der Fläche nekrotischer Areale HE-gefärbter Gewebedünnschnitte wurde auch die Rolle des Immunsystems anhand der Beurteilung der Infiltration neutrophiler Granulozyten und CD3<sup>+</sup>-Zellen ins Lebergewebe histologisch exploriert.

#### 4.1.4.1 HE-Färbung von Paraffinschnitten

##### Durchführung

Die entsprechenden Anteile der ischämischen Tierleber zur HE-Färbung der Paraffinschnitte (4.1.3, Abb. 3) wurden nach einer mindestens eintägigen Fixierung in Formaldehydlösung (3.6) weiterverarbeitet. Die Entwässerung fand im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg mithilfe eines Gewebeeinbettautomatens (3.3) in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol (3.6) sowie Xylol (3.6) statt. Im Anschluss wurden die Proben in Paraffin (3.6) eingebettet und zum Schneiden aufgeblickt. Die Temperatur der Paraffinblöcke wurde auf einer Kühlplatte (3.3) gesenkt, um dann mittels Mikrotom (3.3) 4 µm starke Schnitte zu erstellen. Die Übertragung auf den Objektträger (3.5) erfolgte in einem 45 °C warmen Wasserbad (3.3), in dem die Schnitte gestreckt wurden. Nach einer einstündigen Lagerung in einem 50 °C warmen Trockenschrank (3.3) konnte mit der Entparaffinierung begonnen werden. Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur mithilfe von Färbeküvetten und -schiffchen (3.3) gefärbt.

##### Entparaffinierung

1. 10 min in Xylol (3.6)
2. 10 min in 100%iges Ethanol (3.6)
3. 5 min in 96%iges Ethanol (3.6)
4. 5 min in 70%iges Ethanol (3.6)

##### Färbung

1. 10 min in destilliertes Wasser
2. 5 min in Hämalaun (3.6)
3. 2 min in Leitungswasser bläuen
4. Kurz in destilliertem Wasser waschen
5. 2 min in mit 3–5 Tropfen Essigsäure (3.6) behandeltes Eosin (3.6)
6. Kurz in destilliertem Wasser waschen
7. 2 x kurz in 70%iges Ethanol (3.6)
8. 2 x 5 min in 96%iges Ethanol (3.6)
9. 2 x 5 min in 100%iges Ethanol (3.6)
10. 2 x 5 min in Xylol (3.6)
11. Eindecken mit Entellan (3.6) und Deckglas (3.5)

##### Auswertung

Das Ausmaß des Leberschadens wurde durch morphometrische Messung der HE-gefärbten Schnitte bestimmt, indem das Mess- und Analysesystem MosaiX der Umkehr-

mikroskopsoftware (3.11) verwendet wurde, bei dem der prozentuale Anteil der Nekrose anhand der totalen Mikrometerfläche von jeweils 5 Gewebedünnschnitten pro Tier kalkuliert wurde.

#### 4.1.4.2 Immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten

##### Durchführung

Nach Lagerung in Einbettmedium (3.6) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden von dem Anteil der Tierleber für die immunhistochemische Färbung (4.1.3, Abb. 3) mit einem Kryostaten (3.3) und Einwegmikrotomklingen (3.5) 4  $\mu\text{m}$  starke Schnitte erstellt. Die Schnitte wurden auf Adhäsionsobjektträgern (3.5) gelagert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

##### Färbung

Die Färbung wurde in einer Färbekammer mit Deckel (3.3) durchgeführt. Die Schnitte wurden für 5 min in Aceton (3.6) fixiert und dann für 1 Stunde getrocknet. Anschließend wurde das Gewebe auf dem Adhäsionsobjektträger (3.5) mit einem Fettstift (3.5) umrandet. Um das Gewebe anzufeuchten, wurden die Schnitte 2-mal für je 5 min in PBS (3.10) getaucht. Dann wurden die Schnitte, einschließlich der Negativkontrolle, mit 100  $\mu\text{l}$  des mit PBS (3.10) 1:10 verdünnten Ziegenserums (3.6) bedeckt und für 1 Stunde inkubiert, um unspezifische Reaktionen zu verhindern. Dann wurden die Schnitte 2-mal für je 5 min in PBS (3.10) gewaschen. Die Adhäsionsobjektträger (3.5), die Negativkontrollen ausgenommen, wurden mit 100  $\mu\text{l}$  der Primärantikörper für Gr-1 (3.8, Tab. 3-6) und CD3 (3.8, Tab. 3-6) in einer 1:100-Verdünnung mit PBS (3.10) für 30 min im Dunkeln gefärbt. Die Negativkontrollen wurden mit 100  $\mu\text{l}$  PBS (3.10) für 30 min inkubiert. Nach erneutem 2-maligem Waschen wurden die Adhäsionsobjektträger (3.5), einschließlich der Negativkontrollen, mit 100  $\mu\text{l}$  eines sekundären Alexa594-Ziegen-gegen-Ratten-Antikörpers (3.8, Tab. 3-6) (1:200) und DAPI (3.6) (1:10.000) für 1 Stunde im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut 2-mal für je 5 min in PBS (3.10) gewaschen. Dann wurden die Adhäsionsobjektträger (3.5) mit Fluoreszenzeindeckmedium (3.6) und Deckglas (3.5) bedeckt und mindestens 1 Tag lang getrocknet.

##### Auswertung

Mithilfe eines Umkehrmikroskops (3.3) wurde zur quantitativen Analyse Gr-1<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>-Zellen in den Leberdünnschnitten von scheinoperierten und IRS-Tieren die Anzahl der Zellen in den nekrotischen Bereichen mittels Auswertung von 5 Gesichtsfeldern pro Tier in 200-facher Vergrößerung bestimmt.

## 4.1.5 Genexpressionsanalyse

Mithilfe der Genexpressionsanalyse wurden die am IRS beteiligten immunologischen Faktoren näher untersucht. Um das Genexpressionsmuster in Zellen und Geweben analysieren zu können, ist es notwendig, mRNA zu isolieren. Mit der RT-PCR werden die mRNA-Zielsequenzen *in vitro* amplifiziert.<sup>182</sup> In dem experimentellen Verfahren der reversen Transkription wird diese mRNA dann in cDNA umgewandelt, die als Vorlage für die Amplifikation der DNA genutzt wird.<sup>183</sup> Die amplifizierte DNA kann beispielsweise anhand eines Fluoreszenzsignals quantifiziert werden.

### 4.1.5.1 Messenger-RNA-Isolierung und reverse Transkription

Die mRNA ist das Produkt transkribierter Gene und enthält die Informationen, welche die Aminosäuresequenz eines Proteins festlegen.<sup>182</sup> Die RNA-Isolierung ist mit dem Risiko der Degradierung der RNA durch Ribonukleasen, sogenannten RNasen, diffizil, da RNasen zu den widerstandsfähigsten Enzymen gehören.<sup>182</sup> Daher ist es erforderlich, alle benötigten Materialien mit RNase-Inhibitoren zu behandeln beziehungsweise spezielle RNase-freie Reagenzien zu verwenden.<sup>182</sup> Im Rahmen der reversen Transkription wird dann die gewonnene mRNA in cDNA umgewandelt, die für das Analyseverfahren der RT-PCR genutzt werden kann.<sup>182</sup>

#### Durchführung

Zunächst wurden sämtliche Oberflächen mit RNase-Dekontaminationsreagenz (3.6) gereinigt. Es wurde das qMACS™-mRNA-Isolation-Kit (Tab. 4-1; 3.7) verwendet, welches eine direkte Isolierung der mRNA ohne vorherige Aufarbeitung der Gesamt-RNA ermöglicht.<sup>184</sup> Die darauffolgende cDNA-Synthese mit dem qMACS™-One-step-cDNA-Kit<sup>185</sup> (Tab. 4-2; 3.7) erfolgte in demselben Gefäß, wodurch weniger Material verloren geht.<sup>184</sup> Beide Kits wurden bei 4 °C gelagert. Die Magnetkügelchen (Tab. 4-1) stellen die Hauptkomponente dieses speziellen Verfahrens dar, da sie mit dem Adenylrest, einer Kette von Adenosinmonophosphaten am 3' Ende eukaryontischer mRNA<sup>186</sup>, hybridisieren. Dabei wird die magnetisch markierte mRNA in der Magnetsäule (3.5) festgehalten, während der Rest des Filtrats hindurchfließt und verworfen wird.<sup>184</sup>

Die Tierproben für die RT-PCR (4.1.3, Abb. 3) wurden ohne Stabilisierungsreagenz bei -20 °C gelagert. Diese wurden zusammen mit 1 ml Lyse-/Bindepuffer (Tab. 4-1) in 15-ml-Röhrchen (3.5) überführt, wobei der Lyse-/Bindepuffer SDS<sup>184</sup> enthält, welches Protein-

strukturen denaturiert<sup>187</sup>. Anschließend wurde das Gewebe mittels Ultraschallhomogenisator (3.3) zerkleinert. Um den dabei entstandenen Schaum zu entfernen, wurden die 15-ml-Röhrchen (3.5) für 2 min bei 1.500 rpm zentrifugiert (3.3). Dann wurde das lysierte Gewebe in Mikrofilter (3.5) überführt und wieder für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (3.3). Im nächsten Schritt wurden 50 µl Magnetkügelchen (Tab. 4-1) zu den Filtraten hinzugefügt und gemischt. Die mit den Magnetkügelchen markierten Filtrate wurden dann jeweils in die zuvor mit 100 µl Lyse-/Bindepuffer (Tab. 4-1) befeuchteten Magnetsäulen (3.5), die am Thermoseparator (3.3) der Magnetwand (3.3) befestigt waren, überführt. Im letzten Schritt der RNA-Isolierung wurde die Magnetsäule (3.5) 2-mal mit 200 µl Lyse-/Bindepuffer (Tab. 4-1) gespült und schließlich 4-mal mit 100 µl Waschpuffer (Tab. 4-1) gewaschen, um DNA und rRNA zu entfernen<sup>184</sup>.

**Tab. 4-1. qMACS™ mRNA Isolation Kit<sup>184</sup> (3.7)**

Komponenten	Bezeichnung	Bestandteile
Lyse-/Bindepuffer	Lysis/Binding Buffer	Hoher Salzgehalt 1 % SDS
Magnetkügelchen	Oligo(dT) MicroBeads	Nicht sedimentierende Microbeads mit Oligo(dT) <sub>25</sub> konjugiert
Waschpuffer	Wash Buffer	Geringer Salzgehalt NaCl Tris-HCl EDTA

**Tab. 4-2. qMACS™ One-step cDNA Kit<sup>185</sup> (3.7)**

Komponenten	Bezeichnung	Bestandteile
Äquilibrierungs-/Waschpuffer	Equilibration/Wash Buffer	–
Resuspensionspuffer	Resuspension Buffer	–
Gefriergetrockneter Enzymmix	Lyophilized Enzyme Mix	Reverse Transkriptase dNTPs
Dichtungslösung	Sealing Solution	–
cDNA-Freisetzungslösung	Release Solution	–
Elutionspuffer	Elution Buffer	RNase-freies Wasser

Anschließend wurde mit der cDNA-Synthese in jeweils derselben Magnetsäule (3.5) fortgeföhren, indem 2-mal mit 100 µl Äquilibrierungs-/Waschpuffer (Tab. 4-2) nachgespült wurde. Im nächsten Schritt wurde mit jeweils 20 µl Resuspensionspuffer (Tab. 4-2) der gefriergetrocknete Enzymmix (Tab. 4-2) aufgelöst. Es wurden jeweils 20 µl des resuspendierten Enzymmix (Tab. 4-2) auf die Magnetsäulenmatrix pipettiert (3.3; 3.5). Um einer Verdunstung des Enzymmix (Tab. 4-2) entgegenzuwirken, wurde jeweils 1 µl Dichtungslö-

sung (Tab. 4-2) direkt auf die Magnetsäulenmatrix gegeben. Nach Erhöhung der Temperatur des Thermoseparators (3.3) auf 42 °C und einer Inkubationszeit von 1 Stunde wurde die Magnetsäule (3.5) 2-mal mit 100 µl Äquilibrierungs-/Waschpuffer (Tab. 4-2) gespült, um dann im letzten Schritt der cDNA-Synthese die Magnetsäule (3.5) mit jeweils 20 µl cDNA-Freisetzungslösung (Tab. 4-2) für 10 min bei 42 °C zu inkubieren. Danach wurde die synthetisierte cDNA mittels 50 µl Elutionspuffer (Tab. 4-2) aus der Magnetsäule (3.5) gelöst, in ein 0,5-ml-Gefäß (3.5) überführt und bei –20 °C gelagert.

#### 4.1.5.2 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Prinzipiell erfolgt ein Zyklus der PCR in drei Schritten. Im ersten Schritt erfolgt die Auftrennung der Vorlage durch thermische Denaturierung in Einzelstränge (Melting).<sup>188</sup> Im nächsten Schritt erfolgt die spezifische Hybridisierung zweier verschiedener Oligonukleotidprimer an die jeweiligen Einzelstränge (Annealing) der DNA.<sup>188</sup> Im letzten Schritt fügt eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase dNTP, die Bausteine der DNA, an die Primer an, sodass die Einzelstränge zu Doppelsträngen komplementiert werden (Elongation/Extension).<sup>188</sup> Dabei werden in einer ideal ablaufenden Reaktion eines Zyklus von jeder Vorlage zwei komplette Moleküle synthetisiert, was dann als 100%ige Effizienz beziehungsweise eine Effizienz mit dem Wert 2 definiert wird.<sup>183</sup> Der Nachweis der amplifizierten DNA erfolgt mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR®-Green-I, der sich unter Ausstrahlung eines Fluoreszenzsignals in die doppelsträngige DNA einlagert, die mit jedem Zyklus verdoppelt wird.<sup>189</sup> Die Fluoreszenzsignale werden von dem Thermocycler detektiert, wobei die Zunahme der Fluoreszenz direkt proportional zur Zunahme der DNA ist.<sup>183</sup> Für jede zu messende Probe werden die Fluoreszenzsignale in einen numerischen Wert konvertiert.<sup>183</sup> Dabei ermöglicht es die Thermocycler-Software, den Verlauf der Amplifikationskurve für jede einzelne Probe auf dem Monitor mitzuverfolgen.<sup>183</sup>

#### Durchführung

Es wurde cDNA von scheinoperierten Tieren und Tieren mit induziertem IRS untersucht. Die cDNA sowie der Mastermix (3.6) wurden bei –20 °C gelagert. Die RT-PCR wurde mit einem Thermocycler (3.3) bei einem gesamten Reaktionsvolumen von 25 µl (Tab. 4-4) unter Verwendung einer PCR-96-Loch-Mikrotiterplatte (3.5) auf Eis (3.3) durchgeführt. Die verdünnte cDNA und die zur Herstellung des Reaktionsmix (Tab. 4-4) verwendeten Substanzen wurden vor Gebrauch mit einem Schüttler (3.3) aufgelockert und einer Tischzentrifuge (3.3) kurz herunterzentrifugiert. In alle Wells, einschließlich Standard und Negativkontrollen, wurden 22,5 µl Reaktionsmix (Tab. 4-4) vorgelegt. Anschließend wurden 2,5 µl

der 1:10 verdünnten cDNA (Tab. 4-4) als Triplikat dazu pipettiert (3.3; 3.5). Für jede Platte wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle Komponenten des Reaktionsansatzes (Tab. 4-4) bis auf cDNA enthielt. Dadurch konnte eine Kontamination des Reaktionsmix mit DNA ausgeschlossen werden, um sicherzugehen, dass bei den zu messenden Proben keine falsch positiven Ergebnisse resultierten.<sup>189</sup> Vor der Messung im Thermocycler (3.3) wurden die pipettierten Platten mit einer Verschlussfolie (3.5) luftdicht verschlossen und anschließend für mindestens 2 min bei 1.500 rpm zentrifugiert (3.3).

**Tab. 4-3. Tier- und Humanproben: Programm der Thermocycler-Software (3.11)**

Schritt	Temperatur	Zeitdauer
Initiale Aktivierung	95 °C	300 s
Denaturierung	95 °C	10 s
Annealing/Extension	60 °C	30 s
Schmelzkurve	95 °C	1 s
	62 °C	1 s
Kühlung	40 °C	1 s

**Tab. 4-4. Tierproben: RT-PCR-Reaktionsansatz für GAPDH, TNF- $\alpha$ , CXCL-1, IL-17A und RORc**

Reaktionsansatz	Komponenten	Bestandteile	Volumen
1:10 verdünnte cDNA	1 $\mu$ l cDNA		2,5 $\mu$ l
	9 $\mu$ l RNase-freies Wasser (3.6)		
Reaktionsmix	Mastermix (3.6), QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (3.7)	HotStarTaq® Plus DNA Polymerase	12,5 $\mu$ l
		QuantiFast® SYBR® Green PCR Puffer mit Tris·Cl, KCl, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> , Q-Bond®, SYBR® Green I, andere Zusatzstoffe	
		dNTP-Mix aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP	
		ROX	
		RNase-freies Wasser (3.6)	
	RNase-freies Wasser (3.6)	7,5 $\mu$ l	
	Primer (3.9)	2,5 $\mu$ l	
Gesamtvolumen			25 $\mu$ l

## Auswertung

Für die Auswertung mit einer Thermocycler-Software (3.11) wurden zunächst die Schmelzkurven ermittelt und davon die ersten Ableitungen dieser Kurven erstellt, wodurch Kurven mit Peaks resultieren, welche die Schmelztemperatur  $T_m$  angeben.<sup>189</sup> Wird die richtige DNA amplifiziert, das heißt, die Proben sind nicht mit unspezifischer DNA kontaminiert, dann weichen die  $T_m$  der Triplikate einer Probe nicht voneinander ab. Dagegen weisen verschiedene  $T_m$  darauf hin, dass unspezifische Produkte gebildet wurden.<sup>189</sup> Kurven mit Peaks einer niedrigeren  $T_m$  als derjenigen spezifischer PCR-Produkte deuten auf die Bildung von Primerdimeren hin.<sup>189</sup> Wenn bei den Triplikaten der Tierpro-

ben die Schmelztemperaturen um mehr als 0,5 °C voneinander abwichen, wurden diese Proben aus der Wertung genommen.

Die Quantifizierung der mRNA-Expressionslevel erfolgte in den drei Schritten der absoluten, der relativen sowie der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung. Um die absolute Quantifizierung, das heißt die absolute Menge eines Zielgens angegeben als Kopienzahl oder Konzentration, zu bestimmen, ist es notwendig, eine Standardkurve zu erstellen.<sup>189</sup> Dabei müssen die Primerbindestellen der Standardproben und die Zielsequenzen der Probenzielgene identisch sein, was bei der Amplifikation sowohl der Standardproben als auch der Probenzielgene eine äquivalente Effizienz gewährleistet,<sup>189</sup> die im Bereich zwischen 1,8–2 liegen sollte. Bei einer Messverdünnung der Proben von 1:10 wurden für die Standardreihe im Mausmodell die Verdünnungsstufen 1:2, 1:5, 1:20, 1:50 verwendet, wobei die dafür eingesetzte cDNA aus einem Pool bestand, der die gleiche Menge an cDNA jeder Probe enthielt. Von der Software wurden dann die  $C_p$ -Werte, auch als  $C_T$ -Werte<sup>190</sup> bezeichnet, berechnet, indem die Maximalpunkte der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve kalkuliert wurden<sup>189</sup>. Der  $C_T$ -Wert stellt den Zyklus dar, bei dem die durch die akkumulierenden PCR-Produkte entstehende Fluoreszenz einen fixen Schwellenwert übersteigt, der sich in der exponentiellen Phase der Amplifikationskurve befindet.<sup>190</sup> Je größer die Menge der cDNA im Reaktionsansatz ist, desto früher wird der  $C_T$ -Wert erreicht.<sup>190</sup> Wenn die Amplifikation des Zielgens zu einem sehr späten Zyklus stattfindet, ist der  $C_T$ -Wert sehr hoch und es muss in Betracht gezogen werden, dass Amplifikationsinhibitoren anwesend waren, eine unspezifische Amplifikation stattgefunden hat oder eine Kontamination in sehr geringer Konzentration vorgelegen hat.<sup>191</sup> Proben mit  $C_T$ -Werten über 35 Zyklen wurden aus der Wertung genommen.

Bei der relativen Quantifizierung im Rahmen der internen Kontrolle wurde das Verhältnis von der Menge des Probenzielgens zu der Menge eines Referenzgens der jeweils gleichen Probe bestimmt.<sup>189</sup> Als solches Referenzgen dient ein sogenanntes House-keeping-Gen, dessen Expression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen oder in unterschiedlichen Zuständen des gleichen Gewebes, wie zum Beispiel erkranktes im Vergleich zu gesundem Gewebe, nicht variiert, sodass dessen Expressionslevel als Referenzwert für die Quantifizierung verwendet werden kann.<sup>189</sup> Hierfür wurde ein Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, die GAPDH, verwendet.<sup>190</sup> Da die Amplifikationseffizienzen des Referenzgens und des Probenzielgens aufgrund unterschiedlicher Primerbindestellen, Produktsequenzen und PCR-Produktgrößen verschieden sind, musste sowohl für das Referenzgen als auch für das Probenzielgen eine Standardkurve erstellt werden.<sup>189</sup> Die Mengen der Probenzielgene und des Referenzgens wurden jeweils durch Vergleich ihrer  $C_T$ -Werte mit deren korrespondierenden Standardkurven ermittelt.<sup>189</sup>

Im nächsten Schritt der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung wurden die Verhältnisse zwischen der Menge des Zielgens der Probe und dem Referenzgen derselben Probe<sup>189</sup> anhand der Formel  $\Delta C_T = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen})$  kalkuliert.<sup>190</sup>

#### 4.1.6 Enzymimmunoassay

Um die Expression des hauptsächlich von Makrophagen gebildeten Zytokins TNF- $\alpha$  und des Zytokins IL-17A zu quantifizieren, wurden leberinfiltrierende mononukleäre Zellen aus der Einzelzellsuspensionsgewinnung (4.1.3, Abb. 3) von IRS- und scheinoperierten Tieren verwendet. Dazu wurde im Anschluss an die Zellaktivierung (4.1.3) der Überstand der 24-Lochplatte (3.5) abgeerntet und in 5-ml-Probenröhren (3.5) überführt, um dann bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert (3.3) zu werden. Der dabei entstandene Zellkulturüberstand wurde jeweils in 1,5-ml-Gefäße (3.5) aliquotiert und als Probe im Rahmen des ELISA quantifiziert.

##### 4.1.6.1 TNF- $\alpha$

Zur Durchführung des TNF- $\alpha$ -ELISA wurde das Mouse-TNF-(Mono/Mono)-ELISA-Set-BD-OptEIA™ (3.7) mit monoklonalen Antikörpern gegen Maus-TNF, biotinylierten monoklonalen Antikörpern gegen Maus-TNF, Streptavidin-Meerrettichperoxidase sowie rekombinatem Maus-TNF als Standard verwendet.<sup>192</sup> Alle Reagenzien mussten vor Einsatz auf Raumtemperatur erwärmt werden.

##### Fänger- und Detektionsantikörper

Als Fängerantikörper wurden die mit Beschichtungspuffer (3.10) 1:250 verdünnten, monoklonalen Antikörper gegen Maus-TNF verwendet. Der Detektionsantikörper stellt den biotinylierten monoklonalen Antikörper gegen Maus-TNF dar, der in einer Verdünnung von 1:500 mit einer Probenverdünnungslösung (3.10) eingesetzt wurde. Die als Enzymreagenz funktionierende Streptavidin-Meerrettichperoxidase wurde mithilfe des 1:500 verdünnten Detektionsantikörpers auf 1:250 verdünnt, wobei diese Verdünnung dann als aktivierter Detektor eingesetzt werden konnte.

##### Vorbereitung der Standardverdünnungen

Als Standard wurde das rekombinante Maus-TNF verwendet, das in lyophilisierter Form bis zum Verfallsdatum stabil ist. Nach Erwärmung des lyophilisierten Standards wurde

dieser bei einer Dauer von mindestens 15 min in 1 ml entionisiertem Wasser gelöst und damit eine Standardstammlösung hergestellt, die maximal 6 Monate bei  $-80\text{ °C}$  gelagert werden kann. Aus der Standardstammlösung wurde die höchste Standardkonzentration mit 1.000 pg/ml und entionisiertem Wasser hergestellt. Zur Erstellung der 7 Standardverdünnungsstufen mit den Nummern 1–7 in absteigender Konzentration wurden 1,5-ml-Gefäße (3.5) verwendet. Die Gefäße (3.5) mit den Nummerierungen 2–7 wurden jeweils mit 500  $\mu\text{l}$  Probenverdünnungslösung (3.10) befüllt. Aus dem ersten Gefäß mit der höchsten Konzentration von 1.000 pg/ml wurde 500  $\mu\text{l}$  entnommen und in das zweite Gefäß gegeben, vermischt und schließlich aus dem zweiten Gefäß wiederum 500  $\mu\text{l}$  entnommen und in das dritte Gefäß überführt, sodass daraus 7 Standardverdünnungsstufen mit den Konzentrationen 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 und 15,6 pg/ml resultierten.

### **Vorbereitung der Lochplatte**

Die Vertiefungen der ELISA-96-Lochplatte (3.5) wurden mit jeweils 50  $\mu\text{l}$  des 1:250 verdünnten Fängerantikörpers abgedeckt über Nacht bei  $4\text{ °C}$  inkubiert. Danach wurden die Vertiefungen entleert und unter Zuhilfenahme einer Mehrkanalpipette (3.3) insgesamt 3-mal mit jeweils 150  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (3.10) gewaschen und zwischen den Waschsritten jeweils die in der Lochplatte (3.5) befindliche Flüssigkeit sorgfältig entleert. Anschließend wurden zur Blockade jeweils 100  $\mu\text{l}$  Probenverdünnungslösung (3.10) aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde erneut 3-mal gewaschen.

### **Durchführung**

Von jeder Probe und jeder der 7 Standardverdünnungsstufen wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  pro Vertiefung als Duplikat aufgetragen und mit einer Klebefolie verschlossen für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem 5-fachen Waschschrift mit jeweils 150  $\mu\text{l}$  Waschpuffer (3.10) wurden jeweils 50  $\mu\text{l}$  des aktivierten Detektors auf die Platte aufgetragen und abgedeckt für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 5-mal gewaschen. Dann wurden 50  $\mu\text{l}$  Substratlösung (Farbreagenzien  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3.6) und  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$  (3.6)) aufgetragen und in einem 30-minütigen Inkubationsschritt abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde mit jeweils 25  $\mu\text{l}$  Stopplösung (1 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (3.6) oder 2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3.6)) die Farbreaktion unterbrochen.

### **Auswertung**

Die Auswertung fand an einem Mikroplattenlesegerät (3.3) unter Verwendung einer GPT-Assay- und ELISA-Software (3.11) statt. Innerhalb von 30 min nach der Stoppreaktion

wurde bei einer Wellenlänge  $\lambda$  von 450 nm nach manueller Eingabe der Probenlokalisierung sowie Standardverdünnungen und -konzentrationen automatisch die Standardkurve erstellt und daraus die Ergebnisse generiert.

#### **4.1.6.2 IL-17A**

Der IL-17A-ELISA wurde mit dem Mouse-IL-17-DuoSet®-ELISA-Kit (3.7) mit Ratten-gegen-Maus-IL-17-Antikörper, biotinyliertem Ziegen-gegen-Maus-IL-17-Antikörper, Streptavidin-Meerrettichperoxidase sowie rekombinantes Maus-IL-17 als Standard durchgeführt.<sup>193</sup> Alle Reagenzien mussten vor Einsatz auf Raumtemperatur erwärmt werden.

##### **Fänger- und Detektionsantikörper**

Der Fängerantikörper stellt den Ratten-gegen-Maus-IL-17-Antikörper dar. Die Lagerung fand bei 4 °C in einer Konzentration von 360 µg/ml in PBS (3.6) für maximal 60 Tage statt. Der Antikörper wurde in einer Arbeitskonzentration von 2 µg/ml eingesetzt, wofür 5,56 µl der 360-µg/ml-Konzentration mit 994,44 µl PBS (3.6) versetzt wurden. Der Detektionsantikörper ist der biotinylierte Ziegen-gegen-Maus-IL-17-Antikörper, der in einer Konzentration von 72 µg/ml mit Reagenzlösung (1 % BSA (3.6) in PBS (3.6), pH 7,2–7,4) bei 2–8 °C für maximal 60 Tage gelagert werden kann. Der Antikörper wurde in einer Arbeitskonzentration von 400 ng/ml eingesetzt, wofür 55,55 µl der 72-µg/ml-Konzentration mit 9944,44 µl Reagenzlösung (1 % BSA (3.6) in PBS (3.6), pH 7,2–7,4) versetzt wurden. Die Streptavidin-Meerrettichperoxidase diente als Enzymreagenz, die bei 2–8 °C für maximal 6 Monate gelagert werden kann. Mittels Reagenzlösung (1 % BSA (3.6) in PBS (3.6), pH 7,2–7,4) wurde entsprechend der Angabe auf der Ampulle verdünnt.

##### **Vorbereitung der Standardverdünnungen**

Der Standard stellt ein rekombinantes Maus-IL-17 dar und wurde in einer Konzentration von beispielsweise 105 ng/ml in Reagenzlösung (1 % BSA (3.6) in PBS (3.6), pH 7,2–7,4) bis maximal 6 Monate bei –70 °C gelagert. Die Standardkonzentration variiert je nach geliefertem Kit. Vor Erstellung der 7 Standardverdünnungsstufen wurde der Standard für mindestens 15 min auf einem Thermomixer (3.3) in leichter Bewegung gehalten. Die höchste Standardkonzentration sollte 1.000 pg/ml in Reagenzlösung (1 % BSA (3.6) in PBS (3.6), pH 7,2–7,4) enthalten. Dazu wurden bei einer Standardkonzentration von beispielsweise 105 ng/ml 9,52 µl des Standards mit 990,48 µl der Reagenzlösung (1 % BSA (3.6) in PBS (3.6), pH 7,2–7,4) vermischt und ausgehend davon 6 weitere Standardver-

dünnungsstufen in einer 2-fach seriellen Verdünnungsreihe erstellt, wodurch Konzentrationen von 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 und 15,6 pg/ml resultierten.

### **Vorbereitung der Lochplatte**

Im ersten Schritt wurden jeweils 50 µl des verdünnten Fängerantikörpers in jede Vertiefung der ELISA-96-Lochplatte (3.5) pipettiert (3.3; 3.5) und über Nacht bei Raumtemperatur abgedeckt inkubiert. Im zweiten Schritt wurden nach der Inkubation die Vertiefungen entleert, mithilfe einer Mehrkanalpipette (3.3) 3-mal mit je 200 µl Waschpuffer (3.10) gewaschen und jeweils die in der Platte befindliche Flüssigkeit entleert. Anschließend konnte mit der Blockade fortgefahren werden, indem 150 µl Reagenzlösung (1 % BSA (3.6) in PBS (3.6), pH 7,2–7,4) in jede Vertiefung pipettiert (3.3; 3.5) und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Schließlich wurden entsprechend dem zweiten Schritt die Vertiefungen erneut gewaschen.

### **Durchführung**

Von jeder Probe und jeder der 7 Standardverdünnungsstufen wurden jeweils 50 µl pro Vertiefung als Duplikat pipettiert (3.3; 3.5) und mit einer Klebefolie verschlossen für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Vertiefungen entleert und mithilfe einer Mehrkanalpipette (3.3) 3-mal mit je 200 µl Waschpuffer (3.10) gewaschen. Dann wurden jeweils 50 µl des verdünnten Detektionsantikörpers in jede Vertiefung pipettiert (3.3; 3.5) und erneut für 2 Stunden mit einer Klebefolie verschlossen bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum wurde nach Entleerung der Vertiefungen ein 3-maliger Waschschrift mit je 200 µl Waschpuffer (3.10) durchgeführt, um anschließend 50 µl der verdünnten Streptavidin-Meerrettichperoxidase in jede Vertiefung zu pipettieren (3.3; 3.5) und lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur zu inkubieren. Nach einem erneuten 3-maligen Waschschrift mit je 200 µl Waschpuffer (3.10) wurden 50 µl der Substratlösung (1:1 Farbreagenzien  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3.6) und  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$  (3.6)) aufgetragen und lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Farbreaktion mit jeweils 25 µl Stopplösung (2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3.6)) unterbrochen.

### **Auswertung**

Die Auswertung fand unmittelbar nach der Stoppreaktion an einem Mikroplattenlesegerät (3.3) mithilfe einer GPT-Assay- und ELISA-Software (3.11) bei einer ersten Wellenlänge  $\lambda$  von 450 nm und einer zweiten Wellenlänge  $\lambda$  von 570 nm statt, wobei die Messergebnisse der zweiten Wellenlänge von denen der ersten Wellenlänge subtrahiert wurden. Nach manueller Eingabe der Probenlokalisierung sowie der Standardverdünnungen und -kon-

zentrationen wurden nach automatischer Erstellung der Standardkurve die Ergebnisse generiert.

#### 4.1.7 Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse stellt ein Verfahren dar, sowohl intrazelluläre Proteine als auch Oberflächenantigene von Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper zu identifizieren, um Zellgemische zu analysieren.<sup>194</sup> Die Oberflächenantigene sind für die verschiedenen Zellen des Immunsystems charakteristisch und werden als CD-Antigene bezeichnet.<sup>194</sup> Die markierten Zellen werden in einem Probengefäß elektrisch aufgeladen, um dann einzeln einen Laserstrahl zu passieren, der den Fluoreszenzfarbstoff anregt.<sup>194</sup> Wenn die Zelle den Laserstrahl passiert, streut sie das einfallende Laserlicht in alle Richtungen, wobei zwischen dem Vorwärtsstreulicht, kurz FSc, und dem Seitwärtsstreulicht, kurz SSc, unterschieden wird.<sup>195</sup> Das FSc einer Zelle korreliert näherungsweise mit deren Zellgröße während das SSc mit der Granularität oder anderen intrazellulären Komplexen, wie zum Beispiel Vakuolen, korreliert.<sup>195</sup> Geeignete Detektoren erfassen das FSc und SSc und wandeln deren Energie in ein elektrisches Signal um, das proportional zur Lichtintensität ist.<sup>195</sup> Anhand der Fluoreszenzsignale wird die Anzahl der jeweiligen Zellen in einer Grafik dargestellt, in der jeder Punkt eine Zelle darstellt.<sup>194</sup>

##### Durchführung

Die FACS-Analyse wurde mit dem Durchflusszytometer FACSCanto™-II (3.3) durchgeführt, welcher bis zu acht Fluoreszenzfarbstoffe detektieren kann.<sup>196</sup> Das aus der Zellaktivierung im Rahmen der Leberaufarbeitung hervorgegangene Pellet (4.1.3, Abb. 3) wurde in 5-ml-Probenröhren (3.5) mit MACS-Puffer (3.10) unter Zuhilfenahme eines Schüttlers (3.3) resuspendiert. Da das Durchflusszytometer maximal acht Farbstoffe pro Lauf detektieren kann, wurde jede Probe für zwei verschiedene Ansätze (Tab. 4-5 A und B; Tab. 4-6 A und B) jeweils auf 5-ml-Probenröhren (3.5) aufgeteilt und mit MACS-Puffer (3.10) auf 2 ml aufgefüllt. Dann wurden diese resuspendierten Zellen bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert (3.3). Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem zweiten Waschschrift mit 1 ml MACS-Puffer (3.10) wieder resuspendiert, zentrifugiert (3.3) und der Überstand wieder verworfen.

## Oberflächenfärbung

Im nächsten Schritt der Oberflächenfärbung wurden die aufgeteilten Proben jeweils mit 100 µl Mastermix zweier Ansätze (Tab. 4-5 A und B) versetzt und für 15 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Mastermixe wurden in zwei Ansätzen entsprechend der unten stehenden Tabellen (Tab. 4-5 A und B) angefertigt.

Wenn mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden, besteht die Möglichkeit der Fluoreszenzüberlagerung durch die überlappenden Emissionsspektren.<sup>197</sup> Beispielsweise werden FITC und PE bei 488 nm angeregt, wobei deren maximale Emissionspeaks bei 520 nm beziehungsweise 575 nm liegen.<sup>197</sup> Da jedoch die Emissionswellenlänge dieser Fluoreszenzfarbstoffe relativ breit ist, findet trotz des Einsatzes von Filtern eine Überlappung zwischen den beiden Emissionen statt.<sup>197</sup> Die Programme des Durchflusszytometers eliminieren diese Überlappungen der Fluoreszenz, was als Kompensation bezeichnet wird.<sup>197</sup> Um praktischerweise diese Kompensation einzustellen, wurde für jeden Fluoreszenzfarbstoff jeweils eine 5-ml-Probenröhre (3.5) als Kompensationsröhrchen mitgemessen. Zur Kompensation der Überlappung der Fluoreszenzfarbstoffe wurde von jedem Fluorochrom ein Kompensationsröhrchen mit Leberzellen einer C57BL/6-Wildtypmaus (3.1) erstellt, indem die jeweils in den Tab. 4-5 A und B angegebenen Mengen des entsprechenden fluoreszenzfarbstoffmarkierten Antikörpers mit 100 µl MACS-Puffer (3.10) versetzt wurden.

**Tab. 4-5. Durchflusszytometrie-Mastermix für die Oberflächenfärbung**

<b>A</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Menge in µl/Probe</b>
<b>Antikörper</b>	CD3	APC-Cy7 (3.8, Tab. 3-7)	1
	CD27	PE-Cy7 (3.8, Tab. 3-7)	1
	γδTCR	APC (3.8, Tab. 3-7)	1,25
	NK1.1	PE (3.8, Tab. 3-7)	1
	Aqua		0,1
<b>Puffer</b>	MACS-Puffer (3.10)		95,65

<b>B</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Menge in µl/Probe</b>
<b>Antikörper</b>	CD3	APC-Cy7 (3.8, Tab. 3-7)	1
	CD4	APC (3.8, Tab. 3-7)	1
	CD8	PB (eFluor450) (3.8, Tab. 3-7)	0,625
	NK1.1	PE-Cy7 (3.8, Tab. 3-7)	1
	Aqua		0,1
<b>Puffer</b>	MACS-Puffer (3.10)		96,275

Zur Negativkontrolle, die ungefärbte Zellen einer C57BL/6-Wildtypmaus (3.1) enthält, wurde lediglich 100 µl MACS-Puffer (3.10) zugegeben. Diese ungefärbten Zellen sind notwendig, um vor der eigentlichen Messung der Proben die Detektorspannung des Durchflusszytometers (3.3) für das FSc und SSc manuell einzustellen. Im Anschluss wurden sowohl die zu messenden Proben als auch die Kompensationsröhrchen mit 1 ml MACS-Puffer (3.10) gewaschen, bei 1.500 rpm für 5 min zentrifugiert (3.3) und der Überstand verworfen, um ungebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper zu entfernen.

### **Intrazelluläre Färbung**

Im Anschluss an die Oberflächenfärbung wurde mit der Prozedur der intrazellulären Färbung fortgefahren. Dabei wurde zunächst eine Fixierungs-/Permeabilisierungslösung (3.6) verwendet. Die fixierten Zellen werden durch Reagenzien, wie Saponin, permeabilisiert, was den Antikörpern ermöglicht ins Zytoplasma einzudringen, um mit intrazellulär akkumulierten Zytokinen zu reagieren.<sup>181</sup> Daher ist es notwendig, die Oberflächenfärbung einer Zelle vor der intrazellulären Färbung durchzuführen, da sonst durch die permeabilisierte Membran die Oberflächenantikörper auch intrazelluläre Bereiche anfärben würden.

Zur Durchführung der intrazellulären Färbung wurden im nächsten Schritt die zu messenden Proben und die entsprechenden Kompensationsröhrchen jeweils mit 500 µl Fixierungs-/Permeabilisierungslösung (3.6) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte dann die intrazelluläre Färbung, wozu im ersten Schritt die inkubierten Proben für 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert (3.3) wurden und der Überstand verworfen wurde. Um die Reste der Fixierungs-/Permeabilisierungslösung (3.6) zu entfernen, wurden die Proben und Kompensationsröhrchen mit 1 ml Waschpuffer (3.10) in einem Schüttler (3.3) gewaschen, für 5 min bei 1.500 rpm zentrifugiert (3.3) und der Überstand verworfen. Dann wurden die Kompensationsröhrchen mit 100 µl Waschpuffer (3.10) vermischt, während die Proben aus Ansatz A der Oberflächenfärbung (Tab. 4-5 A) mit 100 µl des Ansatzes A der intrazellulären Färbung (Tab. 4-6 A) versetzt wurden. Dasselbe wurde für den jeweils anderen Teil der aufgeteilten Proben in Ansatz B (Tab. 4-5 B; Tab. 4-6 B) durchgeführt. Alle Proben und Kompensationsröhrchen wurden dann auf Eis (3.3) gestellt und abgedunkelt für 40 min inkubiert. Im letzten Schritt vor der Messung im Durchflusszytometer (3.3) wurden die Proben und Kompensationsröhrchen nochmals mit 1 ml Waschpuffer (3.10) gewaschen, zentrifugiert (3.3) und abgeschüttet, um danach wieder mit 300 µl Waschpuffer (3.10) versetzt zu werden. Zu den ungefärbten Zellen wurden zusätzlich 200 µl Waschpuffer (3.10) gegeben.

**Tab. 4-6. Durchflusszytometrie-Mastermix für die intrazelluläre Färbung**

<b>A</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Menge in µl/Probe</b>
<b>Antikörper</b>	IFN-γ	FITC (3.8, Tab. 3-7)	1
	IL-17A	PB (3.8, Tab. 3-7)	1,5
<b>Puffer</b>	Waschpuffer (3.10)		98

<b>B</b>	<b>Antigen</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Menge in µl/Probe</b>
<b>Antikörper</b>	IFN-γ	FITC (3.8, Tab. 3-7)	1
	IL-17A	PE (3.8, Tab. 3-7)	1
<b>Puffer</b>	Waschpuffer (3.10)		98

## Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einer speziellen Durchflusszytometriesoftware (3.11). Nach Auswahl von Gerätekonfiguration, Erstellung eines Experiments und Auswahl der Parameter und verwendeten Fluorochrome (Tab. 4-5 A und B; Tab. 4-6 A und B) wurde die Kompensationsautomatik gestartet. Dazu wurden mithilfe der Messung der ungefärbten Zellen die Grundspannungen des Detektors für FSc und SSc sowie der Schwellenwert eingestellt, ab dem bestimmte Zellen oder Zellschrott nicht miterfasst werden. Mithilfe des Fluorochroms und Vitalfarbstoffs Aqua wurde zwischen vitalen und toten Zellen unterschieden. Im nächsten Schritt wurde mit den für jeden Fluoreszenzfarbstoff vorbereiteten Kompensationsröhrchen die Kompensation berechnet. Nach der Einstellung der Durchflussrate, des Stoppziels und der Stoppzeit konnte mit der Messung der einzelnen Proben begonnen werden. Die verschiedenen Zellpopulationen konnten durch gegenseitiges Auftragen der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe in X-Y-Diagrammen aufgetrennt und quantifiziert werden.

### 4.1.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung der experimentellen Verfahren des Tiermodells wurde mit der Statistiksoftware GraphPad-Prism-5.0 (3.11) durchgeführt. Alle Werte wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Die Daten wurden mit dem einpaarigen, zweiseitigen t-Test ausgewertet. Der statistische Vergleich mehrerer verschiedener Gruppen wurde mit ANOVA durchgeführt, gefolgt von einem Posttest mittels Bonferronivergleich aller Paare. Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden signifikant gewertet.

## 4.2 Methoden der klinischen Studie

### 4.2.1 Datenerfassung

Um sowohl die Auswirkung verschiedener Spendercharakteristika auf die Entwicklung eines IRS als auch auf die Organqualität zu untersuchen, wurden verschiedene Spendervariablen ausgewertet. Ebenso wurden einige Empfängercharakteristika analysiert.

#### 4.2.1.1 Spenderdaten

Folgende Spenderdaten wurden von Eurotransplant (3.11) eingeholt: Geschlecht, Alter, BMI, Auftreten hypotensiver Perioden und Asystolien, letzte Medikation und letzte Transfusionen (Noradrenalin, Kortikoide, Blut), verwendete Perfusionslösungen und -volumina, Vorerkrankungen (arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus), Daten über Alkohol-, Nikotin- und Drogenkonsum, Laborparameter ( $\gamma$ -GT, AP, Albumin, Fibrinogen, Quick, Kreatinin, Harnstoff, Kalium, Glucose, HbA1c, LDH, CK, CKMB, GPT, GOT, Bilirubin, Natrium) und intensivmedizinische Aufenthaltsdauer. Der Steatosegrad der Spenderlebern wurde vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg festgelegt.

#### 4.2.1.2 Empfängerdaten

Die Informationen über die Anwesenheit eines histopathologischen IRS sowie zellulärer Abstoßungsreaktionen binnen 6 Wochen nach LTx wurden den Befunden des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg entnommen. Daten über Alter, Geschlecht, BMI, Grunderkrankungen und Überleben nach LTx wurden dem klinikumsinternen Patientendatenmanagementsystem SAP® (3.11) entnommen. Das Sterbedatum zur Berechnung der Überlebenszeit extern verstorbener Patienten wurde durch den behandelnden Hausarzt ermittelt. Daten bezüglich einer Dialyse vor LTx sowie des Lab- und Exceptional-MELD wurden von Eurotransplant (3.11) eingeholt. Der Anteil der HU-LTx konnte den Operationsablaufdokumenten aus dem Patientendatenmanagementsystem SAP® (3.11) entnommen werden. Die Ischämiezeiten wurden mithilfe der Operationsablaufdokumente aus dem Patientendatenmanagementsystem SAP® (3.11) und der Spenderdaten von Eurotransplant (3.11) berechnet und als Gesamtischämiezeit, Kaltischämiezeit und Warmischämiezeit dargestellt. Die Gesamtischämiezeit errechnet sich aus der Addition von Kalt- und Warmischämiezeit. Die Kaltischämiezeit ist definiert als Zeitraum

zwischen der Transplantatektomie des Spenders bis zur Implantation im Empfänger, während die Warmischämiezeit den Zeitraum von der Implantation bis zur Reperfusion darstellt.

## 4.2.2 Histologische Färbungen

Die Spenderleberstanzbiopsien der Patienten (3.2) wurden im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg bezüglich eines IRS beurteilt. Außerdem wurden immunhistochemische Färbungen für CD3 und  $\gamma\delta$ TCR durchgeführt.

### 4.2.2.1 HE-Färbung von Paraffinschnitten

#### Durchführung

Die Leberstanzbiopsien (3.2) wurden vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg HE-gefärbt. Dazu wurden die Leberstanzbiopsien (3.2) für etwa 2 Stunden in 4%iger Formaldehydlösung (3.6) gelagert. Die Entwässerung fand analog der Entwässerung der Tierproben statt (4.1.4.1). Im Anschluss wurden die Proben in Paraffin (3.6) eingebettet, die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte (3.3) ausgehärtet und zum Schneiden in 3  $\mu$ m starke Schnitte aufgeblickt. Die Übertragung auf Objektträger (3.5) erfolgte in einem Wasserbad, in dem die Schnitte gestreckt wurden. Anschließend konnte mit der Entparaffinierung für 30 min in einem 72 °C heißen Wärmeschrank, der HE-Färbung und der Eindeckung mit Entellan (3.6) fortgefahren werden. Zum Teil wurden neben der HE-Färbung zur weiteren diagnostischen Beurteilung Sonderfärbungen mit PAS, EVG und Eisen durchgeführt. Der pathologische Befund wurde temporär im klinikumsinternen Patientendatenmanagementsystem SAP® (3.11) gespeichert.

### 4.2.2.2 Immunhistochemische Färbung von Kryostatschnitten

#### Durchführung

Die immunhistochemischen Färbungen für CD3 (3.8, Tab. 3-6) und  $\gamma\delta$ TCR (3.8, Tab. 3-6) der Leberstanzbiopsien (3.2) von 21 der 46 Patienten wurden vom Institut für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt. Die Entwässerung fand analog der Entwässerung der Tierproben statt (4.1.4.1). Die Lagerung in Formaldehydlösung (3.6), das Einbetten und das Schneiden erfolgte analog der für die HE-Färbung vorgesehenen Par-

affinschnitte, wobei mit dem Mikrotom etwa 1–2 µm starke Schnitte hergestellt wurden. Die immunhistochemische Färbung wurde automatisiert mit einem Immunhistochemiefärbungsmodul (3.3) durchgeführt, wobei die CD3-Antikörper (3.8, Tab. 3-6) in einer 1:300-Verdünnung und die  $\gamma\delta$ TCR-Antikörper (3.8, Tab. 3-6) in einer 1:50-Verdünnung mit Antikörperverdünnungslösung (3.6) eingesetzt wurden. Schließlich wurden die Leberdünnschnitte mit Entellan (3.6) und Deckgläsern (3.5) eingedeckt.

### **Auswertung**

Die mit einem Umkehrmikroskop (3.3) fotografierten Bereiche wurden mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (3.11) ausgewertet, mit dem die positiv gefärbten Zellen unterstützt quantifiziert werden konnten. Die Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen wurde gesondert in Leberläppchen und Portalfelder untersucht. Zur Quantifizierung der lobulären Bereiche wurde von jeder CD3-gefärbten Leberbiopsie der Mittelwert der Anzahl CD3<sup>+</sup>-Zellen von 10 Gesichtsfeldern in 200-facher Vergrößerung gebildet, wobei Areale ausgezählt wurden, die keine Portalfelder enthielten. Alle komplett einsehbaren Portalfelder der CD3-gefärbten Biopsien wurden ausgewertet, indem die Zelldichte jedes einzelnen Portalfelds anhand der Anzahl CD3<sup>+</sup>-Zellen pro Fläche in mm<sup>2</sup> berechnet und anschließend der Mittelwert aus den einzelnen Zelldichten bestimmt wurde, wobei das Mess- und Analyssystem einer Umkehrmikroskopsoftware (3.11) zur Berechnung der Fläche herangezogen wurde. Die Anzahl der Portalfelder pro Leberstanzbiopsie variierte dabei abhängig von der Größe der Schnittfläche von 1–12. Zur relativen Quantifizierung wurde pro Patient der Quotient aus Mittelwert der Leberstanzbiopsie nach Reperfusion zum Mittelwert der Leberstanzbiopsie vor Reperfusion bestimmt, jeweils für den lobulären und den portalen Bereich. Eine Quantifizierung der  $\gamma\delta$ TCR-gefärbten Leberdünnschnitte war aufgrund einer zu geringen Infiltration  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen nicht möglich, wobei hierfür Positivkontrollen auf Dünnschnitten von Adenoiden mitgeführt wurden.

### **4.2.3 Laborchemische Diagnostik**

Mithilfe der Erfassung und Auswertung die Leber betreffender Laborparameter konnte insbesondere der postoperative Verlauf in Bezug auf die An- oder Abwesenheit eines IRS bei den Patienten (3.2) analysiert werden. Im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg wurde die laborchemische Diagnostik mithilfe eines klinisch-chemischen Analysegeräts (3.3) durchgeführt. Die Ergebnisse der Blutanalysen wurden temporär im klinikumsinternen Patientendatenmanagementsystem SAP® (3.11)

gespeichert, wobei die in *Tab. 4-7* aufgeführten laborchemischen Parameter präoperativ sowie am 1.–7. POT analysiert wurden.

**Tab. 4-7. Humane Blut- und Serumanalysen**

Probe	Menge	Behältnis	Indikation	Parameter
Serum	1 x 7,5 ml	Serum-Monovette® (3.5)	Leberzellschaden	GPT
				GOT
				GLDH
			Cholestase	Gesamtbilirubin
				γ-GT
AP				
Gerinnung	1 x 5 ml	Citrat-Monovette® (3.5)	Syntheseleistung	Faktor V
Plasma	1 x 2,7 ml	Natriumfluorid-Monovette® (3.5)	Stoffwechselendprodukt	Laktat

Die Werte des intraoperativen Laktats wurden mittels arterieller Blutgasanalyse ermittelt und vom Verantwortlichen der Anästhesie im Beatmungsprotokoll halbstündlich festgehalten. Die postoperativen Laktatwerte der arteriellen Blutgasanalyse wurden aus dem Patientendatenmanagementsystem iMDsoft-MetaVision® (3.11) bezogen.

## 4.2.4 Genexpressionsanalyse

Um die Rolle der im Mausmodell detektierten immunologischen Faktoren bei der humanen orthotopen LTx zu explorieren, wurde die RT-PCR durchgeführt. Von 21 der 46 Patienten (3.2) wurden die Leberstanzbiopsien, die unmittelbar vor und etwa 2 Stunden nach Reperfusion entnommen wurden, untersucht. Von 6 dieser 21 Patienten (3.2) wurden zusätzlich 2nd-Look-Biopsien analysiert.

### 4.2.4.1 Messenger-RNA-Isolierung und reverse Transkription

#### Durchführung

Vor Beginn der RNA-Isolierung wurden die humanen Leberbiopsien (3.2) in RNA-Stabilisierungsreagenz (3.6) bei  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Dafür wurden etwa  $10\text{ }\mu\text{l}$  RNA-Stabilisierungsreagenz (3.6) pro mg Gewebe verwendet.<sup>198</sup> Anschließend konnte das Gewebe bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.<sup>198</sup> Die weitere Aufarbeitung erfolgte analog dem Tiermodell (4.1.5.1) unter Verwendung des qMACS™-mRNA-Isolation-Kit (3.7) und qMACS™-One-step-cDNA-Kit (3.7).

#### 4.2.4.2 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

##### Durchführung

Die cDNA sowie der Mastermix (3.6) wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Thermocycler-Software (3.11) wurde analog dem Tiermodell programmiert (4.1.5.2, Tab. 4-3).

**Tab. 4-8. Humanproben: RT-PCR-Reaktionsansatz für GAPDH, CD3, TNF- $\alpha$ , CXCL-1, TBX-21 und RORc**

Reaktionsansatz	Komponenten	Bestandteile	Volumen
1:5 verdünnte cDNA	1 $\mu\text{l}$ cDNA		2 $\mu\text{l}$
	4 $\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser (3.6)		
Reaktionsmix	Mastermix (3.6), QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (3.7)	HotStarTaq® Plus DNA Polymerase	10 $\mu\text{l}$
		QuantiFast® SYBR® Green PCR Puffer mit Tris·Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $\text{MgCl}_2$ , Q-Bond®, SYBR® Green I, andere Zusatzstoffe (3.7)	
		dNTP-Mix aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP	
		ROX	
		RNase-freies Wasser (3.6)	
		RNase-freies Wasser (3.6)	
Primer (3.9)	2 $\mu\text{l}$		
Gesamtvolumen			20 $\mu\text{l}$

**Tab. 4-9. Humanproben: RT-PCR-Reaktionsansatz für TCR $\gamma$**

Reaktionsansatz	Komponenten	Bestandteile	Volumen	
1:5 verdünnte cDNA	1 $\mu\text{l}$ cDNA		2 $\mu\text{l}$	
	4 $\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser (3.6)			
Reaktionsmix	Mastermix (3.6), QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit (3.7)	HotStarTaq® Plus DNA Polymerase	10 $\mu\text{l}$	
		QuantiFast® SYBR® Green PCR Puffer mit Tris·Cl, KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , $\text{MgCl}_2$ , Q-Bond®, SYBR® Green I, andere Zusatzstoffe (3.7)		
		dNTP-Mix aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP		
		ROX		
		RNase-freies Wasser (3.6)		4 $\mu\text{l}$
		TCRG-Vorwärtsprimer (3.9)		2 $\mu\text{l}$
TCRG-Rückwärtsprimer (3.9)	2 $\mu\text{l}$			
Gesamtvolumen			20 $\mu\text{l}$	

Für die humanen Zielgene GAPDH, TNF- $\alpha$ , CXCL-1, CD3, TBX-21 und RORc bestand der Reaktionsmix für jede Probe aus den in Tab. 4-8 angegebenen Substanzen. Abweichend davon wurde für das Zielgen TCR $\gamma$  der in Tab. 4-9 angegebene Reaktionsmix ver-

wendet. Die verdünnte cDNA und die zur Herstellung des Reaktionsmix (Tab. 4-8; Tab. 4-9) verwendeten Substanzen wurden vor Gebrauch mit einem Schüttler (3.3) aufgelockert und mithilfe einer Tischzentrifuge (3.3) kurz herunterzentrifugiert. Aufgrund von nur begrenzt vorhandenem Material wurde für die humane Analyse die RT-PCR mit einem Thermocycler (3.3) bei einem gesamten Reaktionsvolumen von nur 20 µl unter Verwendung einer PCR-96-Loch-Mikrotiterplatte (3.5) auf Eis (3.3) durchgeführt. In alle Wells, einschließlich Standard und Negativkontrollen, wurden 18 µl des Reaktionsmix (Tab. 4-8; Tab. 4-9) vorgelegt, um anschließend 2 µl der 1:5 verdünnten cDNA je Probe als Duplikat dazu zu pipettieren (3.3; 3.5). Für jede Platte wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die alle Komponenten des Reaktionsansatzes bis auf cDNA enthielt. Vor der Messung in einem Thermocycler (3.3) wurden die Platten mit einer Verschlussfolie (3.5) luftdicht verschlossen und dann für mindestens 2 min bei 1.500 rpm zentrifugiert (3.3).

### Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einer Thermocycler-Software (3.11). Wichen die Schmelztemperaturen der jeweiligen Duplikate der humanen Proben um mehr als 0,5 °C voneinander ab, so wurden diese Proben aus der Wertung genommen. Die Auswertung erfolgte, abgesehen von Messverdünnung und Verdünnungsstufen der Standardreihe für die absolute Quantifizierung, analog dem Tiermodell (4.1.5.2). Proben mit C<sub>T</sub>-Werten über 35 Zyklen wurden aus der Wertung genommen. Bei einer Messverdünnung der Proben von 1:5 wurden zur relativen Quantifizierung für die Standardreihe die Verdünnungsstufen 1:3, 1:6, 1:12, 1:24, 1:36 und 1:50 verwendet, wobei die dafür eingesetzte cDNA aus einem Pool bestand, der jede Proben-cDNA in gleicher Menge enthielt. Der Wert ΔC<sub>T</sub> aus der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung wurde jeweils analog dem Tiermodell (4.1.5.2) berechnet. Wie im Folgenden dargestellt, wurden jeweils die relativen Expressionsunterschiede einer Probe »nach Reperfusion« versus »vor Reperfusion« beziehungsweise »2nd-Look« versus »vor Reperfusion« berechnet.

$$\text{Nach Reperfusion/vor Reperfusion} = \Delta C_{T(\text{nach Reperfusion})} / \Delta C_{T(\text{vor Reperfusion})}$$

$$\text{2nd-Look/vor Reperfusion} = \Delta C_{T(2\text{nd-Look})} / \Delta C_{T(\text{vor Reperfusion})}$$

### 4.2.5 Statistische Auswertung

Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums, dem 8.8.2013, wurden alle Daten fortlaufend erfasst, aktualisiert und mit der Statistiksoftware IBM®-SPSS®-Statistics-20 (3.11) dokumentiert und analysiert.

Alle kontinuierlichen Variablen wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. Der Test auf Normalverteilung erfolgte mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests. Die Prüfung der Variablen auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde bei mindestens 5 Werten pro Gruppe durchgeführt. Zwei Gruppen mit unabhängigen, normalverteilten, kontinuierlichen Variablen wurden unter Berücksichtigung der Varianzhomogenität mit dem Student-t-Test bei unabhängigen Stichproben ausgewertet. Zwei Gruppen mit nicht normalverteilten, kontinuierlichen Variablen wurden mittels nichtparametrischer Tests, wie dem Mann-Whitney-U-Test, analysiert. Der Vergleich normalverteilter, kontinuierlicher Variablen von mehr als zwei Gruppen wurde mit ANOVA analysiert. Der Vergleich nicht normalverteilter, kontinuierlicher Variablen von mehr als zwei Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-H-Test. Hinsichtlich kategorischer Variablen wurde die prozentuale Verteilung in den einzelnen Gruppen angegeben. Diese wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf signifikante Unterschiede analysiert. Voraussetzungen für diesen Test sind, dass weniger als 20 % aller Zellen eine erwartete Häufigkeit kleiner als 5 haben und keine Zelle eine erwartete Häufigkeit kleiner als 1 aufweist. Waren diese Voraussetzungen nicht gegeben, so wurde der exakte Test nach Fisher angewandt.

Die Korrelationsanalysen intervallskaliert und normalverteilter Variablen wurden mit der Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson durchgeführt. Falls eine der beiden Variablen ordinalskaliert oder nicht normalverteilt war oder wenn eine der beiden Variablen dichotom war, wurde die Rangkorrelation nach Kendalls-Tau verwendet. Im Falle, dass beide Variablen dichotom waren, wurde mittels Vierfelder-Korrelation mit Distanz- und Ähnlichkeitsmaßen nach Russel und Rao der Zusammenhang berechnet. Der Zusammenhang wurde jeweils mit dem Korrelationskoeffizienten  $r$  angegeben.

Zur Bestimmung des kumulativen Patientenüberlebens, definiert als Zeitraum zwischen Transplantation und Tod oder Ende der Datenerfassung, wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt und mit dem Log-Rank-Test hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz überprüft. Derselbe Test wurde für die Bestimmung des kumulativen Transplantatüberlebens, das definiert ist als Zeitraum zwischen Transplantation und Retransplantation, Tod oder Ende der Datenerfassung, verwendet.

Die Boxplots zeigen jeweils den Median sowie das 25%- und 75%-Perzentil an, wobei Ausreißer, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen außerhalb der Box liegen, mit Kreisen, und Extremwerte, die über 3 Boxlängen außerhalb der Box liegen, als ovale Form markiert wurden. Unterschiede mit  $p < 0,05$  wurden signifikant gewertet.



## 5 Ergebnisse

Nach wie vor stellt der IRS im Rahmen der humanen orthotopen LTx ein klinisch relevantes Problem dar, das unter anderem durch eine eingeschränkte Transplantatfunktion gekennzeichnet ist. Daher werden in dieser Arbeit zunächst die pathomechanistischen und immunologischen Faktoren des frühen IRS in einem Tiermodell des partiellen warmen IRS analysiert. Darauf aufbauend werden anhand einer klinischen Studie neben diesen Faktoren weitere Parameter, die mit dem IRS im Zusammenhang stehen könnten, untersucht.

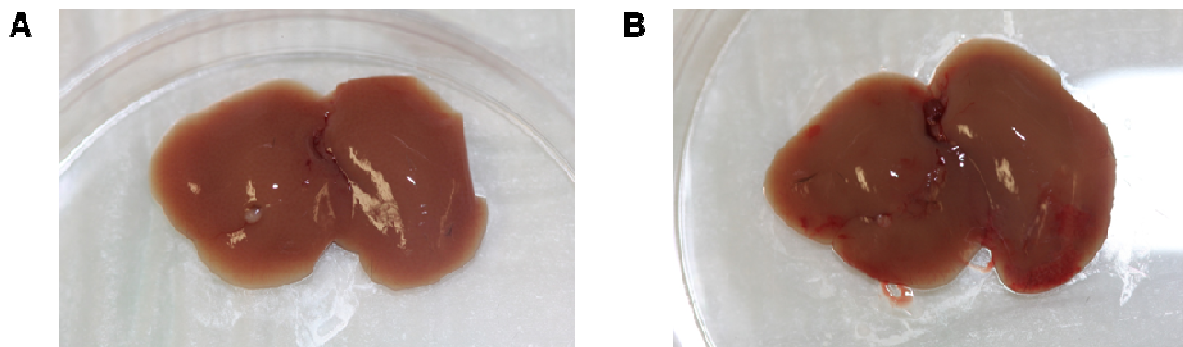
### 5.1 Ergebnisse des partiellen warmen IRS im Tiermodell

#### 5.1.1 Der partielle warme IRS im Tiermodell

Um zunächst die Auswirkungen des IRS im Tiermodell zu erforschen, wurde in C57BL/6-Wildtypmäusen (3.1) durch eine 90-minütige warme Ischämie mit anschließender Reperfusion ein Leberschaden im Lobus medialis und Lobus lateralis sinister induziert (4.1.1).

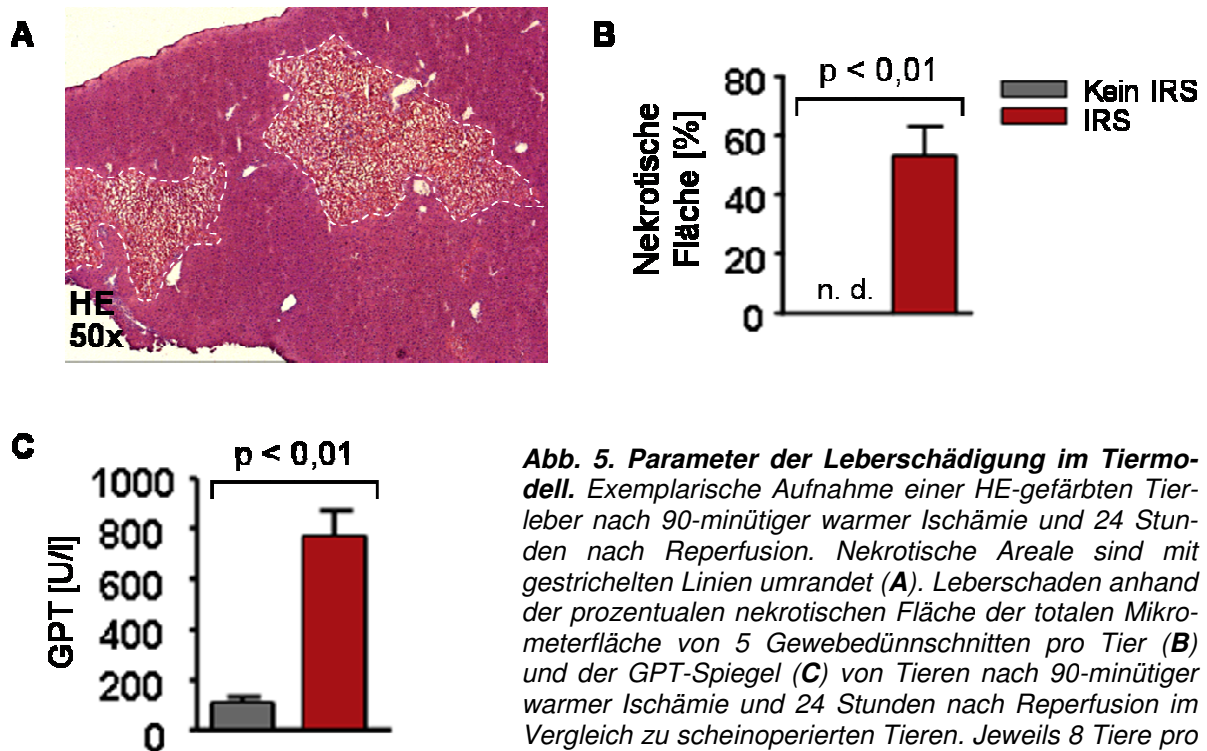
#### Im Tiermodell zeigen sich nach 90-minütiger Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion signifikante Leberschäden

Der Leberschaden wird bei einem induzierten IRS bereits in Form von makroskopisch sichtbaren Läsionen manifest (Abb. 4 B). Im Gegensatz dazu imponiert die Leber eines scheinoperierten Tieres, bei dem kein IRS induziert wurde, makroskopisch homogen (Abb. 4 A).



**Abb. 4. Lobus medialis und Lobus lateralis sinister der Tierleber.** Makroskopisch homogen erscheinende Lobi der Leber eines scheinoperierten Tieres (A). Im Vergleich dazu zeigt sich nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion eine sichtbare Schädigung (B).

Nicht nur bei der makroskopischen Betrachtung, sondern auch auf histologischer Ebene (4.1.4.1) kann demonstriert werden, dass Tiere nach 90-minütiger Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion signifikant mehr nekrotische Areale aufweisen als scheinoperierte Tiere (Abb. 5 A und B). Darüber hinaus wird das Ausmaß des Leberschadens bei IRS-Tieren anhand signifikant erhöhter GPT-Spiegel (4.1.2) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren deutlich (Abb. 5 C).



**Abb. 5. Parameter der Leberschädigung im Tiermodell.** Exemplarische Aufnahme einer HE-gefärbten Tierleber nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion. Nekrotische Areale sind mit gestrichelten Linien umrandet (A). Leberschaden anhand der prozentualen nekrotischen Fläche der totalen Mikrometerfläche von 5 Gewebedünnschnitten pro Tier (B) und der GPT-Spiegel (C) von Tieren nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Jeweils 8 Tiere pro Gruppe. Signifikanzniveau über dem Querbalken.

Passend zu vorangegangenen Studien zeigen Wildtypmäuse, die einer 90-minütigen partiellen warmen Ischämie unterzogen wurden, 24 Stunden nach Reperfusion Eigenschaften des IR-vermittelten hepatischen Schadens, der anhand signifikant vermehrt auftretender hepatozellulärer Nekrosen sowie signifikant erhöhter Lebertransaminasen festgemacht werden kann.<sup>134,139</sup>

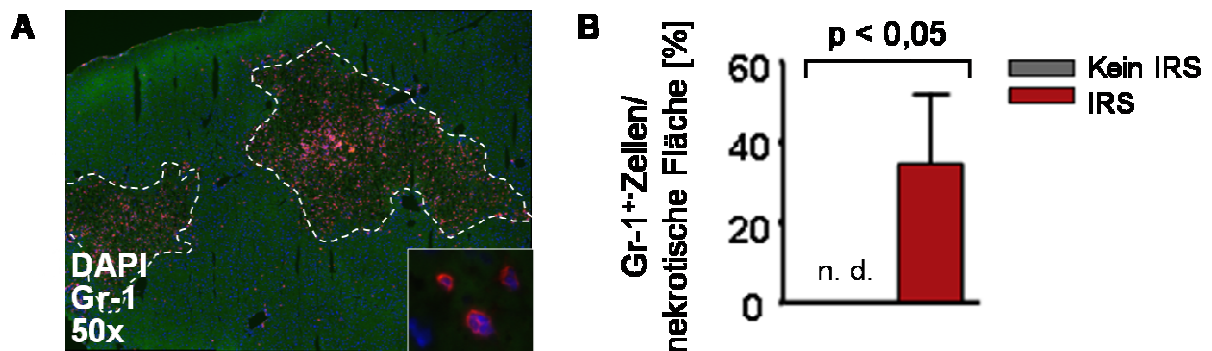
### 5.1.2 Immunezellinfiltration im Zusammenhang mit dem IRS

Neueste Untersuchungen haben gezeigt, dass Ischämie und Reperfusion enorme Immunreaktionen hervorrufen, womit das Immunsystem in der Pathophysiologie des IRS eine entscheidende Rolle spielt. So wurde auf der Ebene des angeborenen Immunsystems die Entstehung des IRS mit einer Infiltration neutrophiler Granulozyten in Zusam-

menhang gebracht.<sup>62</sup> Daher wurde in dieser Arbeit die Infiltration neutrophiler Granulozyten in nekrotische Leberareale mittels immunhistochemischer Färbung für Gr-1 (4.1.4.2) quantifiziert (Abb. 6 A und B).

### Der IRS im Tiermodell ist mit einer signifikanten Immunzellinfiltration assoziiert

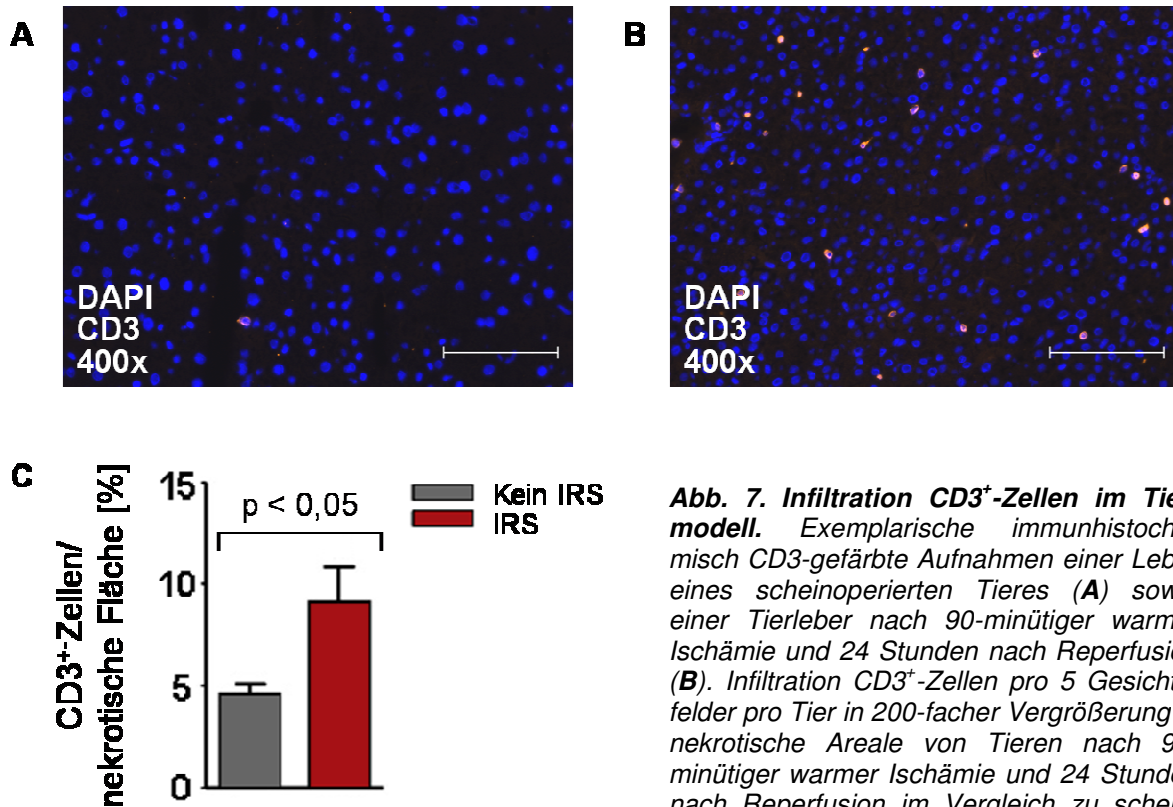
Es zeigt sich, dass Tiere mit induziertem IRS in Gegenüberstellung zu scheinoperierten Tieren eine signifikant vermehrte Infiltration neutrophiler Granulozyten in nekrotische Leberanteile ausweisen (Abb. 6 A und B).



**Abb. 6. Infiltration neutrophiler Granulozyten im Tiermodell.** Exemplarische immunhistochemisch Gr-1-gefärbte Aufnahme einer Tierleber nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion. Nekrotische Areale sind mit gestrichelten Linien umrandet. Beilage mit höherer Vergrößerung infiltrierender Granulozyten (A). Infiltration neutrophiler Granulozyten pro 5 Gesichtsfelder pro Tier in 200-facher Vergrößerung in nekrotische Areale von Tieren nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Jeweils 8 Tiere pro Gruppe. Signifikanzniveau über dem Querbalken (B).

Nicht nur das unspezifische Immunsystem in Form der Infiltration neutrophiler Granulozyten, sondern auch das spezifische Immunsystem ist in den Prozess der IRS-Entstehung involviert. So konnten bereits mehrere Arbeiten zeigen, dass der IRS im Tiermodell mit einer Infiltration von T-Zellen einhergeht.<sup>111,134–136</sup> Hinsichtlich dieser T-Zellen bestand gemäß Uchida et al. seither die Annahme, dass hauptsächlich konventionelle CD3<sup>+</sup>-T-Zellen des CD4<sup>+</sup>-Effektorphänotyps entscheidend in der frühen akuten IRS-bezogenen Immunantwort sind.<sup>134</sup> Dabei stellt CD3 einen Oberflächenrezeptor und Teil des TCR dar, der normalerweise aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette besteht.<sup>57</sup> Um die Ergebnisse von Uchida et al. zu verifizieren, wurde in dieser Arbeit die Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen (4.1.4.2) in die Leber mit induziertem IRS im Vergleich zu der Infiltration in die Leber scheinoperierter Tiere analysiert (Abb. 7 A und B). Das Ergebnis dieser Analyse offenbart, dass Tierlebern, die einem 90-minütigen partiellen warmen IRS unterzogen wurden, 24 Stunden nach Reperfusion eine beträchtliche Anzahl infiltrierender CD3<sup>+</sup>-Zellen zeigen,

die in Gegenüberstellung zu der Anzahl der scheinoperierten Tiere signifikant höher ist (Abb. 7 C).



**Abb. 7. Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen im Tiermodell.** Exemplarische immunhistochemisch CD3-gefärbte Aufnahmen einer Leber eines scheinoperierten Tieres (A) sowie einer Tierleber nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion (B). Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen pro 5 Gesichtsfelder pro Tier in 200-facher Vergrößerung in nekrotische Areale von Tieren nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Jeweils 8 Tiere pro Gruppe. Signifikanzniveau über dem Querbalken (C).

Diese Ergebnisse des Tiermodells verdeutlichen, dass sowohl Faktoren des unspezifischen als auch des spezifischen Immunsystems eine entscheidende Rolle in der Ätiologie des IRS spielen. Insbesondere bedarf die Gegenwart des Immunsystems im Hinblick auf die beteiligten T-Zellpopulationen, die Steuerung der Immunreaktion sowie die Interaktion zwischen einzelnen Komponenten des Immunsystems mittels Zytokinen und Transkriptionsfaktoren einer näheren Betrachtung.

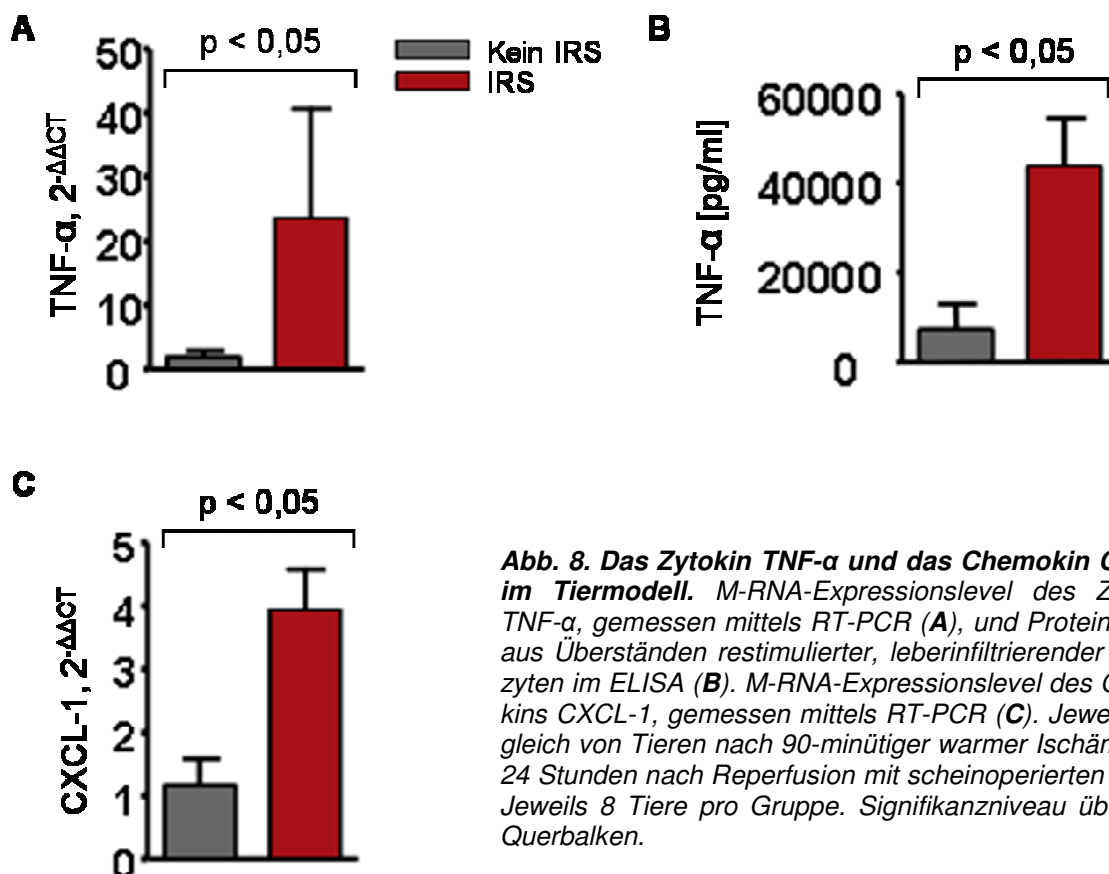
### 5.1.3 Zytokine und Transkriptionsfaktoren des IRS im Tiermodell

Zum einen ist der partielle warme IRS im Tiermodell mit einer signifikanten Infiltration neutrophiler Granulozyten assoziiert. Zum anderen werden verschiedene Zytokine und Chemokine, wie TNF- $\alpha$  und CXCL-1, im Anschluss an die T-Zellaktivierung mit dem hepatischen IRS in Zusammenhang gebracht.<sup>119</sup>

### Der IRS im Tiermodell ist mit signifikant erhöhten mRNA-Expressionslevel für TNF- $\alpha$ und CXCL-1 assoziiert

TNF- $\alpha$  wird vor allem von Makrophagen produziert und stellt einen zentralen Mediator des IRS dar, der die Produktion und Freisetzung von CXC-Chemokinen stimuliert.<sup>83</sup> CXCL-1 wird unter anderem von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen produziert und fungiert als chemischer Signalstoff mit der Folge einer vermehrten Infiltration neutrophiler Granulozyten.

Tatsächlich offenbaren die Ergebnisse der RT-PCR (4.1.5) dieser Arbeit, dass Tierlebern, die einer 90-minütigen partiellen warmen Ischämie ausgesetzt waren, 24 Stunden nach Reperfusion signifikant höhere mRNA-Expressionslevel sowohl für TNF- $\alpha$  (Abb. 8 A) als auch für CXCL-1 (Abb. 8 C) aufweisen. Die Ergebnisse des ELISA (4.1.6.1) zeigen, dass die TNF- $\alpha$ -Proteinspiegel in Überständen restimulierter, leberinfiltrierender Leukozyten in IRS-Tieren signifikant höher sind als in scheinoperierten Tieren (Abb. 8 B).

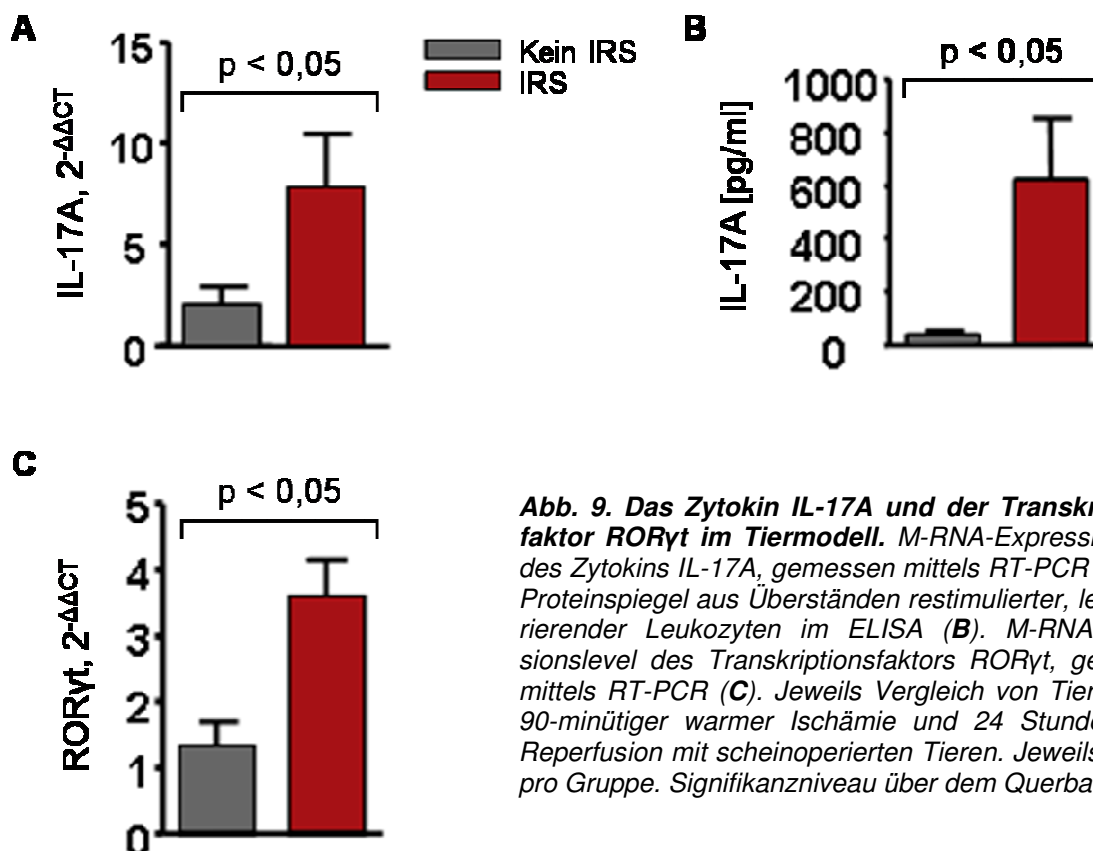


**Abb. 8. Das Zytokin TNF- $\alpha$  und das Chemokin CXCL-1 im Tiermodell.** M-RNA-Expressionslevel des Zytokins TNF- $\alpha$ , gemessen mittels RT-PCR (A), und Proteinspiegel aus Überständen restimulierter, leberinfiltrierender Leukozyten im ELISA (B). M-RNA-Expressionslevel des Chemokins CXCL-1, gemessen mittels RT-PCR (C). Jeweils Vergleich von Tieren nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion mit scheinoperierten Tieren. Jeweils 8 Tiere pro Gruppe. Signifikanzniveau über dem Querbalken.

### Der IRS im Tiermodell geht mit signifikant erhöhten mRNA-Expressionslevel für IL-17A und ROR $\gamma$ t einher

Zur weiteren analytischen Differenzierung der infiltrierenden CD3<sup>+</sup>-Zellsubpopulationen sollten zunächst mittels RT-PCR (4.1.5) die mRNA-Expression und mittels ELISA (4.1.6.2) die Proteinspiegel des Zytokins IL-17A betrachtet werden. Denn jüngste Daten deuten darauf hin, dass Th17-Zellen entscheidend an der Pathophysiologie des IRS beteiligt sein sollen.<sup>110,135</sup> Wahrhaftig zeigen Tiere mit 90-minütiger partieller warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion neben signifikant erhöhten IL-17A-mRNA-Expressionslevel signifikant höhere IL-17A-Proteinspiegel in Überständen restimulierter, leberinfiltrierender Leukozyten (Abb. 9 A und B).

Um der Bedeutung der Th17-Zellen hinsichtlich des IRS im Tiermodell weiter auf den Grund zu gehen, wurde der kennzeichnende Transkriptionsfaktor der Th17-Zellen ROR $\gamma$ t<sup>60,142</sup> mithilfe der RT-PCR (4.1.5) analysiert. Tatsächlich wird der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t signifikant mehr in Mäusen mit induziertem IRS exprimiert als in scheinoperierten Tieren (Abb. 9 C).



**Abb. 9. Das Zytokin IL-17A und der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t im Tiermodell.** M-RNA-Expressionslevel des Zytokins IL-17A, gemessen mittels RT-PCR (A), und Proteinspiegel aus Überständen restimulierter, leberinfiltrierender Leukozyten im ELISA (B). M-RNA-Expressionslevel des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t, gemessen mittels RT-PCR (C). Jeweils Vergleich von Tieren nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion mit scheinoperierten Tieren. Jeweils 8 Tiere pro Gruppe. Signifikanzniveau über dem Querbalken.

Die Ergebnisse zeigen, dass der induzierte IRS im Tiermodell mit einer signifikant erhöhten IL-17A- und ROR $\gamma$ t-Expression übereinkommt. Allerdings bedarf dieses Resultat einer weiteren Analyse in Bezug auf die Possibilität, dass IL-17A nicht nur von Th17-Zellen gebildet werden kann. Ferner ist der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t nicht nur für die Expression von Th17-Zellen verantwortlich, weshalb eine weitere Phänotypisierung mittels durchflusszytometrischer Analyse erfolgte.

#### **5.1.4 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma$ $\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen als Effektorzellen des IRS**

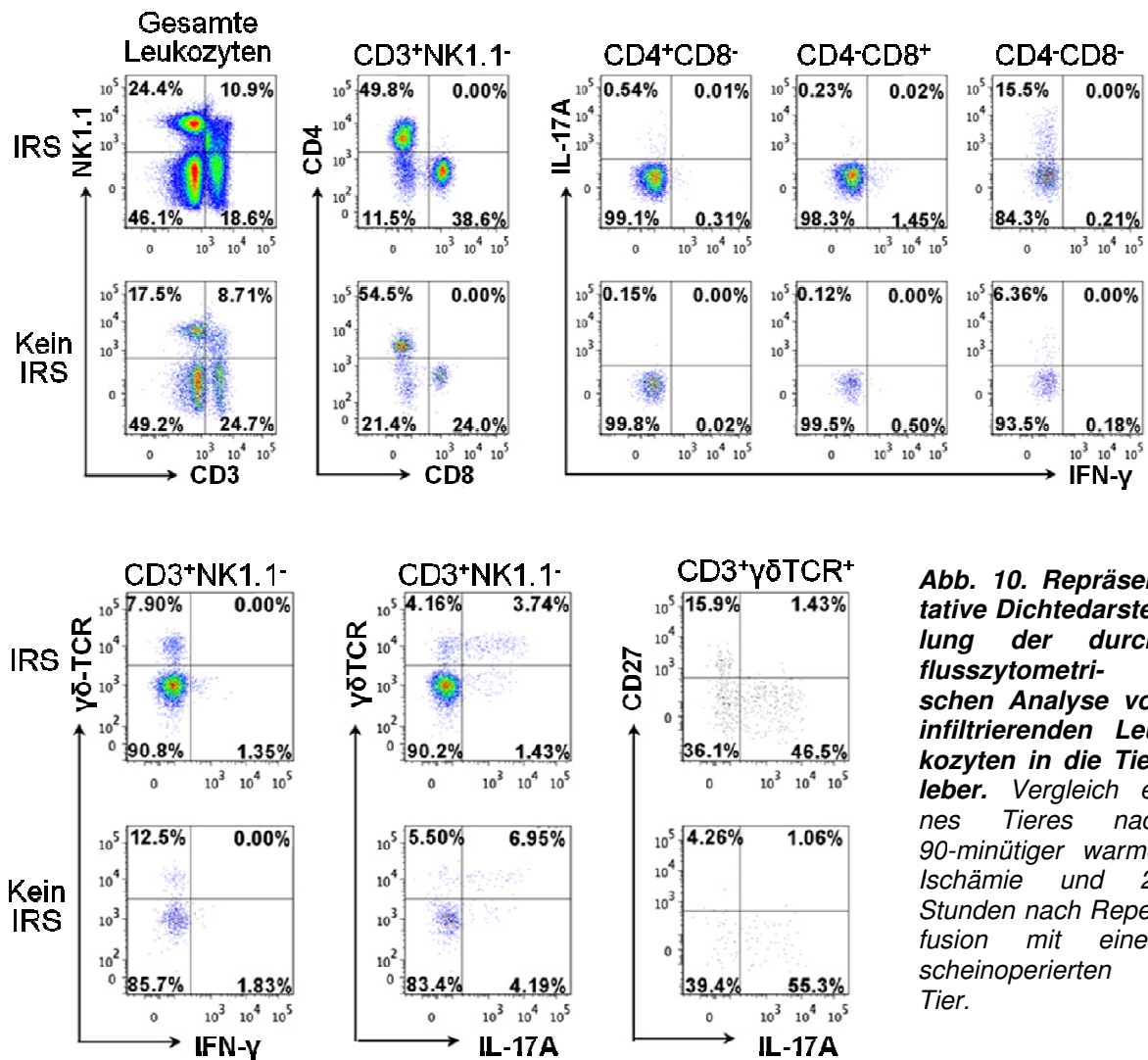
Um die zelluläre Hauptquelle für IL-17A nach 90-minütiger Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion im Tiermodell zu detektieren, wurde eine durchflusszytometrische Analyse (4.1.7) mittels Färbung isolierter Leukozyten aus der Leber von IRS- und scheinoperierten Tieren zur weiteren Phänotypisierung herangezogen. Interessanterweise können neben den CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen beispielsweise  $\gamma$  $\delta$ -T-Zellen eine zusätzliche potenzielle Quelle der IL-17A-Produktion sein,<sup>144</sup> weil sie dafür bekannt sind, umgehend IL-17A ohne Bindung an den TCR freizulassen<sup>146</sup>, womit sie eine potenzielle Rolle beim frühen IRS einnehmen können. Daneben gehören zu den CD4<sup>+</sup>-Zellen unter anderem klassische NKT-Zellen, die CD1d-restriktiv sind und sowohl den TCR als auch NK-Marker, wie NK1.1, exprimieren,<sup>61</sup> wobei Typ-1-NKT-Zellen angeblich den IRS fördern.<sup>133</sup>

#### **Unkonventionelle IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma$ $\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen stellen die prominenteste Quelle für IL-17A dar**

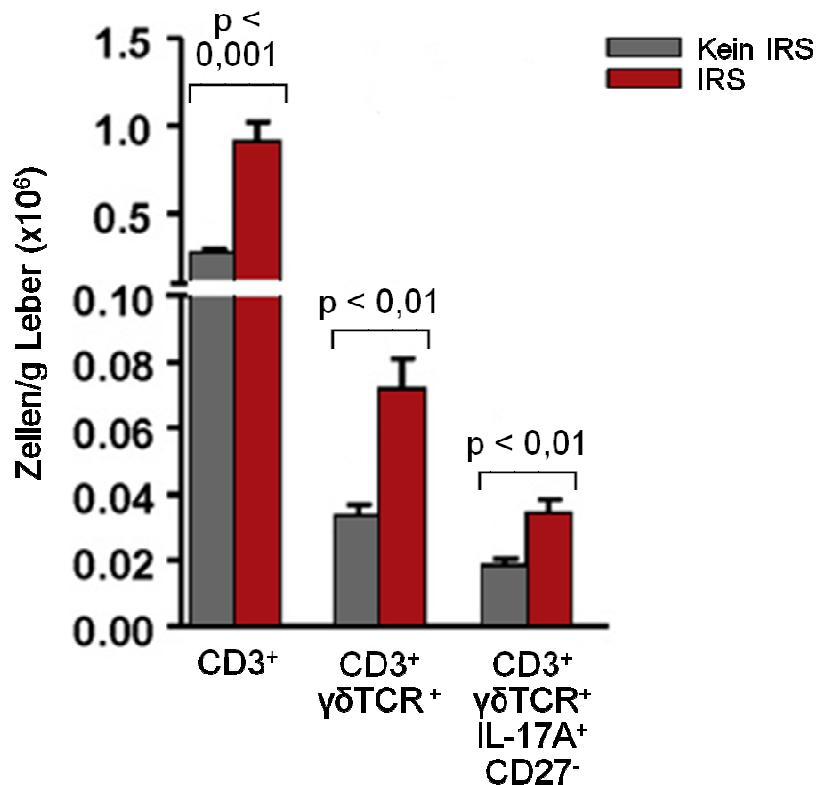
Die intrazelluläre IL-17A-Färbung (4.1.7) isolierter Leukozyten aus der Leber von Tieren mit induziertem IRS und scheinoperierten Tieren zeigt allerdings, dass CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>-T-Zellen, aber nicht CD3<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>-NKT-Zellen oder CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>-NK-Zellen die hauptsächlichen Produzenten von IL-17A in der Leber im Rahmen des IRS sind (Abb. 10).

Im Rahmen der Phänotypisierung der isolierten Leukozyten wurde ebenfalls die Bedeutung IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen untersucht, die angeblich zum hepatischen IRS beitragen sollen.<sup>134</sup> Unerwarteterweise offenbart die detaillierte durchflusszytometrische Analyse, dass das IRS-bezogene Schlüsselmolekül IFN- $\gamma$  von Th1-Zellen in Mäusen nach 90-minütiger Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion im Vergleich zu scheinoperierten Tieren nicht unterschiedlich exprimiert wird (Abb. 10), womit CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen beim akuten IRS keine Rolle zu spielen scheinen. Überraschenderweise sind unkonventionelle CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen in der Leber von IRS-Tieren die prominenteste zelluläre Quelle von IL-17A und nicht CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (Abb. 10).

Die weitere Phänotypisierung der Untergruppen deckt auf, dass die IL-17A-produzierenden, unkonventionellen  $CD4^-CD8^-CD3^+$ -T-Zellen, die sogenannten DN-T-Zellen, in der Leber hauptsächlich aus  $\gamma\delta TCR^+CD3^+$ -T-Zellen bestehen und eine kleinere Fraktion aus den  $CD4^-CD8^-CD3^+$ -T-Zellen (Abb. 10). Dabei zeigt sich in diesem Tiermodell, dass die DN-T-Zellen eine relativ geringe Quelle von IL-17A darstellen im Vergleich zu den  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Abb. 10). Darüber hinaus werden die IL-17-produzierenden  $\gamma\delta TCR^+CD3^+$ -T-Zellen ausschließlich zu der  $CD27^+\gamma\delta TCR^+$ -T-Zelluntergruppe gezählt (Abb. 10).



**Abb. 10. Repräsentative Dichtedarstellung der durchflusszytometrischen Analyse von infiltrierenden Leukozyten in die Tierleber. Vergleich eines Tieres nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion mit einem scheinoperierten Tier.**



**Abb. 11. Repräsentative Darstellung der absoluten Zellzahl der durchflusszytometrischen Analyse von infiltrierenden Leukozyten in die Tierleber.** Jeweils Vergleich von Tieren nach 90-minütiger warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion mit scheinoperierten Tieren. Jeweils 8 Tiere pro Gruppe. Signifikanzniveau über dem Querbalken.

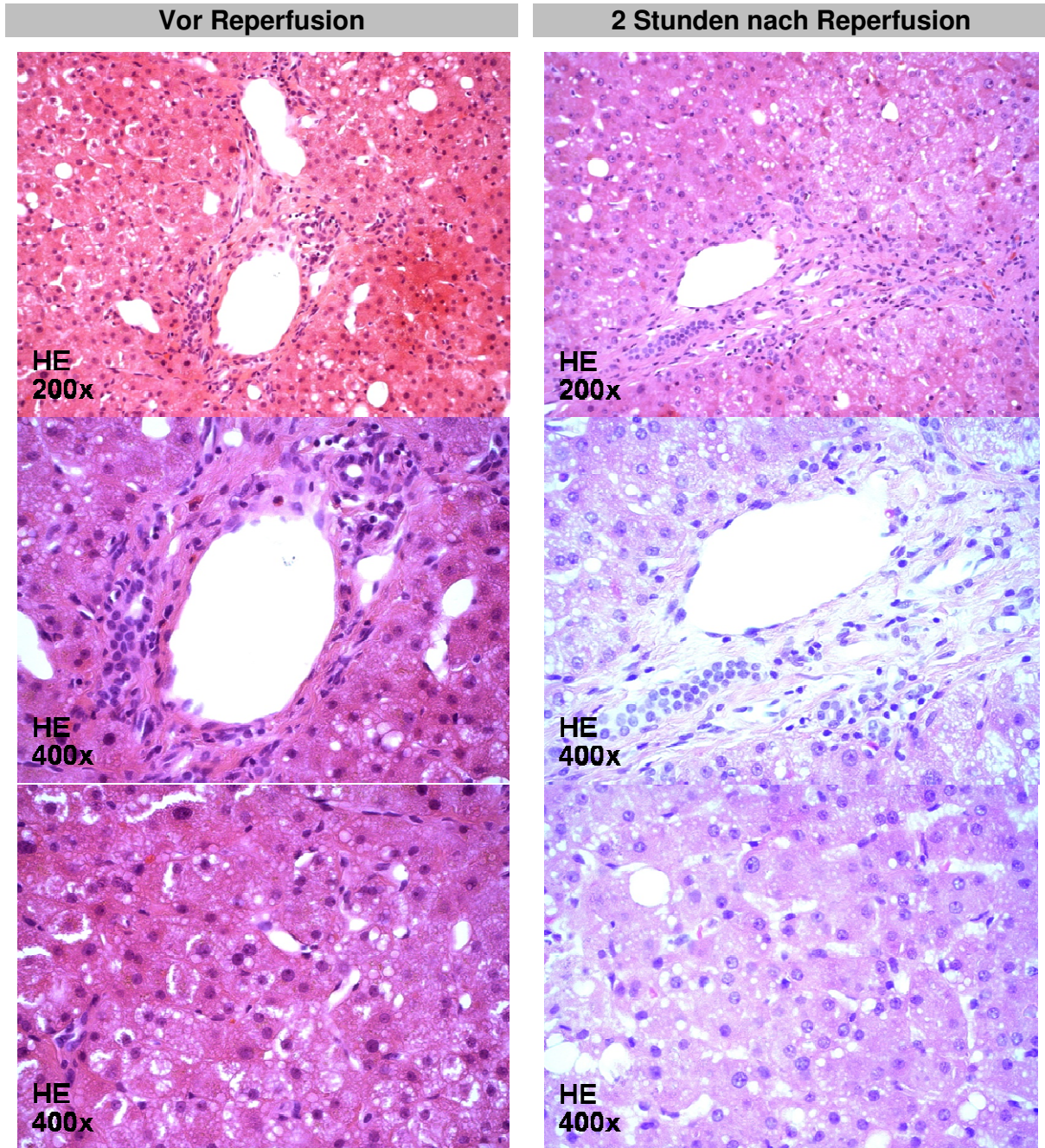
Weiterhin zeigt sich, dass in Tieren mit induziertem IRS sowohl die absolute Anzahl CD3<sup>+</sup>-T-Zellen als auch die der IL-17A-produzierenden CD27<sup>-</sup>γδTCR<sup>+</sup>-T-Zellen statistisch signifikant erhöht ist im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren (Abb. 11). Demzufolge stellen vor allem unkonventionelle IFN-γ<sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>γδTCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen neben CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen die prominenteste Quelle für IL-17A dar, womit ein wichtiger Schritt zur Aufklärung des immunologisch vermittelten hepatischen IRS in der Maus unternommen wurde.

## 5.2 Ergebnisse des IRS der humanen Lebertransplantation

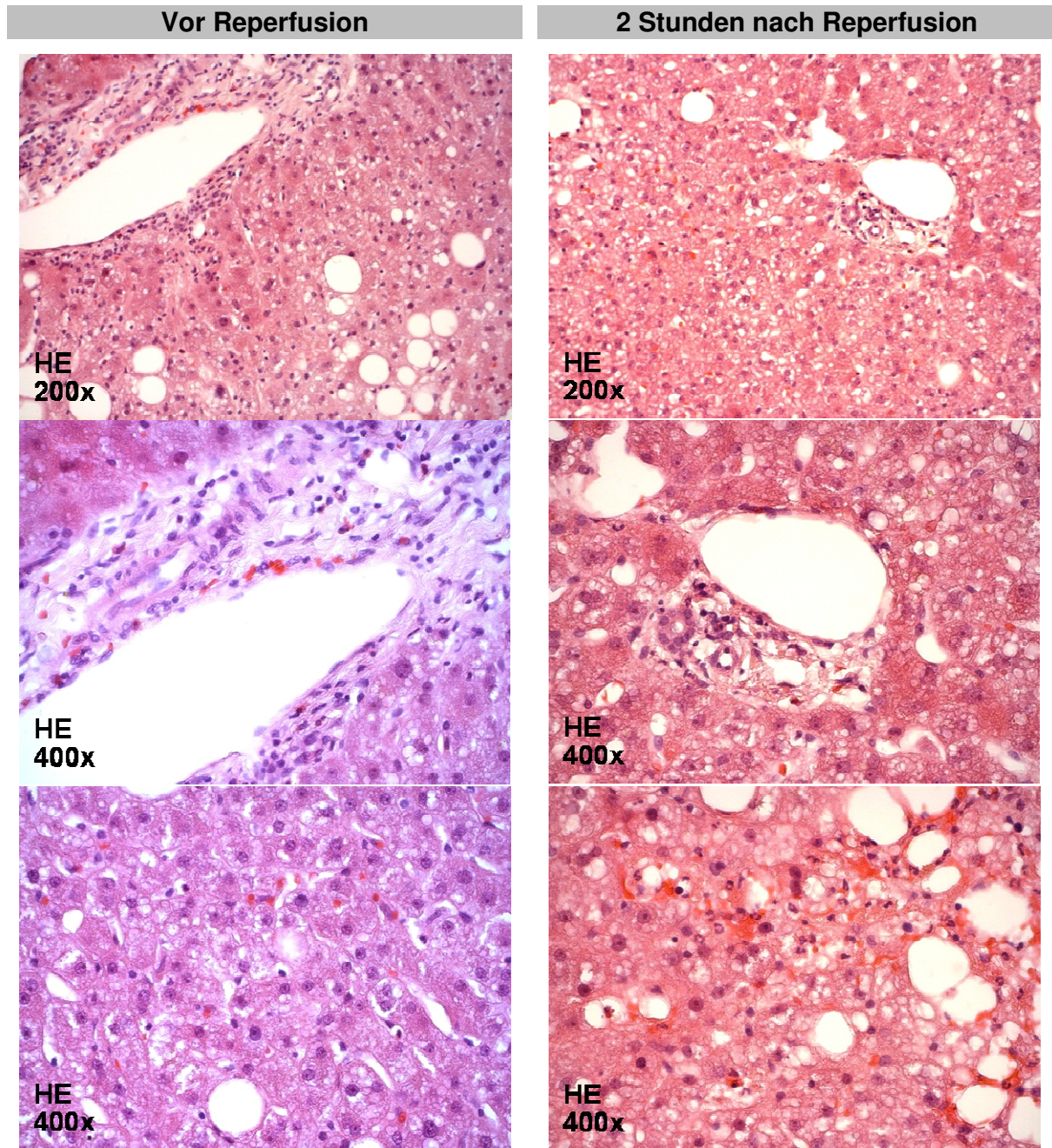
Die ursächlichen immunologischen Faktoren des IRS sind basierend auf den Ergebnissen des partiellen warmen IRS im Tiermodell neben CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen vor allem unkonventionelle IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (5.1.4).<sup>199</sup> Diese Zellen verursachen in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t über einen IL-17A-bedingten Mechanismus den IRS (5.1.4).<sup>199</sup> Die neuen Erkenntnisse gewinnen umso mehr an klinischer Bedeutung, als die Arbeitsgruppe um Eggenhofer et al. sogleich eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention aufgezeigt hat und zwar dergestalt, dass bei Rorc<sup>gfp/wt</sup>-Mäusen ein IRS erst induziert und dieser darauffolgend mit dem Herzglykosid Digoxin therapiert wurde.<sup>199</sup> Diese im Tiermodell demonstrierte, gezielte ROR $\gamma$ t-Therapie mittels Digoxin könnte ebenso in der Behandlung des humanen IRS zum Einsatz kommen. Umso wichtiger ist es, den Pathomechanismus des humanen IRS ausfindig zu machen. Infolgedessen widmet sich diese Arbeit basierend auf den Ergebnissen des Tiermodells der Erforschung der pathomechanistischen und immunologischen Faktoren und der Bedeutung der im Tiermodell detektierten T-Zellsubpopulationen hinsichtlich des humanen, hepatischen, frühen IRS. Zu diesem Zweck wurden HE-gefärbte Biopsien der Lebertransplantate eines Patientenkollektivs, bestehend aus 46 Patienten, histopathologisch auf das Vorhandensein eines IRS geprüft. Im Hinblick auf den gegenwärtigen Organmangel wurde auch der Aspekt der Transplantate minderer Organqualität, sogenannter marginaler Organe, näher beleuchtet. Denn solche marginalen Organe bergen ein größeres Risiko für einen schweren IRS,<sup>7</sup> weshalb die Transplantate gleichermaßen auf Organqualität und Spenderkriterien hin untersucht wurden. Überdies wurden Daten und laborchemische Parameter der 46 Patienten retrospektiv analysiert und mit den Kriterien des IRS und der Marginalität in Zusammenhang gebracht. Neben dieser Auswertung von Spender- und Empfängerkriterien in Bezug auf den IRS und die Marginalität sowie der laborchemischen Analyse wurden im experimentellen Teil dieser Arbeit die Leberbiopsien von 21 der 46 Patienten mittels spezieller immunhistochemischer Färbungen und RT-PCR untersucht. Ein besonderes Augenmerk des Forschungsgegenstands dieser Arbeit liegt damit auf der Eruierung, ob die im Mausmodell detektierten Faktoren gleichermaßen im Rahmen des humanen, hepatischen IRS eine Rolle spielen.

### 5.2.1 Häufigkeit des histopathologischen IRS

Die Einteilung des Patientenkollektivs ( $n = 46$ ) (3.2) in Patienten mit vorhandenem beziehungsweise nicht vorhandenem histopathologischem IRS erfolgte durch das Institut für Pathologie in Regensburg unter Befundung der beiden HE-gefärbten Biopsien (4.2.2.1) der Lebertransplantate. Diese wurden zum einen am Ende der Kaltpräparation und zum anderen etwa 2 Stunden nach Reperfusion vor Bauchdeckenverschluss entnommen. Diesbezüglich fand die Einteilung in Zusammenschau der Kriterien hepatozellulärer Einzelzell- und Gruppenzellnekrosen, granulozytärer Abräumreaktion der Nekrosen, intra- und interzellulärer Ödeme, Infiltration von Kupfferzellen, Granulozyten und Lymphozyten, Leberparenchymverfettung, hepatokanalikulärer Cholestase sowie portaler und intraaziniär-perizellulärer Faservermehrung statt. Diese Befundung ergibt, dass die Biopsien vor Reperfusion in 26 % ( $n = 12$ ) einen ischämischen Konservierungsschaden und die Biopsien nach Reperfusion in 59 % ( $n = 27$ ) der Fälle einen IRS aufweisen, wobei die Betrachtung beider Biopsien ergibt, dass 63 % ( $n = 29$ ) des Patientenkollektivs einen IRS aufweisen (5.2.2.4, Tab. 5-6). Dabei zeigt in 2 Fällen jeweils die Biopsie vor Reperfusion einen Konservierungsschaden, die Biopsie nach Reperfusion jedoch keinen Konservierungs-Reperfusionsschaden. Diese beiden Fälle wurden dennoch den Patienten mit IRS zugeordnet, da bekannt ist, dass abhängig von der Entnahmelokalisation unterschiedlich schwere pathologische Befunde resultieren können und möglicherweise die Biopsie nach Reperfusion nicht repräsentativ war. Beispielsweise ist vor allem das subkapsuläre Parenchym anfällig für Schäden und Austrocknung und kann somit im Vergleich zu tiefer sitzendem Parenchym schwerere pathologische Prozesse aufweisen.<sup>200</sup> Nachfolgend sind exemplarische mikroskopische Aufnahmen HE-gefärbter Schnitte eines Patienten ohne IRS (Abb. 12) sowie eines Patienten mit IRS abgebildet (Abb. 13). Interessanterweise entwickelte das Transplantat mit der deutlich höheren Verfettung von circa 30 % einen IRS, während das weniger steatotische Organ mit nur 5%iger Verfettung von einem IRS verschont blieb (Abb. 12; Abb. 13). Der IRS nach der Reperfusion wird in dem exemplarischen Beispiel anhand einer enormen Infiltration von Granulozyten, fedrig degenerierten Hepatozyten sowie Einzelzellnekrosen manifest (Abb. 13).



**Abb. 12. HE-gefärbte Leberstanzbiopsien eines Patienten in Abwesenheit eines IRS in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen.** Die oberen und mittleren Aufnahmen zeigen jeweils Portalfelder, während die restlichen Aufnahmen Bereiche aus den Leberläppchen darstellen. Die Biopsie vor Reperfusion zeigt laut pathologischem Befund trabekulär aufgebautes Leberparenchym mit minimaler, gemischttröpfiger Verfettung < 5 %, abschnittsweise mit mikrovesikulärem Zytoplasma. Läppchenzentrale Lipofuszinose in Hepatozyten. Keine hepatokanalikuläre Cholestase. Keine hepatozellulären Nekrosen. Keine Granulozytenakkumulation. Portale Gallengänge mit zartem, kubischem Epithel. Portalfelder entzündungsfrei, regelrecht konfiguriert, keine portale Faser Vermehrung. In Leberläppchen fokale leichtgradige perizelluläre Faser Vermehrung. Kein höhergradiger fibrotischer Leberparenchyumbau. Einzelne Zentralvenen gering bindegewebig verbreitert. Zentralvenen entzündungsfrei mit luminal zartem Endothel. Kein Konservierungsschaden. In der Biopsie nach Reperfusion ergeben sich, bis auf eine kleinvesikuläre Zytoplasmadegeneration der Hepatozyten, fokal einzelne Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten in Sinusoiden sowie eine von einzelnen Portalfeldern ausstrahlende, beginnende Kollagenisierung retikulärer Fasern, keine Änderungen zur Biopsie vor Reperfusion. Kein Konservierungs-/Reperfusionsschaden.



**Abb. 13. HE-gefärbte Leberstanzbiopsien eines Patienten mit IRS in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen.** Die oberen und mittleren Aufnahmen zeigen jeweils Portalfelder, während die restlichen Aufnahmen Bereiche aus den Leberläppchen darstellen. Die Biopsie vor Reperfusion zeigt laut pathologischem Befund eine gemischttröpfige Leberparenchymverfettung in circa 30 % mit ballonierten Hepatozyten und läppchenzentraler, leichtgradiger, hepatozellulärer Cholestase mit fedriger Degeneration von Hepatozyten. Keine manifeste Architekturstörung. Portalfelder überwiegend entzündungsfrei, in einzelnen Portalfeldern einzelne Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophile Granulozyten. Keine Grenzonenaktivität. Keine granulozytären Infiltrate. Einzelne entzündliche Abräumknötchen. Geringgradige portale Faser Vermehrung mit beginnender Kollagenisierung der periportal gelegenen retikulären Fasern. Kein resultierender fibrotischer Leberparenchymbau. Kein relevanter Konservierungsschaden. In der Biopsie nach Reperfusion zeigt sich die Leberparenchymverfettung mit disseminierten, zentroazinären Granulozytenaggregaten. Degenerativ veränderte Hepatozyten mit fedriger Degeneration und kleinfokalen resultierenden Einblutungen, entsprechend einem manifesten, mittelschweren Konservierungs-/Reperfusionsschaden. Multifokale zentroazinäre hepatozelluläre Einzelzellnekrosen mit granulozytärer Demarkierung. Initial portale Faser Vermehrung und multifokale intraazinäre-perizelluläre Faser Vermehrung bei vorbestehender Steatosis hepatis mit leichtgradiger Steatohepatitis.

Zusammenfassend offenbart die histopathologische Befundung der Leberdünnschnitte des Patientenkollektivs, dass bereits 2 Stunden nach Reperfusion in 63 % der Fälle Zeichen der frühen hepatischen Schädigung durch Ischämie und Reperfusion auftreten.

Dabei kann die Ausgangssituation der Lebertransplantate durchaus einen Einfluss auf die Entwicklung eines IRS ausüben. Bedeutenderweise entwickelte in den gezeigten exemplarischen Aufnahmen das Organ mit der höheren Verfettung einen IRS. Aus diesem Grund bedarf es einer näheren Betrachtung der Spender- und Transplantateigenschaften, um darauffolgend auf Empfängereigenschaften sowie weitere pathomechanistische und immunologische Faktoren eingehen zu können.

## **5.2.2 Einfluss der Spendercharakteristika auf den IRS**

Unter der Annahme, dass bestimmte Spendereigenschaften einen Einfluss auf die Ätiologie des hepatischen IRS ausüben und dass die Voraussetzungen des Transplantats im Spenderorganismus entscheidend für dessen spätere Funktion im Empfänger sind, bedarf es einer präzisen Betrachtung des Spenderprofils, was Basischarakteristika, Vorerkrankungen, laborchemische Parameter sowie Marginalitätskriterien angeht.

### **5.2.2.1 Basischarakteristika**

Da die Transplantatfunktion ganz wesentlich von der Organbeschaffenheit der Transplantate abhängt, werden in dieser Arbeit unter anderem diverse Charakteristika der Organspender im Vergleich der Patienten mit An- oder Abwesenheit eines IRS analysiert (4.2.1.1).

#### **Transplantate männlicher Spender entwickeln signifikant häufiger einen IRS**

Interessanterweise offenbart die nähere Betrachtung des Spendergeschlechts, dass Transplantate männlicher Organspender unabhängig vom Empfängergeschlecht signifikant häufiger mit der Entwicklung eines IRS assoziiert sind, wobei der Geschlechts-Mismatch keine signifikante Rolle spielt (Tab. 5-1). Die übrigen Parameter ergeben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Patienten mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS (Tab. 5-1).

**Tab. 5-1. Basischarakteristika der Spender.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenzahl jeweils in runden Klammern.

		Gesamt	Kein IRS	IRS	p
Männlich [%]	(46)	50,00 (23)	29,41 (5)	62,07 (18)	0,032
Geschlechts-Mismatch, gesamt [%]	(46)	43,48 (20)	47,06 (8)	41,38 (12)	0,708
Geschlechts-Mismatch ♂ → ♀ [%]	(23)	21,74 (5)	20,00 (1)	22,22 (4)	1,000
Geschlechts-Mismatch ♀ → ♂ [%]	(23)	65,22 (15)	58,33 (7)	72,73 (8)	0,667
Hypotensive Periode, Asystolie [%]	(8)	50,00 (4)	75,00 (3)	25,00 (1)	0,486
Noradrenalin [ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ]	(39)	0,218 $\pm$ 0,409 (39)	0,306 $\pm$ 0,532 (16)	0,156 $\pm$ 0,292 (23)	0,055
Bluttransfusion [Beutelanzahl]	(46)	1,780 $\pm$ 4,599 (46)	1,650 $\pm$ 4,636 (17)	1,860 $\pm$ 4,658 (29)	0,903
Kortikoidtherapie [%]	(46)	45,65 (21)	47,06 (8)	44,83 (13)	0,883
HTK-Perfusionslösung [%]	(46)	89,13 (41)	94,12 (16)	86,21 (25)	0,637
UW-Perfusionslösung [%]	(46)	10,87 (5)	5,882 (1)	13,79 (4)	0,637
Aortales Perfusionsvolumen [l]	(46)	12,25 $\pm$ 17,96 (46)	13,94 $\pm$ 22,25 (17)	11,26 $\pm$ 15,26 (29)	0,675
Portales Perfusionsvolumen [l]	(5)	3,800 $\pm$ 1,643 (5)	2,000 (1)	4,250 $\pm$ 1,500 (4)	–

Die Eigenschaften des Spenders sind nicht unerheblich im Hinblick auf die IRS-Prävalenz und Organfunktion nach Transplantation, weshalb die Betrachtung der Spenderkriterien weiterer Analysen beispielsweise hinsichtlich der Vorerkrankungen und des Lebensstils bedarf.

### 5.2.2.2 Vorerkrankungen und Lebensstil

Es wurden die Häufigkeiten der arteriellen Hypertonie, des Diabetes mellitus und des Alkohol-, Nikotin- und Drogenkonsums unter den Spendern im Vergleich der Patienten mit an- beziehungsweise abwesendem IRS betrachtet (4.2.1.1).

#### **Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Vorerkrankungen und Lebensstil der Spender im Vergleich der Patienten mit beziehungsweise ohne IRS**

Überraschenderweise demonstriert diese Analyse keine statistisch signifikanten Unterschiede im Auftreten der oben genannten Erkrankungen der Spender bei Vergleich der Patienten mit beziehungsweise ohne histopathologischen IRS (Tab. 5-2).

**Tab. 5-2. Vorerkrankungen und Lebensstil der Spender.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenzahl jeweils in runden Klammern.

		Gesamt	Kein IRS	IRS	p
Arterielle Hypertonie [%]	(20)	80,00 (16)	83,33 (5)	78,57 (11)	1,000
Diabetes mellitus [%]	(11)	18,18 (2)	20,00 (1)	16,67 (1)	1,000
Alkoholkonsum [%]	(39)	51,28 (20)	46,67 (7)	54,17 (13)	0,648
Nikotinkonsum [%]	(40)	62,50 (25)	60,00 (9)	64,00 (16)	0,800
Drogenkonsum [%]	(35)	2,857 (1)	7,143 (1)	– (0)	0,400

Bei dieser Analyse korreliert das Auftreten einer arteriellen Hypertonie bei Spendern lediglich mittelgradig mit der IRS-Prävalenz ( $r = 0,550$ ) (Tab. 5-2). Des Weiteren korrelieren die Lebensstilfaktoren des Alkohol- ( $r = 0,333$ ) und Nikotinkonsums ( $r = 0,400$ ) schwach mit einer gehäuften IRS-Prävalenz (Tab. 5-2).

### 5.2.2.3 Laborchemische Parameter

Um einen Einblick in die Stoffwechselsituation und Organfunktion der Spender zu erlangen, wurden die zuletzt dokumentierten Laborparameter der Spender im Hinblick auf signifikante Unterschiede zwischen dem Auftreten beziehungsweise der Abwesenheit eines IRS im Empfänger analysiert (4.2.1.1).

#### **Laborchemisch korreliert das Auftreten eines IRS signifikant mit erhöhten Werten der $\gamma$ -GT und der Glucose sowie mit einem erniedrigten CKMB-Wert des Spenders**

Tatsächlich zeigen Lebertransplantate von Spendern mit erhöhter  $\gamma$ -GT, einem Cholestaseparameter, signifikant häufiger einen histopathologischen IRS (Tab. 5-3). Die Syntheseleistung der Leber gemessen an den Parametern Albumin, Fibrinogen und Quick ergibt keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 5-3). Im Hinblick auf den Kohlenhydratstoffwechsel zeigt sich, dass Transplantate von Spendern mit hohem Glucosewert signifikant häufiger einen IRS aufweisen (Tab. 5-3). Weiterhin besteht eine schwache Korrelation zwischen der Höhe des HbA1c und der IRS-Prävalenz ( $r = 0,364$ ) (Tab. 5-3). Paradoxerweise offenbart die Analyse verschiedener Enzyme, die unter anderem bei Zellerfall und im Rahmen von Schädigungen der Leber freigesetzt werden, dass die LDH und CK tendenziell und die CKMB sogar signifikant höher sind in Spendern, für deren Transplantate kein histopathologischer IRS diagnostiziert wurde (Tab. 5-3). Die übrigen Parameter ergeben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Patienten mit beziehungsweise Abwesenheit eines IRS (Tab. 5-3).

**Tab. 5-3. Laborchemische Parameter der Spender.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenzahl jeweils in runden Klammern.

		Gesamt	Kein IRS	IRS	p
$\gamma$ -GT [U/l]	(43)	42,95 $\pm$ 40,54 (43)	24,56 $\pm$ 12,44 (16)	53,85 $\pm$ 47,26 (27)	0,030
AP [U/l]	(43)	74,44 $\pm$ 37,62 (43)	68,81 $\pm$ 21,15 (16)	77,78 $\pm$ 44,69 (27)	1,000
Albumin [g/l]	(27)	26,48 $\pm$ 7,763 (27)	27,40 $\pm$ 6,034 (13)	25,63 $\pm$ 9,235 (14)	0,564
Fibrinogen [g/l]	(27)	46,16 $\pm$ 160,4 (27)	5,485 $\pm$ 3,013 (11)	74,13 $\pm$ 206,2 (16)	0,622
Quick [%]	(46)	79,17 $\pm$ 15,86 (46)	76,24 $\pm$ 17,90 (17)	80,90 $\pm$ 14,59 (29)	0,593
Kreatinin [ $\mu$ mol/l]	(46)	100,9 $\pm$ 95,24 (46)	128,8 $\pm$ 140,6 (17)	84,49 $\pm$ 50,26 (29)	0,241
Harnstoff [mmol/l]	(45)	7,531 $\pm$ 14,08 (45)	6,850 $\pm$ 7,735 (16)	7,907 $\pm$ 16,70 (29)	0,749
Kalium [mmol/l]	(46)	4,133 $\pm$ 0,461 (46)	3,988 $\pm$ 0,362 (17)	4,217 $\pm$ 0,496 (29)	0,104
Glucose [mmol/l]	(44)	8,336 $\pm$ 2,116 (44)	7,691 $\pm$ 2,435 (17)	8,743 $\pm$ 1,819 (27)	0,047
HbA1c [%]	(9)	5,089 $\pm$ 2,025 (9)	5,000 (1)	5,100 $\pm$ 2,165 (8)	–
LDH [U/l]	(38)	320,8 $\pm$ 176,0 (38)	367,9 $\pm$ 231,4 (15)	290,0 $\pm$ 124,5 (23)	0,355
CK [U/l]	(41)	1.125 $\pm$ 4.742 (41)	2.193 $\pm$ 7.577 (16)	442,0 $\pm$ 588,6 (25)	0,779
CKMB [U/l]	(21)	93,79 $\pm$ 193,2 (21)	171,9 $\pm$ 263,5 (10)	22,77 $\pm$ 22,83 (11)	0,017

Über die hier analysierten laborchemischen Parameter hinaus bedarf es einer weiteren Untersuchung insbesondere der leberspezifischen Transaminasen des Spenders, denen unter Betrachtung der Marginalität entsprechend den von Eurotransplant definierten Kriterien<sup>34</sup> Rechnung getragen wird.

#### 5.2.2.4 Bedeutung der Allokation marginaler Organe

Es ist naheliegend, dass Transplantate minderer Organqualität eine eingeschränkte Organfunktion nach Transplantation aufweisen und dass marginale Organe ein größeres Risiko für einen schweren IRS bergen.<sup>7</sup> Daher wird neben der Einteilung des Patientenkollektivs hinsichtlich eines IRS gleichermaßen eine Einteilung der Transplantate desselben Patientenkollektivs im Hinblick auf die von Eurotransplant definierten Grenzwerte der Marginalitätskriterien<sup>34</sup> vorgenommen (Tab. 5-4). Sobald mindestens eines dieser Kriterien den festgesetzten Grenzwert (Tab. 5-4) überschreitet, wird das entsprechende Transplantat als marginales Organ eingestuft.<sup>34</sup>

#### In 54 % der Fälle fand eine Allokation marginaler Lebertransplantate statt

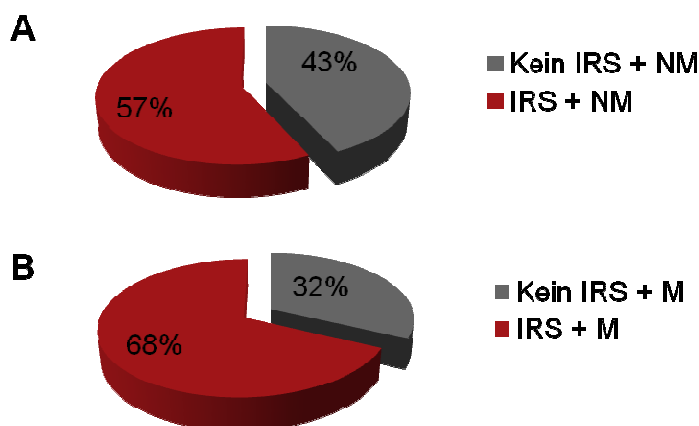
Die Transplantate von Spendern mit einem Alter über 65 Jahre entwickeln nicht signifikant häufiger einen IRS im Vergleich zu den Transplantaten ohne IRS (Tab. 5-4). Auch die Veränderung des Grenzwerts des Spenderalters auf über 60 Jahre, entsprechend der Arbeit von Briceño et al.<sup>201</sup>, ergibt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der Patienten ohne IRS (12 %, n = 2) versus mit IRS (24 %, n = 7) (p = 0,450), wobei in ins-

gesamt 20 % (n = 9) der Fälle der Spender über 60 Jahre alt war. Die Auswertung der übrigen kategorisch eingeteilten Kriterien entsprechend den Grenzwerten ergeben keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich der Transplantate mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines histopathologischen IRS (Tab. 5-4).

**Tab. 5-4. Kategorisch eingeteilte Variablen der Grenzwerte der Marginalitätskriterien laut Eurotransplant<sup>34</sup> bezogen auf den Spender und das Transplantat.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenanzahl jeweils in runden Klammern.

		Gesamt	Kein IRS	IRS	p
Alter > 65 Jahre [%]	(46)	8,696 (4)	11,76 (2)	6,897 (2)	0,619
ICU-Aufenthalt > 7 Tage [%]	(46)	13,04 (6)	5,882 (1)	17,24 (5)	0,390
BMI > 30 kg/m <sup>2</sup> [%]	(46)	13,04 (6)	– (0)	20,69 (6)	0,071
Steatose > 40 % [%]	(46)	10,87 (5)	– (0)	17,24 (5)	0,142
Serum-GPT > 105 U/l [%]	(46)	13,04 (6)	17,65 (3)	10,34 (3)	0,655
Serum-GOT > 90 U/l [%]	(45)	17,39 (8)	29,41 (5)	10,71 (3)	0,226
Serumbilirubin > 3 mg/dl [%]	(46)	– (0)	– (0)	– (0)	–
Serumnatrium > 165 mmol/l [%]	(46)	– (0)	– (0)	– (0)	–

Das Ausmaß der Frequenz der Allokation marginaler Organe wird deutlich, wenn man bedenkt, dass allein in der Eurotransplant-Region 50 % der Lebertransplantate von Spendern mit erweiterten Spenderkriterien stammen.<sup>47</sup> In Übereinstimmung mit dieser Angabe wurden in dem Patientenkollektiv dieser Arbeit (n = 46) in 54 % der Fälle (n = 25) marginale Lebertransplantate alloziert (Tab. 5-6).



**Abb. 14. Prozentuale Häufigkeiten des IRS des Patientenkollektivs und der Marginalität der Transplantate.** Vergleich der Patienten mit nicht marginalem (A) und marginalem Transplantat (B). Patientenanzahl in Tab. 5-6.

### 68 % des Patientenkollektivs entwickeln bei Transplantation eines marginalen Organs einen IRS

Erstaunlicherweise entwickeln 68 % (n = 17) des Patientenkollektivs bei Transplantation eines marginalen Organs einen IRS (p = 0,447) (Abb. 14 B). Dabei liegt bei Transplantation eines marginalen Organs das Entwicklungsrisiko eines IRS gemäß Odds-Ratio 59 % höher im Vergleich zur Transplantation nicht marginaler Organe. Umgekehrt haben Patienten, die einen IRS aufweisen, in 59 % (n = 17) der Fälle ein marginales Transplantat erhalten (p = 0,447).

### Transplantate von Spendern mit hohem BMI, hepatischer Steatose über 30 % sowie hohen Natriumwerten entwickeln signifikant häufiger einen IRS

Im Gegensatz zur Auswertung der kategorisch eingeteilten Kriterien entsprechend den von Eurotransplant definierten Grenzwerten (Tab. 5-4) ergeben sich bei der Analyse der kontinuierlichen Werte dieser Kriterien zum Teil statistisch signifikante Unterschiede bei der Gegenüberstellung der Gruppen mit beziehungsweise ohne histopathologischen IRS (Tab. 5-5).

**Tab. 5-5. Kontinuierliche Variablen der Marginalitätskriterien laut Eurotransplant<sup>34</sup> und Steatose über 30% bezogen auf den Spender und das Transplantat.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenzahl jeweils in runden Klammern.

	Gesamt	Kein IRS	IRS	p
Alter [Jahre] (46)	47,91 ± 15,15 (46)	47,12 ± 13,86 (17)	48,38 ± 16,08 (29)	0,546
ICU-Aufenthalt [Tage] (46)	4,337 ± 7,314 (46)	2,459 ± 2,311 (17)	5,437 ± 8,918 (29)	0,122
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] (46)	25,42 ± 4,484 (46)	24,05 ± 4,386 (17)	26,23 ± 4,414 (29)	0,045
Steatose > 30 % [%] (46)	19,57 (9)	– (0)	31,03 (9)	0,017
Serum-GPT [U/l] (46)	52,54 ± 67,11 (46)	46,00 ± 39,12 (17)	56,38 ± 79,52 (29)	0,750
Serum-GOT [U/l] (45)	66,93 ± 96,79 (45)	78,94 ± 111,0 (17)	59,64 ± 88,46 (28)	0,582
Serumbilirubin [mg/dl] (46)	11,90 ± 7,722 (46)	11,49 ± 8,314 (17)	12,14 ± 7,494 (29)	0,793
Serumnatrium [mmol/l] (46)	147,5 ± 6,080 (46)	145,0 ± 5,232 (17)	148,9 ± 6,152 (29)	0,033

Bedeutenderweise entfalteten Organe von Spendern mit hohem BMI und histopathologisch gesicherter hepatischer Steatose über 30 % des Leberparenchyms signifikant häufiger einen IRS (Tab. 5-5). Weiterhin zeigt sich das Serumnatrium signifikant verschieden und in der Gruppe der Spender, deren Transplantate einen IRS entwickeln, erhöht (Tab. 5-5).

Auf Basis der ersten Einteilung des Patientenkollektivs entsprechend histopathologischer früher IRS-Zeichen in eine Gruppe mit An- und Abwesenheit eines IRS (5.2.1) und der

zweiten Einteilung entsprechend der Allokation marginaler Organe in eine Gruppe mit marginalen und nicht marginalen Transplantaten (5.2.2.4) wird eine dritte Einteilung in vier Untergruppen vorgenommen: Patienten ohne IRS mit nicht marginalem Transplantat, Patienten ohne IRS mit marginalem Transplantat, Patienten mit IRS mit nicht marginalem Transplantat und Patienten mit IRS und marginalem Transplantat (Tab. 5-6).

**Tab. 5-6. Übersicht der 3 Gruppeneinteilungen des Patientenkollektivs anhand des IRS und der Marginalität.** Patientenzahl jeweils in runden Klammern.

Gruppen- einteilung [%]	1	Kein IRS	IRS	2	NM	M
			36,96 (17)	63,04 (29)		45,65 (21)
	3	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	
		19,57 (9)	17,39 (8)	26,09 (12)	36,96 (17)	

Dabei zeigt sich, dass Patienten mit IRS und marginalem Transplantat zugleich fast doppelt so häufig vorkommen als Patienten ohne IRS mit nicht marginalem Transplantat, womit die Dimension der Bedeutung des IRS und der Marginalität in der klinischen Transplantationsmedizin nachvollziehbar wird.

### 5.2.3 Empfängercharakteristika

Da die Transplantatfunktion mitunter von den gegebenen Voraussetzungen im Empfängerorganismus beeinflusst wird, wird auf die Basischarakteristika, Grunderkrankungen und Allokationskriterien (4.2.1.2) näher eingegangen. Darüber hinaus kann der Erfolg der Transplantation nicht nur an der Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen und Re-LTx, sondern auch am Patienten- und Transplantatüberleben (4.2.1.2) festgemacht werden.

#### 5.2.3.1 Basischarakteristika

In diesem Abschnitt werden die Empfänger-Basischarakteristika Alter, Geschlecht, BMI, Dialyse und Ischämiezeiten (4.2.1.2) analysiert.

#### **Patienten, die im Vorfeld der LTx symptomatisch mittels Dialyse therapiert wurden, entwickeln signifikant häufiger einen IRS**

In Bezug auf den Zusammenhang der Nierenfunktion mit einem IRS ist bemerkenswert, dass Patienten, die vor LTx mittels Dialyse symptomatisch therapiert wurden, signifikant

häufiger einen IRS entfalten (Tab. 5-7). Die Analyse der übrigen Parameter ergibt keine signifikanten Unterschiede (Tab. 5-7). Es zeigen sich allenfalls schwache beziehungsweise sehr schwache Korrelationen eines hohen Alters ( $r = 0,155$ ) beziehungsweise eines hohen BMI ( $r = 0,135$ ) mit dem IRS (Tab. 5-7). Zudem tritt ein IRS häufiger bei männlichen Empfängern auf, wobei eine mittelgradige Korrelation ( $r = 0,478$ ) besteht (Tab. 5-7).

**Tab. 5-7. Basischarakteristika der Empfänger.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenanzahl jeweils in runden Klammern.

	Gesamt	Kein IRS	IRS	p
Alter [Jahre] (46)	50,11 ± 12,55 (46)	46,47 ± 14,82 (17)	52,24 ± 10,71 (29)	0,214
Männlich [%] (46)	71,74 (33)	64,71 (11)	75,86 (22)	0,505
BMI [kg/m <sup>2</sup> ] (46)	28,90 ± 8,227 (46)	27,91 ± 9,001 (17)	29,48 ± 7,844 (29)	0,275
Dialyse vor LTx [%] (46)	36,96 (17)	17,65 (3)	48,28 (14)	0,038
Kalte Ischämiezeit [h] (44)	8,747 ± 2,397 (44)	8,734 ± 3,057 (16)	8,754 ± 1,990 (28)	0,982
Warme Ischämiezeit [h] (44)	0,824 ± 0,177 (44)	0,836 ± 0,186 (16)	0,818 ± 0,175 (28)	0,756
Gesamte Ischämiezeit [h] (44)	9,571 ± 2,397 (44)	9,570 ± 3,035 (16)	9,572 ± 2,008 (28)	0,998

Das Auftreten eines IRS ist mitunter von der Nierenfunktion des Empfängers abhängig, womit das Empfängerprofil entscheidend zum Erfolg nach Transplantation beiträgt, weshalb im Zuge weiterer Analysen der Empfänger hinsichtlich deren Grunderkrankungen Stellung genommen wird.

### 5.2.3.2 Grunderkrankungen

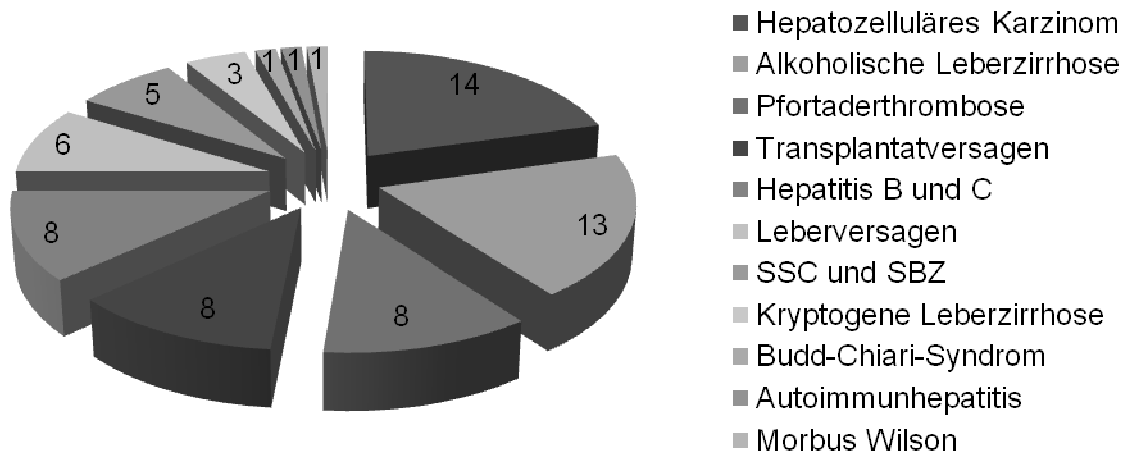
Im Folgenden soll mit den transplantationsinduzierten Grunderkrankungen der Empfänger (4.2.1.2) in Gegenüberstellung der Patienten mit beziehungsweise ohne IRS ein möglicher Einfluss der Grunderkrankung auf die Entstehung eines IRS detektiert werden.

#### **Das hepatozelluläre Karzinom und die alkoholische Leberzirrhose stellen die häufigsten transplantationsinduzierten Grunderkrankungen der Empfänger dar**

Grafisch dargestellt ist die Verteilung der Grunderkrankungen des gesamten Patientenkollektivs (Abb. 15). Bei einigen Patienten bestehen zugleich mehrere Grunderkrankungen. Die beiden häufigsten Grunderkrankungen sind das hepatozelluläre Karzinom und die alkoholische Leberzirrhose (Tab. 5-8; Abb. 15).

**Tab. 5-8. Grunderkrankung der Empfänger.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenzahl jeweils in runden Klammern.

		Gesamt	Kein IRS	IRS	p
Hepatozelluläres Karzinom [%]	(46)	30,43 (14)	29,41 (5)	31,03 (9)	0,908
Alkoholische Leberzirrhose [%]	(46)	28,26 (13)	11,76 (2)	37,93 (11)	0,090
Pfortaderthrombose [%]	(46)	17,39 (8)	5,882 (1)	24,14 (7)	0,226
Transplantatversagen [%]	(46)	17,39 (8)	23,53 (4)	13,79 (4)	0,443
Hepatitis B und C [%]	(46)	17,39 (8)	17,65 (3)	17,24 (5)	1,000
Leberversagen [%]	(46)	13,04 (6)	11,76 (2)	13,79 (4)	1,000
SSC, SBZ [%]	(46)	10,9 (5)	11,76 (2)	10,34 (3)	1,000
Kryptogene Leberzirrhose [%]	(46)	6,5 (3)	11,76 (2)	3,448 (1)	0,545
Budd-Chiari-Syndrom [%]	(46)	2,2 (1)	0,000 (0)	3,448 (1)	1,000
Autoimmunhepatitis [%]	(46)	2,2 (1)	5,882 (1)	– (0)	0,370
Morbus Wilson [%]	(46)	2,2 (1)	5,882 (1)	– (0)	0,370



**Abb. 15. Grunderkrankungen der Empfänger.** Angabe der Patientenzahl.

Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Grunderkrankungen zwischen Patienten mit beziehungsweise ohne IRS (Tab. 5-8).

### 5.2.3.3 Allokationskriterien

Mit der Intention die prognostische Aussagefähigkeit der Allokationskriterien Lab-MELD und Exceptional-MELD sowie der HU-LTx (4.2.1.2) auf die Entwicklung eines IRS zu prüfen, wurden diese Faktoren in Gegenüberstellung der Patienten mit beziehungsweise ohne histopathologischen IRS untersucht.

### Allokationskriterien zeigen keinen Zusammenhang mit dem Auftreten eines IRS

Es wäre denkbar, dass die Schwere der Allokationskriterien der Empfänger und die Notwendigkeit einer HU-LTx eine eingeschränkte körperliche Verfassung signalisieren, die wiederum die Schädigung des Transplantats durch Ischämie und Reperfusion unterhält. Entgegen dieser Annahme zeigen sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede bei Vergleich der Allokationskriterien zwischen den beiden Gruppen (Tab. 5-9).

**Tab. 5-9. Höhe des Lab-MELD, Häufigkeiten von Exceptional-MELD und HU-LTx der Empfänger.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenanzahl jeweils in runden Klammern.

	Gesamt	Kein IRS	IRS	p
Lab-MELD (46)	29,54 ± 10,34 (46)	28,29 ± 8,608 (17)	30,28 ± 11,31 (29)	0,212
Exceptional-MELD [%] (46)	26,09 (12)	35,29 (6)	20,69 (6)	0,314
HU-LTx [%] (46)	19,57 (9)	23,53 (4)	17,24 (5)	0,707

Während die Allokationskriterien keinen Zusammenhang mit dem Auftreten eines IRS zeigen, könnten die Häufigkeiten von Abstoßungsreaktionen und Re-LTx schon eher als Folge eines IRS auftreten, was im folgenden Abschnitt näher betrachtet wird.

#### 5.2.3.4 Abstoßungsreaktionen und Re-Lebertransplantationen

Unter der Annahme, dass sich nicht nur das Vorhandensein eines IRS, sondern auch der Faktor der Marginalität auf die Transplantatfunktion nach Transplantation auswirkt, wurden hier die Häufigkeiten des Auftretens sowohl von Abstoßungsreaktionen als auch von Re-LTx (4.2.1.2) jeweils innerhalb der 3 Gruppeneinteilungen (5.2.2.4, Tab. 5-6) analysiert. Es wurden 2nd-Look-Biopsien der Lebertransplantate in einem Zeitraum binnen 6 Wochen nach Transplantation durch das Institut für Pathologie in Regensburg bezüglich des Vorhandenseins akuter Abstoßungsreaktionen befundet.

#### Abstoßungsreaktionen und Re-Lebertransplantationen treten gehäuft in der Gruppe der Patienten mit histopathologischem IRS auf

IRS-Patienten besitzen entsprechend der Odds-Ratio ein 56 % höheres Risiko binnen 6 Wochen nach LTx eine zelluläre Abstoßungsreaktion zu entwickeln und ein 85 % höheres Risiko sich einer erneuten LTx unterziehen zu müssen. Paradoxerweise weisen Patienten mit marginalem Transplantat gegenüber Patienten mit nicht marginalem Transplantat ein 0,58-mal so großes Risiko einer zellulären Abstoßungsreaktion und ein

0,83-mal so großes Risiko der Notwendigkeit einer Re-LTx auf. Statistisch signifikante Unterschiede ergeben sich jedoch nicht (Tab. 5-10).

**Tab. 5-10. Häufigkeiten zellulärer Abstoßungsreaktion binnen 6 Wochen nach LTx sowie Re-LTx der Empfänger.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS sowie marginalem und nicht marginalem Transplantat, entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenanzahl jeweils in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Abstoßung [%] (46)	15,22 (7)	11,76 (2)	17,24 (5)	1,000	19,05 (4)	12,00 (3)	0,686
Re-LTX [%] (46)	8,696 (4)	5,882 (1)	10,34 (3)	1,000	9,524 (2)	8,000 (2)	1,000

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Abstoßung [%] (46)	11,11 (1)	12,50 (1)	25,00 (3)	11,76 (2)	0,805
Re-LTX [%] (46)	11,11 (1)	– (0)	8,333 (1)	11,76 (2)	1,000

Die Analyse offenbart somit, dass Patienten mit IRS nicht nur häufiger eine histopathologische Abstoßungsreaktion zeigen, sondern auch häufiger retransplantiert werden, womit der IRS mit einem schlechteren Outcome nach Transplantation assoziiert ist. Um überdies die Prognose des IRS und marginaler Organe noch genauer zu analysieren, bedarf es einer Betrachtung des Patienten- und Transplantatüberlebens.

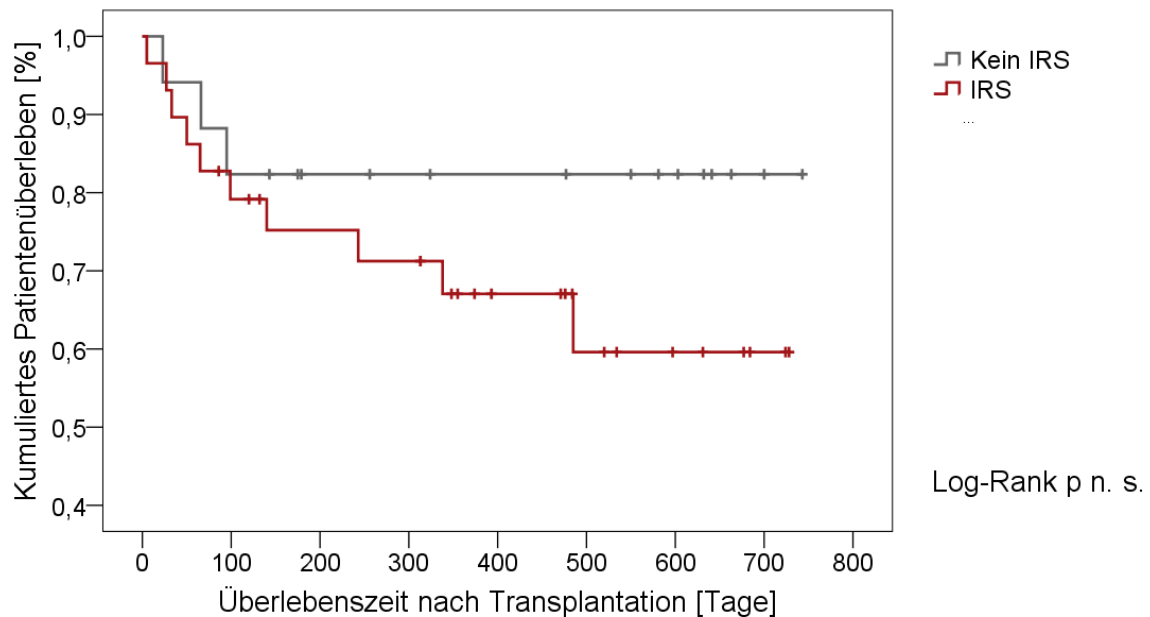
### 5.2.3.5 Überlebensdaten

Um eine Vorhersage des Transplantationserfolgs bei Auftreten eines IRS beziehungsweise bei marginalen Organen treffen zu können, wird in diesem Abschnitt ein Blick auf das Patientenüberleben (4.2.1.2) geworfen.

#### **Patienten mit IRS versterben häufiger und haben eine kürzere Überlebensdauer sowie geringere Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu Patienten ohne IRS**

Unter der Annahme, dass Patienten mit IRS bezüglich des Überlebens gegenüber Patienten ohne IRS benachteiligt sind, wird zunächst ein Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen aufgeführt. Dabei zeigt der Vergleich entsprechend der 1. Gruppeneinteilung nach dem Auftreten beziehungsweise der Abwesenheit eines IRS (5.2.2.4, Tab. 5-6 A), dass Patienten gehäuft in der IRS-Gruppe versterben und diese eine im Schnitt kürzere Überlebensdauer aufweisen im Vergleich zu Patienten ohne IRS, wobei jedoch kein Signifikanzniveau erreicht wird (Tab. 5-11 A). Die Überlebenswahrscheinlichkeit, das sog-

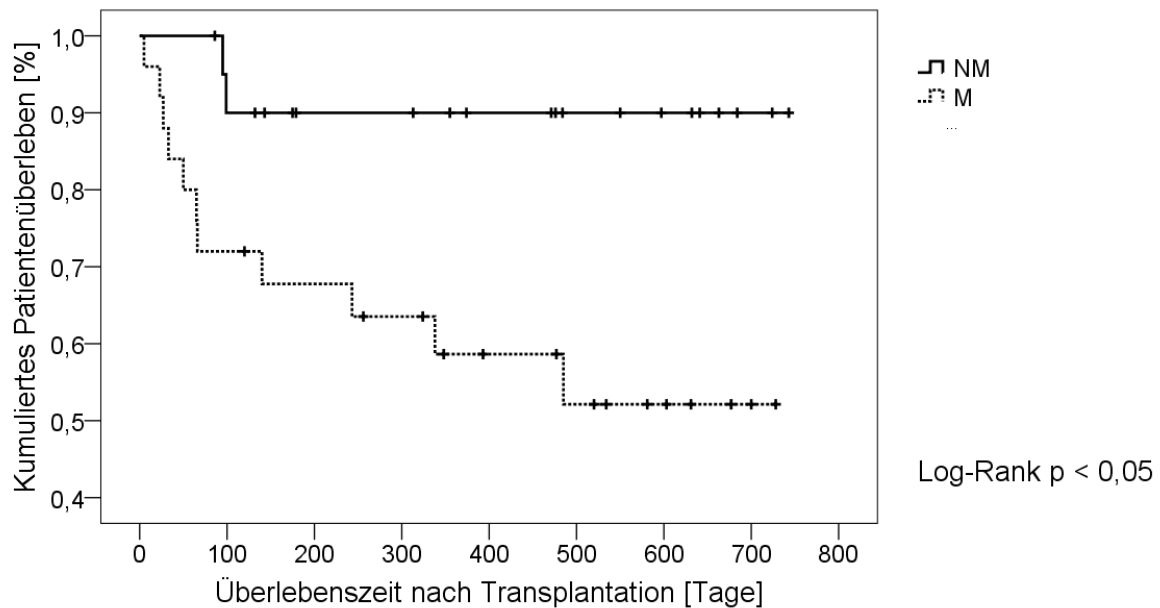
nannte kumulierte Patientenüberleben, zeigt ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich dieser beiden Gruppen (Abb.16; Tab. 5-11 A).



**Abb.16. Kumuliertes Patientenüberleben im Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS. Patientenanzahl jeweils in Tab. 5-11.**

### **Patienten mit marginalem Transplantat versterben signifikant häufiger, haben eine kürzere Überlebensdauer und besitzen eine signifikant geringere Überlebenschance als Patienten mit nicht marginalem Transplantat**

Im zweiten Schritt wurde analysiert, ob die Allokation marginaler Organe einen Einfluss auf das Überleben zeigt. Erstaunlicherweise offenbart diese Analyse innerhalb der 2. Gruppeneinteilung von Patienten mit marginalem beziehungsweise nicht marginalem Transplantat (5.2.2.4, Tab. 5-6 A), dass Patienten mit marginalem Transplantat nicht nur signifikant häufiger versterben, sondern auch eine signifikant geringere Überlebenschance besitzen, wie in Abb. 17 gezeigt wird (Tab. 5-11 A).

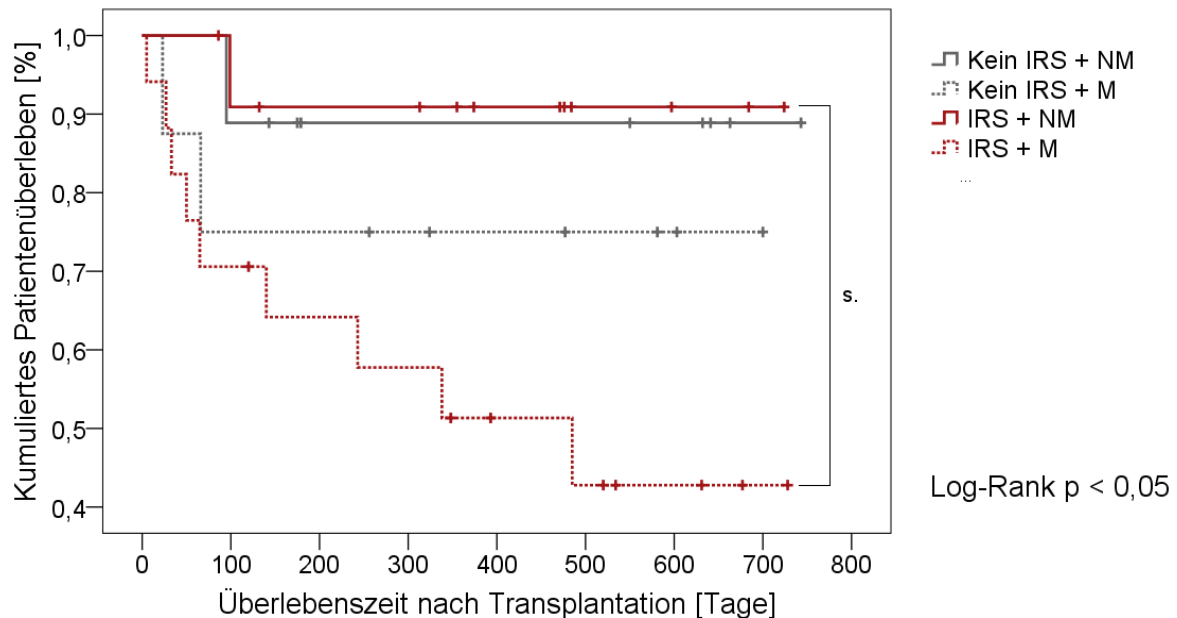


**Abb. 17. Kumuliertes Patientenüberleben im Vergleich der Patienten mit marginalem beziehungsweise nicht marginalem Transplantat.** Patientenanzahl jeweils in Tab. 5-11.

### **Patienten mit IRS und zugleich marginalem Transplantat versterben nicht nur signifikant häufiger, sondern weisen auch signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeiten auf im Vergleich zu Patienten mit IRS und nicht marginalem Transplantat**

Das Ausmaß, dass Patienten mit marginalem Transplantat signifikant schlechtere Überlebensdaten aufweisen als Patienten mit nicht marginalem Transplantat wird im dritten Schritt der Analyse deutlich. Dabei wird das Überleben von Patienten ohne IRS mit nicht marginalem Transplantat, Patienten ohne IRS mit marginalem Transplantat, Patienten mit IRS mit nicht marginalem Transplantat und Patienten mit IRS und marginalem Transplantat, entsprechend der 3. Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6 B), verglichen (Abb. 18; Tab. 5-11 B). Es zeigt sich nämlich, dass Patienten mit IRS und marginalem Transplantat nicht nur signifikant häufiger versterben, sondern auch signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeiten aufweisen (Abb. 18; Tab. 5-11 B). Die genauere Betrachtung der Analyse der Überlebenswahrscheinlichkeit, des sogenannten kumulierten Patientenüberlebens, entsprechend der 3. Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6 B), demonstriert, dass der signifikante Unterschied der verschiedenen Überlebenswahrscheinlichkeiten im Vergleich der IRS-Patienten mit marginalem beziehungsweise mit nicht marginalem Organ herrührt (Abb. 18; Tab. 5-11 D). Zwischen den IRS-Patienten mit marginalem und den IRS-Patienten mit nicht marginalem Transplantat besteht also statistisch betrachtet der signifikante Unterschied innerhalb der 3. Gruppeneinteilung (5.2.2.4,

Tab. 5-6 B) in Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit (Abb. 18; Tab. 5-11 D), aber auch auf die Anzahl der verstorbenen Patienten (Abb. 18; Tab. 5-11 C). Analog dazu besteht der größte Unterschied der 1-Jahresüberlebensrate ebenfalls zwischen diesen beiden Gruppen mit 51 % versus 91 % (Tab. 5-12 B).



**Abb. 18. Kumuliertes Patientenüberleben im Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS sowie marginalem und nicht marginalem Transplantat.** Patientenanzahl jeweils in Tab. 5-11.

### **Patienten mit marginalem Transplantat weisen bei zusätzlicher Entwicklung eines IRS deutlich schlechtere Überlebensdaten auf, als Patienten, die trotz eines marginalen Transplantats vom IRS verschont bleiben**

Interessanterweise zeigt sich sowohl grafisch (Abb. 18) als auch bei der Betrachtung der Überlebensdaten (Tab. 5-12 B), dass es innerhalb der Gruppe der Patienten mit nicht marginalem Transplantat für das Überleben kaum eine Rolle spielt, ob ein IRS an- oder abwesend ist. Beachtlicherweise sticht aber bei dieser Form der Betrachtung ins Auge, dass sich bei Patienten mit marginalem Organ der Einfluss der zusätzlichen Entwicklung eines IRS enorm negativ auf das Überleben auswirkt im Vergleich zu Patienten mit marginalem Organ, die keinen IRS entwickeln (Abb. 18). Anschaulicherweise beträgt demnach die 1-Jahresüberlebensrate innerhalb der Gruppe der Patienten mit marginalem Transplantat bei abwesendem IRS 75 % im Vergleich zu den nur 51 % bei Vorhandensein eines IRS (Tab. 5-12 B).

**Tab. 5-11. Häufigkeit der verstorbenen Patienten, Überlebensdauer und Überlebenswahrscheinlichkeit.** Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS sowie marginalem und nicht marginalem Transplantat, entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6), mit zusätzlicher Darstellung der p-Werte zwischen den verschiedenen Gruppen innerhalb der 3. Gruppeneinteilung für die Überlebenswahrscheinlichkeit (C) und die Häufigkeit der verstorbenen Patienten (D). Patientenzahl jeweils in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Verstorben [%] (46)	28,26 (13)	17,65 (3)	34,48 (10)	0,315	9,524 (2)	44,00 (11)	0,010
Überlebens- dauer [Tage]	369,2 ± 241,2 (46)	403,0 ± 253,7 (17)	349,4 ± 235,9 (29)	0,381	410,3 ± 233,6 (21)	334,7 ± 246,9 (25)	0,221
Überlebens- wahrsch. [Tage]	557,0 (46)	662,7 (17)	509,1 (29)	0,248	678,4 (21)	454,6 (25)	0,014

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Verstorben [%] (46)	11,11 (1)	25,00 (2)	8,333 (1)	52,94 (9)	0,038
Überlebens- dauer [Tage]	424,6 ± 267,9 (9)	378,8 ± 252,6 (8)	399,6 ± 216,1 (12)	313,9 ± 249,1 (17)	0,561
Überlebens- wahrsch. [Tage]	671,0 (9)	536,1 (8)	667,2 (12)	409,8 (17)	0,047

<b>C</b>	Gruppe	vs.	Gruppe	p	Gruppe	vs.	Gruppe	p
Ver- storben [%]	Kein IRS + NM		Kein IRS + M	0,576	Kein IRS + M		IRS + NM	0,537
	Kein IRS + NM		IRS + NM	1,000	Kein IRS + M		IRS + M	0,234
	Kein IRS + NM		IRS + M	0,087	IRS + NM		IRS + M	0,019

<b>D</b>	Gruppe	vs.	Gruppe	p	Gruppe	vs.	Gruppe	p
Über- lebens- wahrsch. [Tage]	Kein IRS + NM		Kein IRS + M	0,420	Kein IRS + M		IRS + NM	0,294
	Kein IRS + NM		IRS + NM	0,854	Kein IRS + M		IRS + M	0,278
	Kein IRS + NM		IRS + M	0,061	IRS + NM		IRS + M	0,028

**Tab. 5-12. Überlebensraten des Patientenkollektivs.** Darstellung des kumulierten Anteils Überlebender und Standardfehler im Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS sowie marginalem und nicht marginalem Transplantat, entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenzahl jeweils in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	NM	M
30 Tage	0,93 ± 0,04 (43)	0,94 ± 0,06 (16)	0,93 ± 0,05 (27)	1,00 ± 0,00 (21)	0,88 ± 0,06 (22)
90 Tage	0,85 ± 0,05 (38)	0,88 ± 0,08 (15)	0,83 ± 0,07 (23)	1,00 ± 0,00 (20)	0,72 ± 0,09 (18)
1 Jahr	0,72 ± 0,07 (23)	0,82 ± 0,09 (9)	0,67 ± 0,09 (14)	0,90 ± 0,07 (12)	0,59 ± 0,10 (11)

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M
30 Tage	1,00 ± 0,00 (9)	0,88 ± 0,12 (7)	1,00 ± 0,00 (12)	0,88 ± 0,08 (15)
90 Tage	1,00 ± 0,00 (9)	0,75 ± 0,15 (6)	1,00 ± 0,00 (11)	0,71 ± 0,11 (12)
1 Jahr	0,89 ± 0,10 (5)	0,75 ± 0,15 (4)	0,91 ± 0,09 (7)	0,51 ± 0,12 (7)

Neben dem Patientenüberleben wurde auch das Transplantatüberleben betrachtet. Innerhalb des Patientenkollektivs kam es in 33 % ( $n = 15$ ) der Fälle durch die Notwendigkeit einer Re-LTx oder durch den Tod des Patienten zum Transplantatverlust. Es liegen damit lediglich 2 zusätzliche Fälle im Vergleich zu der Anzahl verstorbener Patienten (Tab. 5-11 A) vor. Damit unterscheidet sich das Transplantatüberleben im Wesentlichen nicht vom Patientenüberleben.

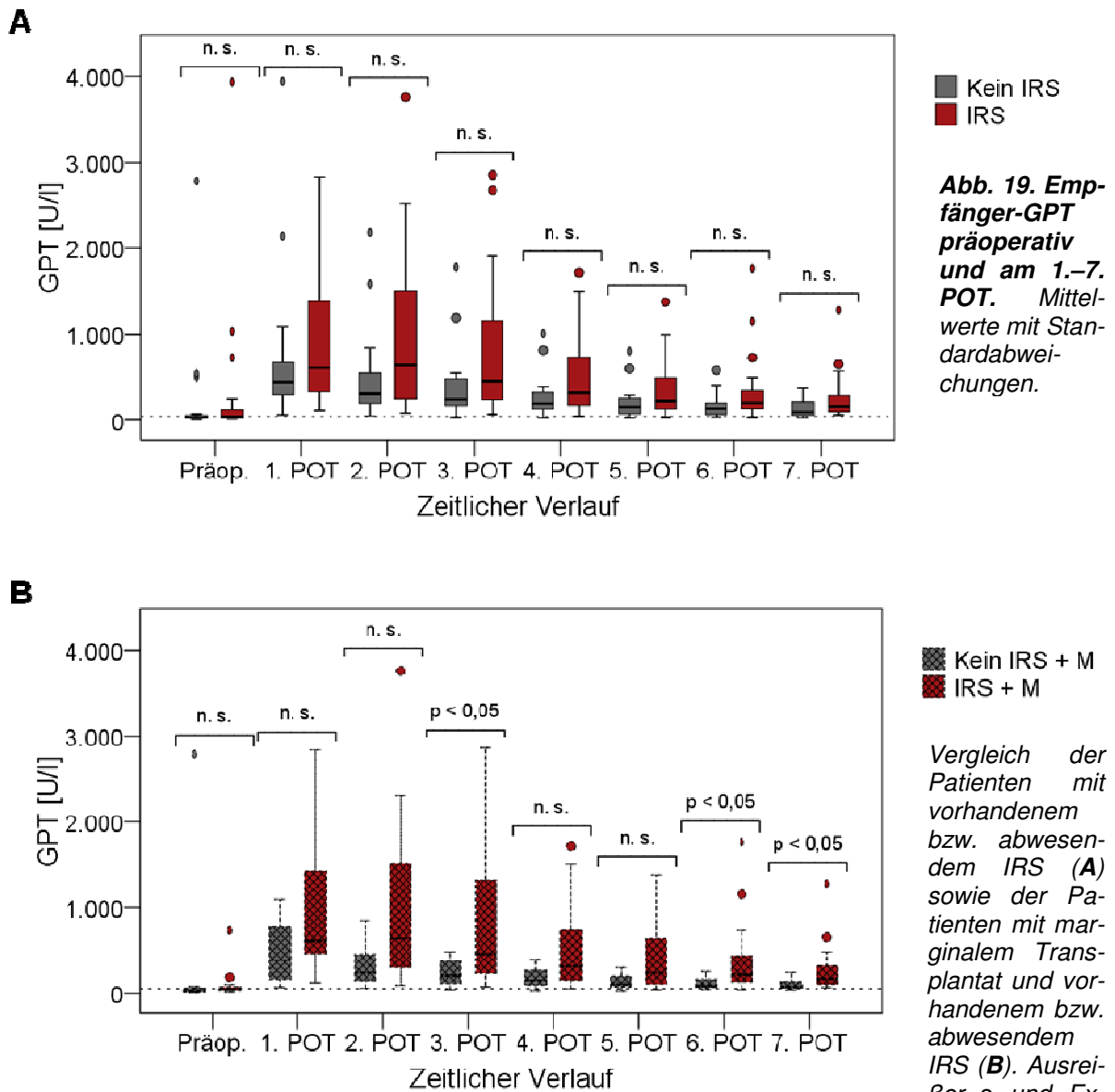
Während Patienten mit nicht marginalem Transplantat unabhängig vom Vorhandensein oder der Abwesenheit eines IRS eine etwa gleich lange 1-Jahresüberlebensrate aufweisen, haben Patienten mit marginalem Transplantat, die zudem noch einen IRS entwickeln, eine viel schlechtere Prognose, als Patienten mit marginalem Organ, die keinen IRS aufweisen. Erst damit wird die Dimension der Problematik marginaler Organe im Zusammenhang mit dem IRS sowohl im Hinblick auf die zunehmende Allokation marginaler Organe als auch auf die hohe Prävalenz des IRS im Rahmen der orthotopen LTx deutlich. Aus diesem Grund wurde die Analyse der Spuren, die der IRS im klinisch-laborchemischen Verlauf nach Transplantation hinterlässt, nicht nur auf den Vergleich des Patientenkollektivs mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS angewendet. Vielmehr wurde die Analyse der laborchemischen Parameter vor dem Hintergrund der hiesigen Überlebensanalyse im Hinblick auf die Patienten mit marginalem Transplantat und zusätzlicher An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS durchgeführt.

#### **5.2.4 Laborchemische Verläufe lebertransplantierter Patienten**

Um sowohl die Ausgangssituation der Empfänger vor der Transplantation abzubilden als auch die Funktion der Lebertransplantate nach Transplantation, wurden die präoperativen Laborparameter der Empfänger und die Werte der ersten 7 POT analysiert. Neben Parametern, die den Leberzellschaden, die Cholestase und die Syntheseleistung der Leber abbilden, wurde auch das Stoffwechselendprodukt Laktat untersucht. Dabei wurden nicht nur Patienten mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS verglichen, sondern insbesondere auch isoliert die Patienten mit marginalem Organ in Bezug auf die An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS, was auf den Ergebnissen der Überlebensanalyse basiert (5.2.3.5). Denn diese offenbart, dass Patienten mit marginalem Transplantat, die zudem noch einen IRS entwickeln eine viel schlechtere Prognose aufweisen gegenüber Patienten mit marginalem Organ ohne IRS.

### 5.2.4.1 GPT, GOT und GLDH

Mit der Intention, die Auswirkungen des IRS und der Marginalität auf die Leberzellen zu analysieren, wurden die laborchemischen Parameter GPT, GOT und GLDH (4.2.1.2) herangezogen, die Indikatoren des Leberzellschadens darstellen.



In A und B jeweils nicht abgebildet: 1. POT 6983 U/l (0 IRS); 2. POT 7.000 U/l (0 IRS). Signifikanzniveau über dem Querbalken. Referenzbereich unterhalb der gestrichelten Linie. Patientenzahl der Gruppen jeweils im Anhang A1.

### **Die Marginalität der Lebertransplantate und die zusätzliche Entwicklung eines IRS sind zum Teil mit einer signifikant höheren GPT assoziiert**

Interessanterweise ist die GPT, die ein zytosolisches Enzym und das organspezifische Leitenzym für Erkrankungen von Leber und Gallenwegen darstellt,<sup>202</sup> bei Vergleich des Patientenkollektivs mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS statistisch nicht signifikant verschieden, wobei allerdings in der IRS-Gruppe postoperativ tendenziell höhere GPT-Spiegel aufzufinden sind (*Abb. 19 A; Anhang A1 A*). Während der mittlere Wert präoperativ in der Gruppe der Patienten mit nicht marginalem Transplantat erhöht ist, zeigen sich am 1., 2. und 6. POT deutlich höhere Werte in der Gruppe der Patienten mit marginalem Transplantat (*Anhang A1 A*). Die isolierte Analyse der Patienten mit marginalem Transplantat zeigt, dass Patienten mit zusätzlichem IRS eine signifikant höhere Leberzellschädigung an den POT 3, 6 und 7 aufweisen als Patienten ohne IRS (*Abb. 19 B; Anhang A1 B*).

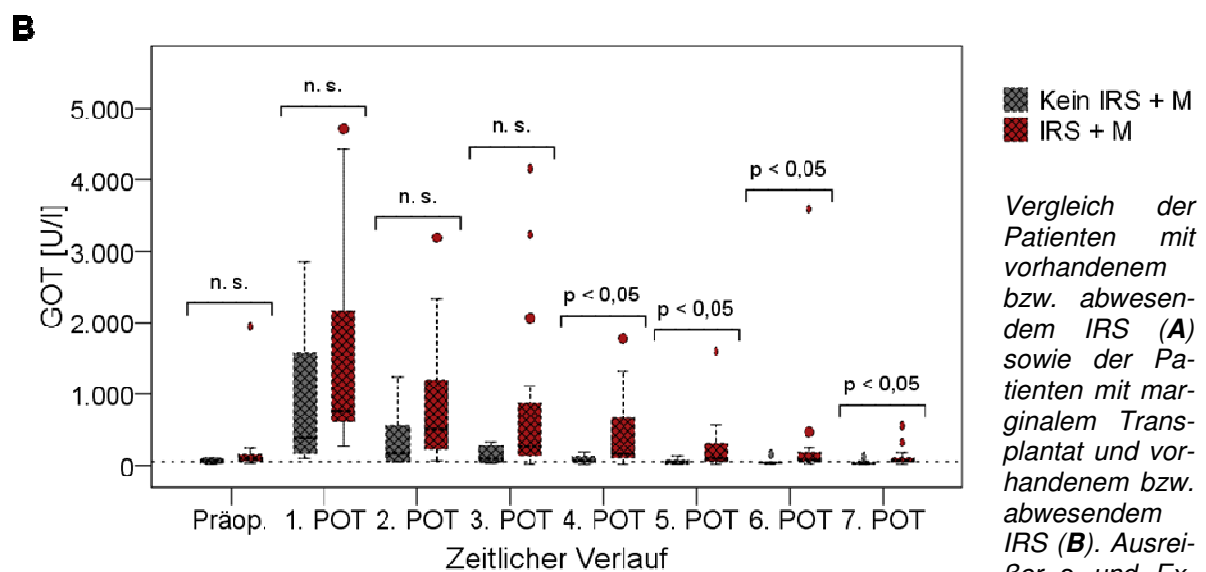
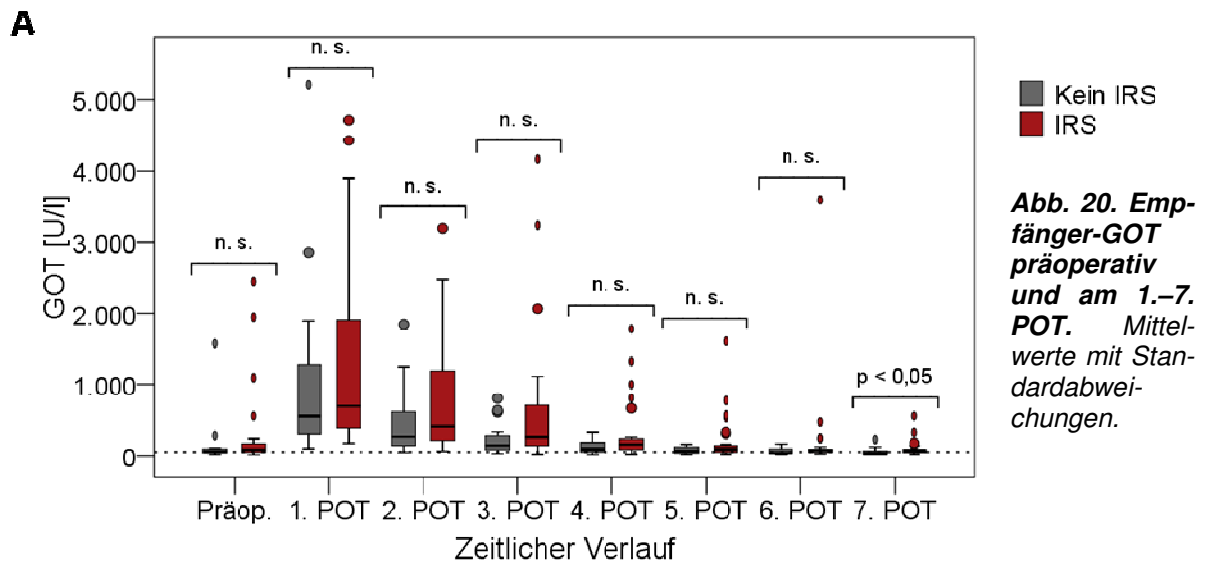
### **Patienten mit marginalem Transplantat und IRS zeigen an den POT 4–7 eine signifikant langsamere Normalisierung der GOT im Vergleich zu Patienten ohne IRS**

Die GOT ist neben der Bindung an mitochondriale Strukturen zytosolisch gelöst und nicht nur bei Erkrankungen von Leber und Gallenwegen, sondern auch bei Muskeldystrophie, Herzinfarkt, Lungeninfarkt und hämolytischen Anämien erhöht.<sup>202</sup> Damit ist die GOT weniger leberspezifisch als die GPT. Die GOT ist bei Vergleich des Patientenkollektivs mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS nur am 7. POT signifikant verschieden (*Abb. 20 A; Anhang A2 A*). Wiederum zeigt die isolierte Analyse der Patienten mit marginalem Transplantat, dass an den POT 4–7 Patienten mit zusätzlichem IRS eine signifikant langsamere Normalisierung der GOT im Vergleich zu den Patienten ohne IRS zeigen (*Abb. 20 B; Anhang A2 B*). Außerdem fällt auf, dass Ausreißer und Extremwerte hauptsächlich in der IRS-Gruppe zu finden sind (*Abb. 20*).

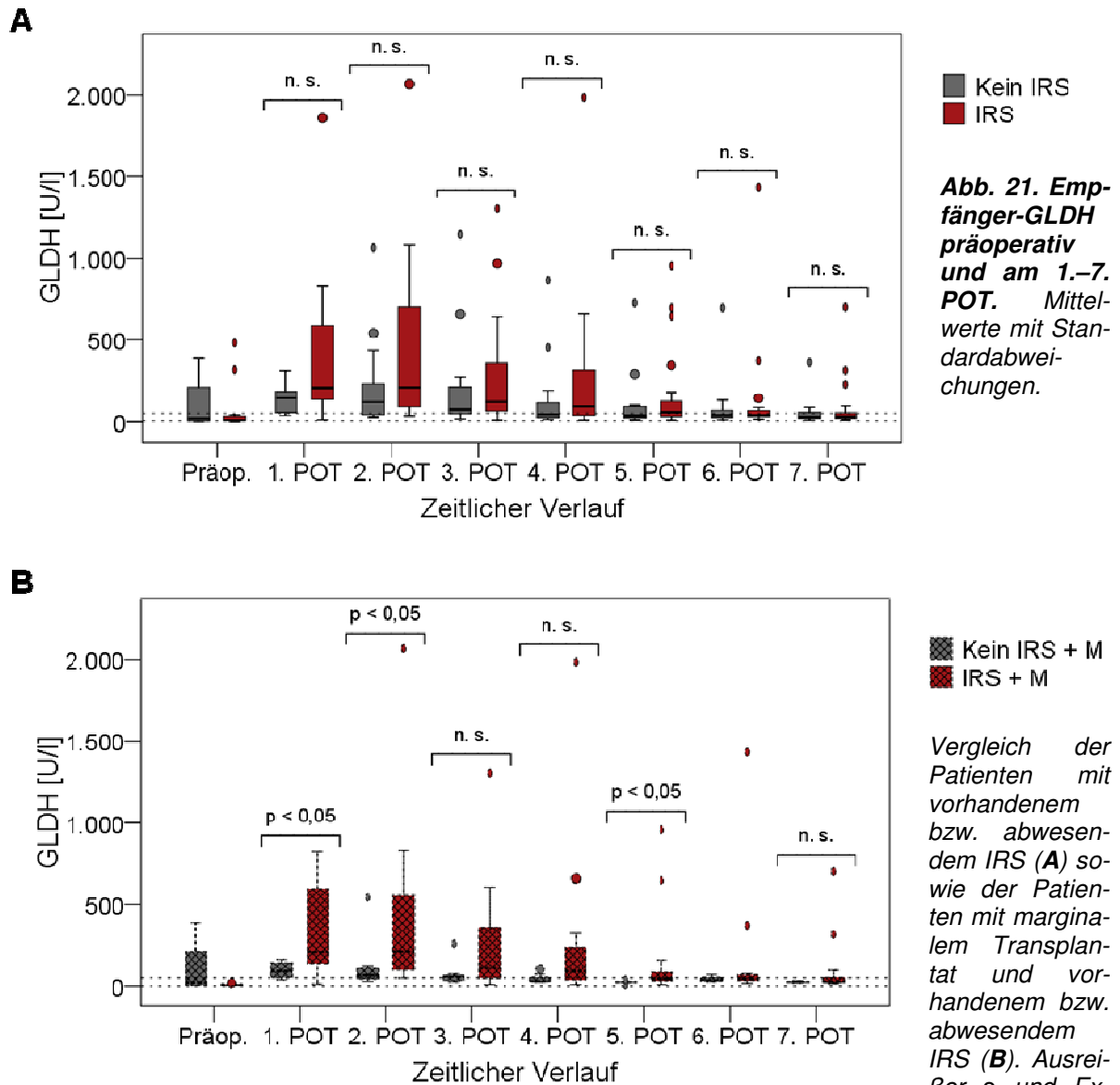
### **Patienten mit marginalem Transplantat und IRS zeigen an den POT 1, 2 und 5 signifikant höhere GLDH-Werte im Vergleich zu Patienten ohne IRS**

Die GLDH ist ein organspezifisches Enzym der Mitochondrien.<sup>202</sup> Da die zentrilobulären Anteile der Leberläppchen besonders empfindlich gegenüber Hypoxie sind und in diesem Bereich im Vergleich zur Außenzone eine 1,8-fach höhere Konzentration an GLDH vorliegt, kommt es bei hypoxischen Zuständen zu einem schnellen Anstieg der GLDH.<sup>202</sup> Analog zur GPT ergibt der Vergleich der GLDH der Patienten mit An- und Abwesenheit eines histopathologischen IRS keinen statistisch signifikanten Unterschied (*Abb. 21 A; Anhang A3 A*). Wiederum kommt ein signifikanter Unterschied der GLDH zwischen Patien-

ten mit und ohne IRS nur bei der isolierten Betrachtung der Patienten mit marginalem Organ an den POT 1, 2 und 5 zustande (Abb. 21 B; Anhang A3 B).



gebildet. In **A** nicht abgebildet: Präop. 6058 U/l (0 kein IRS); 1. POT 5206 U/l (o kein IRS), 8201 U/l (0 kein IRS), 21571 U/l (0 IRS); 2. POT 6079 U/l (0 IRS), 11407 U/l (0 IRS). In **B** nicht abgebildet: Präop. 6058 U/l (0 kein IRS); 1. POT 21571 U/l (0 IRS); 2. POT 6079 U/l (0 IRS), 11407 U/l (0 IRS). Signifikanzniveau über dem Querbalken. Referenzbereich unterhalb der gestrichelten Linie. Patientenzahl der Gruppen jeweils im Anhang A2.



**Abb. 21. Empfänger-GLDH präoperativ und am 1.–7. POT.** Mittelwerte mit Standardabweichungen.

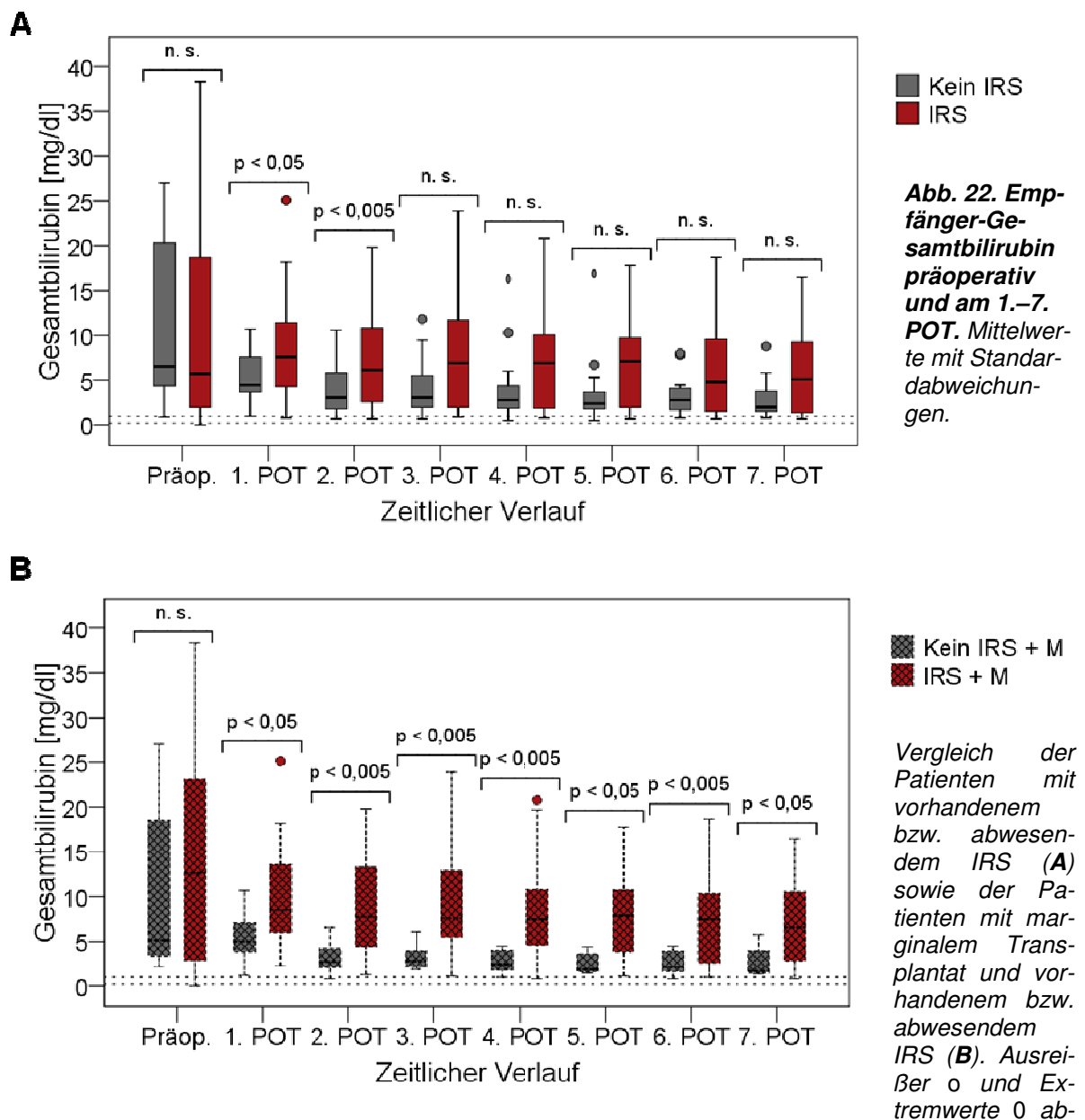
gebildet. In **A** nicht abgebildet: 1. POT 3061 U/l (0 kein IRS); 2. POT 4867 U/l (0 IRS); 3. POT 5297 U/l (0 IRS). In **B** nicht abgebildet: 2. POT 4867 U/l (0 IRS); 3. POT 5297 U/l (0 IRS). Signifikanzniveau über dem Querbalken. Referenzbereich innerhalb der gestrichelten Linien. Patientenanzahl der Gruppen jeweils im Anhang A3.

Die Analyse der laborchemischen Parameter des Leberzellschadens verdeutlicht, dass der alleinige IRS, unbeachtet des Faktors der Marginalität, bis auf eine Ausnahme für die GOT am 7. POT, keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe des Leberzellschadens ausübt im Vergleich zu Patienten ohne IRS. Werden allerdings alleinig die Werte der Patienten mit marginalem Transplantat betrachtet, so ergeben sich zunehmend signifikante Unterschiede in der Höhe des laborchemisch detektierbaren Schadens in Abhängigkeit von dem Vorhandensein oder der Abwesenheit eines IRS. Damit fällt die Darstellung des Faktors der Marginalität erneut einmal mehr ins Gewicht, weshalb dieser auch in weiteren Analysen Berücksichtigung finden soll.

### 5.2.4.2 Bilirubin, $\gamma$ -GT und AP

Cholestatische Zustände der Leber gehen mit einer Erhöhung der  $\gamma$ -GT, der AP und des Bilirubins (4.2.1.2) einher, weshalb diese Parameter auch im Zuge der Erforschung des IRS im Empfänger analysiert wurden.

**Der IRS und die Marginalität von Organen bewirken einen signifikanten Anstieg des Cholestaseparameters und Stoffwechselendprodukts Gesamtbilirubin**



Bilirubin, das Abbauprodukt des Hämoglobins, wird in der Leber mit Glucuronsäure konjugiert, um dann über die Galle und den Darm ausgeschieden zu werden.<sup>202</sup> Bei Bilirubinüberproduktion, gestörter Aufnahme in die Leber, verminderter Konjugation, gestörter Sekretion in die Galle und erhöhtem Rückstrom aus der Leber und den Gallenkapillaren ins Blut kommt es zum Anstieg des Parameters, was sich klinisch als Ikterus manifestiert.<sup>202</sup> Das Gesamtbilirubin setzt sich aus unkonjugiertem (indirektem) und konjugiertem (direktem) Bilirubin zusammen.<sup>202</sup> Bereits die Analyse des Gesamtbilirubins bei Gegenüberstellung der Patienten mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS demonstriert am 1. und 2. POT signifikante Unterschiede (*Abb. 22 A; Anhang A4 A*). Beachtlicherweise zeigt die alleinige Analyse der Patienten mit marginalem Transplantat, dass an allen 7 POT Patienten mit IRS statistisch signifikant höhere Bilirubinwerte aufweisen im Vergleich zu Patienten, die keinen IRS entwickelt haben (*Abb. 22 B; Anhang A4 B*).

### **Der IRS und die Marginalität von Organen haben keinen signifikanten Einfluss auf die Höhe der $\gamma$ -GT und der AP des Empfängers**

Die  $\gamma$ -GT stellt ein an Zellmembranen gebundenes Enzym dar, das in Zellen vorkommt, die Aminosäuren aus Körperflüssigkeiten aufnehmen.<sup>202</sup> Die  $\gamma$ -GT kommt vor allem in der Leber, im proximalen Tubulus der Niere und in den Mukosazellen des Dünndarms vor.<sup>202</sup> Einen Anstieg findet man beispielsweise bei Hepatitiden und toxisch-nutritiven Leberschäden durch Alkohol und Verschlussikterus.<sup>202</sup> Obwohl die im Serum messbare  $\gamma$ -GT-Aktivität ausschließlich auf die Leber zurückzuführen ist und damit ein organspezifisches Leitenzym darstellt,<sup>202</sup> ergeben sich keine relevanten statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Gruppen (*Anhang A5*).

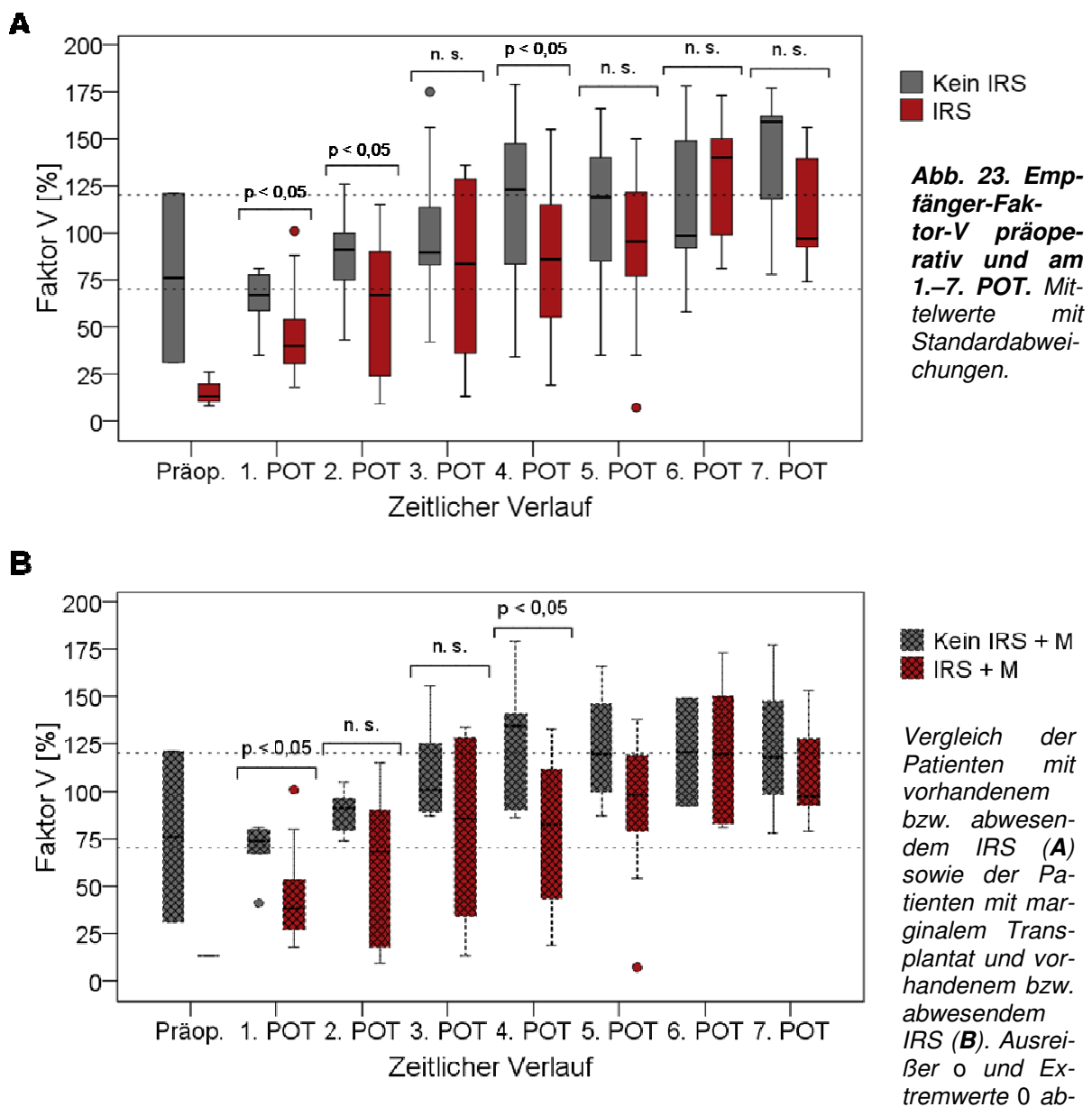
Dahingegen versteht man unter der AP eine Gruppe von Enzymen, die nur geringe Substratspezifität zeigen und membranständig sind.<sup>202</sup> Die AP ist nicht nur bei einem cholestatischen Leberzustand erhöht, sondern auch bei Knochenerkrankungen, wie dem Morbus Paget, Skelettmetastasen oder dem Hyperparathyreoidismus.<sup>202</sup> Es ergeben sich keine relevanten statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich der verschiedenen Gruppen (*Anhang A6*).

Zusammenfassend ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der  $\gamma$ -GT und AP, wobei aber Ausreißer und Extremwerte hauptsächlich in der Gruppe der Patienten mit IRS vorkommen. Demgegenüber kommt es im postoperativen Verlauf zu einer massiven Erhöhung des Gesamtbilirubins im Zusammenhang mit dem Auftreten eines IRS und der Allokation marginaler Organe.

### 5.2.4.3 Faktor V und Laktat

Ein möglicher Einfluss des IRS und der Marginalität auf die Syntheseleistung der Leber wurde anhand des Parameters Faktor V (4.2.1.2) detektiert. Faktor V wird auch als Proakzelerin bezeichnet und ist ein Gerinnungsfaktor der gemeinsamen Endstrecke des Gerinnungssystems.<sup>202</sup> Faktor V ist bei Leberfunktionsstörungen, Verbrauchskoagulopathie, systemischer Fibrinolyse oder angeborenen Störungen vermindert.<sup>202</sup>

**Der IRS und die Marginalität von Organen gehen mit einer verminderten hepatischen Syntheseleistung einher**



Vergleich der Patienten mit vorhandenem bzw. abwesendem IRS (A) sowie der Patienten mit marginalem Transplantat und vorhandenem bzw. abwesendem IRS (B). Ausreißer 0 und Extremwerte 0 abgebildet. Signifikanzniveau über dem Querbalken. Referenzbereich unterhalb der gestrichelten Linie. Patientenanzahl der Gruppen jeweils im Anhang A7.

Bedeutenderweise zeigen sich bereits bei Vergleich des Patientenkollektivs mit und ohne IRS am 1., 2. sowie 4. POT statistisch signifikante Unterschiede (*Abb. 23 A; Anhang A7 A*). Die Gegenüberstellung der Patienten mit marginalem Transplantat und An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS demonstriert, dass Patienten ohne IRS am 1. und 4. POT signifikant höhere Faktor-V-Spiegel aufweisen (*Abb. 23 B; Anhang A7 B*).

Der IRS und die Marginalität von Organen üben somit einen Einfluss auf die Produktion leberspezifischer Parameter aus. Mit der Beteiligung von Faktor V am Gerinnungssystem nimmt die Leber eine wichtige Rolle im gesamten Organismus ein, womit die Bedeutung möglicher Folgen einer Leberschädigung deutlich wird.

Laktat geht aus der anaeroben Glykolyse hervor und wird bei Gewebshypoxie infolge verschiedenster Störungen, wie Hypoperfusion beispielsweise im Rahmen einer Ischämie, freigesetzt. Überraschenderweise ergibt die Laktatanalyse jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Vorhandensein eines IRS oder den Faktor der Marginalität (*Anhang A8*). Ferner zeigt auch die isolierte Analyse der marginalen Transplantate keine signifikanten Unterschiede bei An- oder Abwesenheit eines IRS (*Anhang A8*).

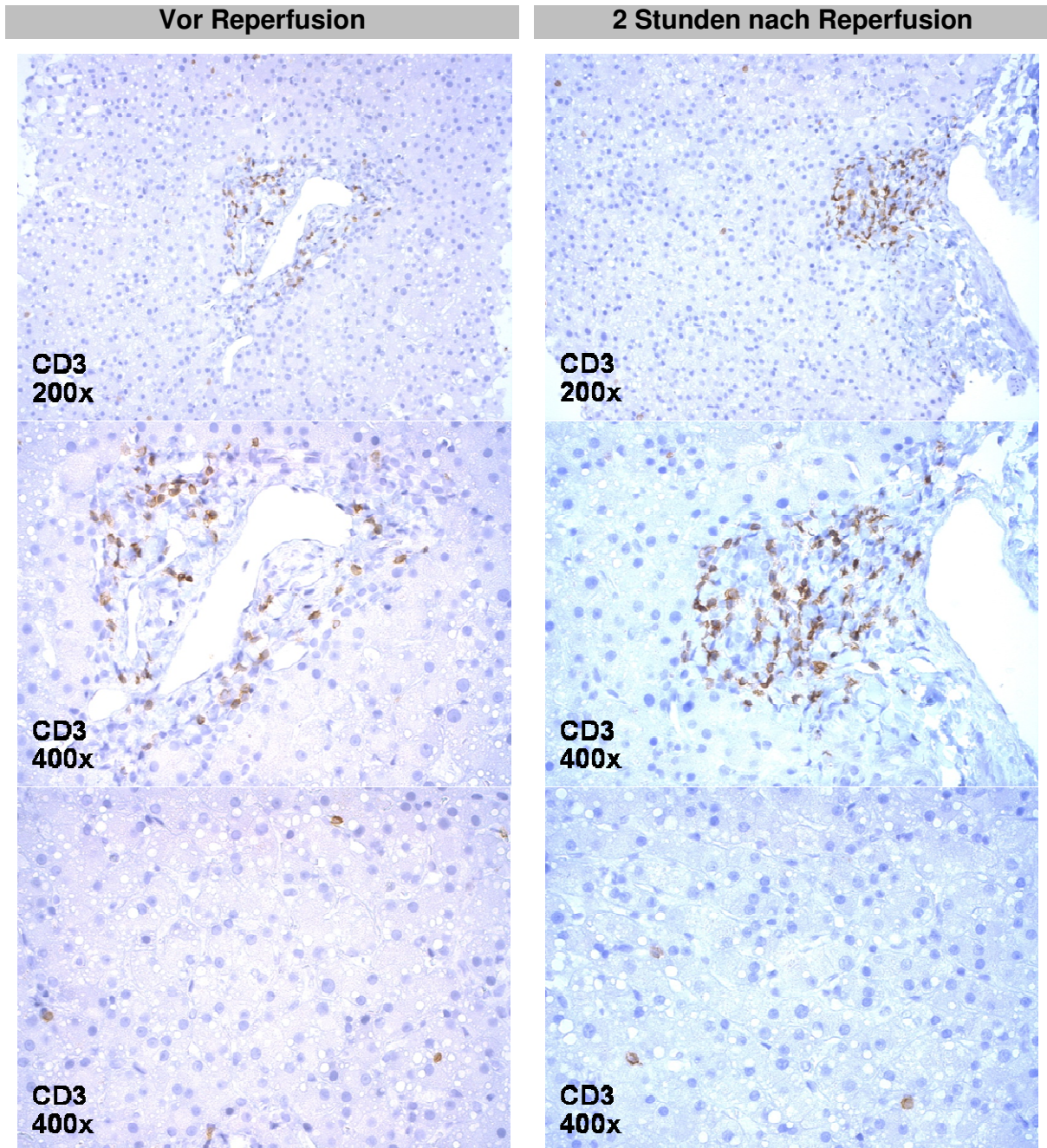
In Zusammenschau der laborchemischen Verläufe nach Transplantation wird deutlich, dass der IRS und die Marginalität von Organen nicht nur zu einer Leberzellschädigung, gemessen an GPT, GOT und GLDH, führen, sondern auch eine Erhöhung des Cholestaseparameters und Stoffwechselendprodukts Bilirubin sowie eine verminderte hepatische Syntheseleistung, gemessen an Faktor V, nach sich ziehen. Damit werden die Auswirkungen des IRS und der Marginalität im klinischen Verlauf manifest. Angesichts des signifikant schlechteren Überlebens im Zusammenhang mit dem IRS und der Marginalität ist es umso bedeutender, sowohl die Rolle der zellulären Mechanismen als auch die der im Tiermodell detektierten genetischen Faktoren im Rahmen der humanen LTx genauer zu eruieren.

### 5.2.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse

Im Tiermodell des partiellen warmen IRS zeigt sich eine beträchtliche Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen (*Abb. 7 C*). Dabei handelt es sich neben CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen um unkonventionelle IFN- $\gamma$ NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, die die prominenteste Quelle für IL-17A sind, welches in den Pathomechanismus des IRS maßgeblich involviert ist (*5.1.4*). Darauf basierend wurden zur Quantifizierung der Infiltration CD3<sup>+</sup>- und  $\gamma$  $\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen in humane Lebertransplantate die Leberstanzbiopsien (*3.2*) von 21 Patienten des Patientenkollektivs immunhistochemisch gefärbt (*4.2.2.2*).

### 5.2.5.1 Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen

Die Anzahl infiltrierender CD3<sup>+</sup>-Zellen wurde für die Leberläppchen und die Portalfelder separat quantifiziert. Im Folgenden sind exemplarische mikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch CD3-gefärbter Schnitte eines Patienten mit marginalem Transplantat und IRS abgebildet (Abb. 24).



**Abb. 24. Exemplarische Abbildung immunhistochemisch CD3-gefärbter Leberstanzbiopsien eines Patienten mit IRS und marginalem Transplantat in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen. Die oberen und mittleren Aufnahmen zeigen jeweils Portalfelder, während die restlichen Aufnahmen Bereiche aus den Leberläppchen darstellen.**

### Es ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen in Leberläppchen und Portalfelder

Die Quantifizierung der Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen in Leberläppchen (4.2.2.2) zeigt, dass der frühe IRS im Mittel eine tendenziell höhere Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen in Leberläppchen aufweist im Vergleich zu Patienten ohne IRS (Tab. 5-13 A). Dabei ergeben sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 5-13 A). Bedeutenderweise sind jedoch Ausreißer und Extremwerte in Richtung einer vermehrten Infiltration fast ausschließlich in der IRS-Gruppe zu finden (Tab. 5-13 A). Auch der Vergleich der Patienten mit marginalem beziehungsweise nicht marginalem Transplantat zeigt keine signifikanten Unterschiede (Tab. 5-13 A). Patienten mit marginalem Transplantat, die zudem noch einen IRS entwickeln, weisen eine viel schlechtere Prognose auf als Patienten mit marginalem Organ ohne IRS (5.2.3.5). Jedoch zeigt auch die isolierte Betrachtung der Patienten mit marginalem Transplantat, dass sich keine wesentlichen Unterschiede der CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration im Vergleich der Patienten mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS ergeben (Tab. 5-13 B).

**Tab. 5-13. CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration in Leberläppchen der humanen Transplantate.** Mittelwerte mit Standardabweichungen der Anzahl CD3<sup>+</sup>-Zellen von 10 Gesichtsfeldern in 200-facher Vergrößerung der Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion. Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenanzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Vor R.	35,47 ± 26,35 (21)	28,71 ± 13,56 (7)	38,84 ± 30,76 (14)	0,628	36,62 ± 25,07 (11)	34,20 ± 29,00 (10)	0,526
Nach R.	26,60 ± 23,65 (21)	21,71 ± 11,65 (7)	29,04 ± 27,90 (14)	0,881	28,31 ± 28,88 (11)	24,72 ± 17,56 (10)	0,888
Nach R. /vor R.	0,778 ± 0,365 (21)	0,784 ± 0,311 (7)	0,774 ± 0,400 (14)	0,955	0,682 ± 0,216 (11)	0,883 ± 0,470 (10)	0,238
<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p		
Vor R.	27,75 ± 11,33 (4)	30,00 ± 18,83 (3)	41,69 ± 30,01 (7)	36,00 ± 33,63 (7)	–		
Nach R.	18,68 ± 12,68 (4)	25,77 ± 11,08 (3)	33,81 ± 34,82 (7)	24,28 ± 20,52 (7)	–		
Nach R. /vor R.	0,625 ± 0,197 (4)	0,997 ± 0,338 (3)	0,714 ± 0,234 (7)	0,834 ± 0,533 (7)	–		

Auch die Analyse der Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen in die Portalfelder offenbart keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Patienten mit An- und Abwesenheit eines IRS (Tab. 5-14 A). Dahingegen deutlicher zeigen Patienten mit marginalem Transplantat eine

tendenziell höhere Infiltration in Portalfelder als Patienten mit nicht marginalem Transplantat (Tab. 5-14 A).

**Tab. 5-14. CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration in Portalfelder der humanen Transplantate.** Mittelwerte mit Standardabweichungen der Anzahl CD3<sup>+</sup>-Zellen pro mm<sup>2</sup> aller komplett einsehbaren Portalfelder der Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion. Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenanzahl in runden Klammern.

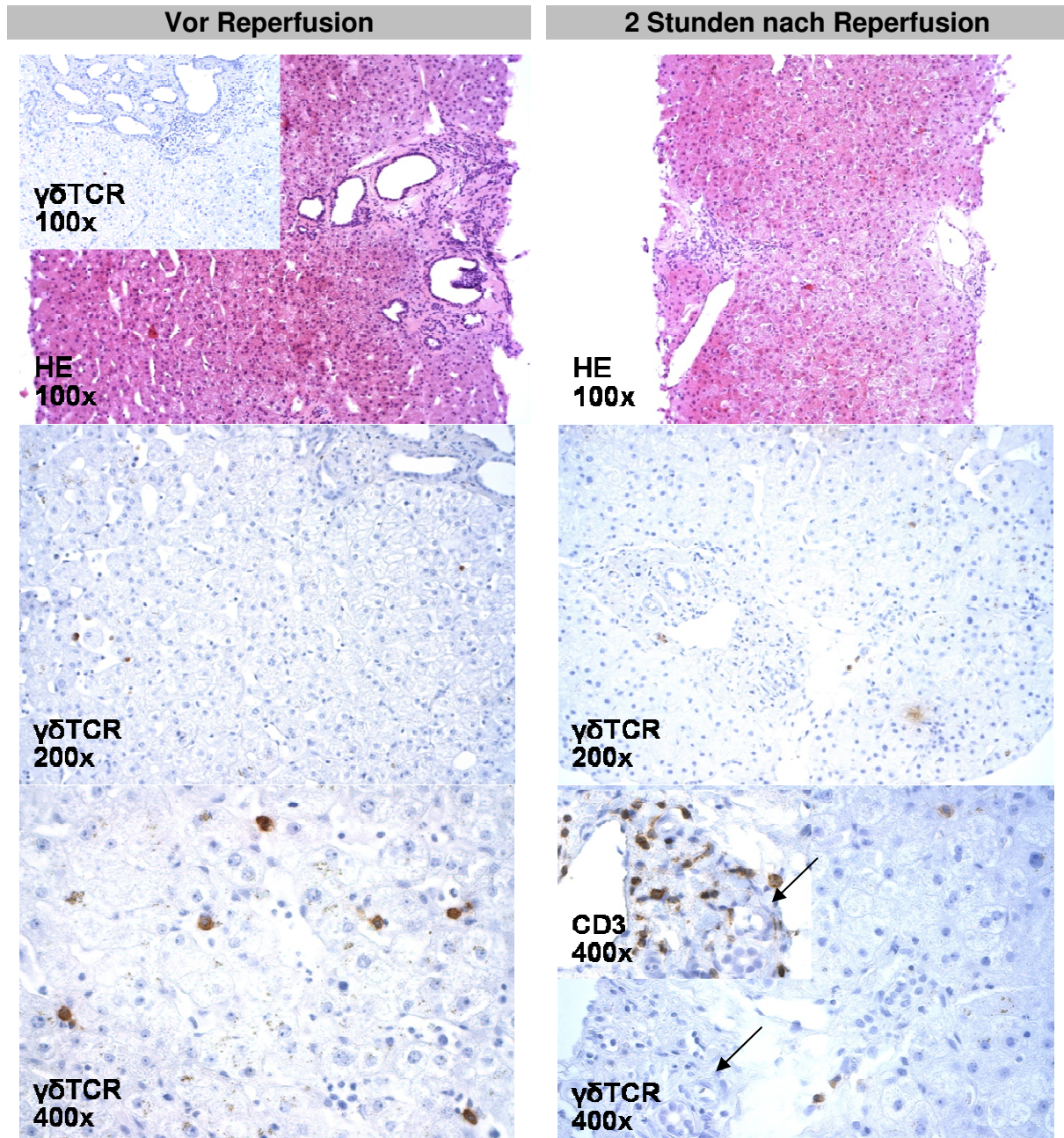
<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Vor R.	1.568 ± 884,9 (21)	1.765 ± 1.195 (7)	1.470 ± 717,2 (14)	0,709	1.373 ± 494,0 (11)	1.782 ± 1.171 (10)	0,326
Nach R.	1.452 ± 624,4 (21)	1.300 ± 516,1 (7)	1.528 ± 676,8 (14)	0,444	1.357 ± 727,7 (11)	1.556 ± 504,8 (10)	0,181
Nach R. /vor R.	1,083 ± 0,585 (21)	1,019 ± 0,848 (7)	1,115 ± 0,437 (14)	0,296	1,004 ± 0,450 (11)	1,170 ± 0,720 (10)	0,597
<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p		
Vor R.	1.312 ± 321,8 (4)	2.368 ± 1.781 (3)	1.408 ± 592,5 (7)	1.531 ± 868,7 (7)	–		
Nach R.	1.086 ± 470,6 (4)	1.586 ± 502,6 (3)	1.513 ± 833,4 (7)	1.544 ± 545,4 (7)	–		
Nach R. /vor R.	0,790 ± 0,223 (4)	1,323 ± 1,356 (3)	1,126 ± 0,514 (7)	1,104 ± 0,385 (7)	–		

### Die relative Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen bei Vergleich der Quotienten des Verhältnisses nach/vor Reperfusion findet eher in die Portalfelder als in die Leberläppchen statt

CD3<sup>+</sup>-Zellen infiltrieren nach der Reperfusion eher in die Portalfelder als in die Leberläppchen. Denn die Quotienten des Verhältnisses nach/vor Reperfusion sind bei der portalen Infiltration im Mittel meist größer als der Wert 1 (Tab. 5-14), während die Werte der lobulären Infiltration im Mittel kleiner als 1 sind (Tab. 5-13).

#### 5.2.5.2 Exemplarische Darstellung der Infiltration $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen

Um die Rolle der im Tiermodell detektierten T-Zellpopulationen im Rahmen des humanen IRS zu untersuchen, wurden die humanen Biopsien (3.2) nicht nur für CD3, sondern auch für  $\gamma\delta$ TCR immunhistochemisch gefärbt (4.2.2.2). Im Folgenden ist eine exemplarische histologische Abbildung eines marginalen Transplantats in Abwesenheit eines frühen IRS abgebildet (Abb. 25).



**Abb. 25. Immunhistochemisch  $\gamma\delta$ TCR- und HE-gefärbte Leberstanzbiopsien eines Patienten mit marginalem Transplantat in Abwesenheit eines IRS in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen.** Der Leberdünnschnitt der HE-gefärbten Biopsie vor Reperfusion zeigt laut pathologischem Befund trabekulär aufgebautes Leberparenchym ohne pathologische zytoplasmatische Ablagerungen. Keine Verfettung des Leberparenchyms. Einzelne Lymphozyten und Granulozyten in den Sinusoiden, einzelne Kupferzellen aktiviert. Keine hepatokanalikuläre Cholestase. Portalfelder entzündungsfrei und regelrecht konfiguriert. Gallengänge mit zartem kubischem Epithel. Fokal läppchenzentral und periportal leichtgradige Kollagenisierung der retikulären Fasern, jedoch keine relevante Faservermehrung. Kleines Cholangiom aus reifen kleinen Gallengangsproliferaten. Im Vergleich zum Befund vor Reperfusion zeigen sich im Leberdünnschnitt der HE-gefärbten Biopsie nach Reperfusion läppchenzentral einzelne fedrig degenerativ veränderte Hepatozyten. Granulozyteninfiltrate nicht vorhanden. Auch hier kein bindegewebiger Parenchymbau.

Die exemplarische Abbildung zeigt eine nur geringe Anzahl infiltrierender  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen. Dabei bildet die Aufnahme in 400-facher Vergrößerung nach Reperfusion ein identisches Portalfeld mit CD3-Färbung sowie  $\gamma\delta$ TCR-Färbung ab (Abb. 25). Während dieses Portalfeld mit CD3<sup>+</sup>-Zellen infiltriert ist, zeigen sich keine  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 25). Aufgrund der sehr geringen Infiltration  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen war daher eine Quantifizierung nicht sinnvoll. Zusammenfassend lassen sich 2 Stunden nach Reperfusion nur spärliche Infiltrate  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen nachweisen, wohingegen sich eine reichliche Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen zeigt. Jedoch ergeben sich keine eindeutigen Präferenzen einer CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration in Richtung des Vorhandenseins eines IRS beziehungsweise des Faktors der Marginalität. In Anbetracht des kurzen Zeitintervalls von nur 2 Stunden nach Reperfusion und unter Berücksichtigung der kleinen Patientenzahlen in den Gruppen zeigt aber die Infiltration dieser CD3<sup>+</sup>-Zellen, dass das spezifische Immunsystem im Rahmen des IRS möglicherweise eine entscheidende Rolle einnimmt. Umso mehr bedarf die Erforschung der am IRS beteiligten Faktoren einem sensitiveren und spezifischeren experimentellen Verfahren, welchem im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR Rechnung getragen wird.

### **5.2.6 Bedeutung TBX-21<sup>+</sup>RORc<sup>+</sup>TCR $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen beim humanen IRS**

Im Rahmen der Erforschung des IRS mithilfe eines Tiermodells zeigen sich neben CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen unkonventionelle IFN- $\gamma$ <sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen als die prominenteste Quelle für IL-17A, welches den hepatischen IRS vorantreibt (5.1.4). Darauf basierend soll die Bedeutung CD3<sup>+</sup>- und  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen, die Rolle des Zytokins TNF- $\alpha$  und des Chemokins CXCL-1 sowie die Expression der Transkriptionsfaktoren TBX-21 und RORc im Rahmen einer Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR (4.2.4) analysiert werden. Dazu wurden die Biopsien (3.2) von 21 Patienten des Patientenkollektivs verwendet, von denen jeweils eine Hälfte zur Genexpressionsanalyse weiterverarbeitet wurde. Die Besonderheit liegt darin, dass auch 2nd-Look-Biopsien (3.2) gentechnisch analysiert wurden, wobei insgesamt 6 Biopsien im Zeitraum zwischen 1–2 Tagen nach Transplantation ausgewertet wurden. Es wurden jeweils die  $\Delta C_T$ -Werte der Leberstanzbiopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion sowie der 2nd-Look-Biopsien aus der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung analysiert (4.2.4.2). Darüber hinaus wurden aus diesen  $\Delta C_T$ -Werten die relativen Veränderungen im Vergleich nach/vor Reperfusion sowie 2nd-Look/vor Reperfusion analysiert (4.2.4.2).

### 5.2.6.1 mRNA-Expressionslevel von CD3

Um die Rolle der im Tiermodell detektierten  $CD4^+CD8^+CD3^+$ -T-Zellen und unkonventionellen  $IFN-\gamma^+NK1.1^+CD27^+\gamma\delta TCR^+CD3^+$ -T-Zellen (5.1.4) im Rahmen der humanen LTx zu analysieren, wurden zunächst die CD3-mRNA-Expressionslevel geprüft.

#### Der IRS und die Marginalität von Organen sind mit erhöhten Expressionslevel für CD3 assoziiert

Tatsächlich offenbart die Untersuchung des Oberflächenrezeptors CD3, dass Transplantate mit IRS im Vergleich zu Transplantaten ohne IRS tendenziell höhere mRNA-Expressionslevel in den Biopsien vor und nach Reperfusion sowie den 2nd-Look-Biopsien aufweisen (Tab. 5-15 A). Überdies weisen marginale Organe ebenfalls höhere Expressionslevel auf im Vergleich zu nicht marginalen Transplantaten (Tab. 5-15 A). Auch die isolierte Betrachtung der marginalen Transplantate zeigt bei vorhandenem IRS höhere Expressionslevel im Vergleich zu Transplantaten ohne IRS (Tab. 5-15 B).

**Tab. 5-15. CD3-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate.** Mittelwerte mit Standardabweichungen der  $\Delta C_T$ -Werte der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung der Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion, des 2nd-Look sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion und 2nd-Look/vor Reperfusion. Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Vor R.	9,165 ± 1,616 (15)	9,833 ± 1,390 (7)	8,581 ± 1,653 (8)	0,105	9,536 ± 1,726 (7)	8,841 ± 1,553 (8)	0,427
Nach R.	9,581 ± 2,023 (15)	10,55 ± 1,334 (7)	8,730 ± 2,211 (8)	0,064	10,07 ± 1,217 (8)	9,019 ± 2,671 (7)	0,332
2nd Look	10,30 ± 3,032 (4)	12,54 ± 0,431 (2)	8,065 ± 2,722 (2)	–	12,23 ± 0,000 (1)	9,657 ± 3,362 (3)	–
Nach R. /vor R.	1,025 ± 0,157 (14)	1,077 ± 0,059 (7)	0,973 ± 0,209 (7)	0,244	1,069 ± 0,103 (7)	0,981 ± 0,196 (7)	0,318
2ndLook /vor R.	1,483 ± 0,195 (3)	1,485 ± 0,276 (2)	1,480 (1)	–	1,680 (1)	1,385 ± 0,134 (2)	–
<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p		
Vor R.	9,653 ± 1,868 (4)	10,07 ± 0,638 (3)	9,380 ± 1,907 (3)	8,102 ± 1,482 (5)	–		
Nach R.	10,38 ± 1,634 (4)	10,78 ± 1,094 (3)	9,765 ± 0,731 (4)	7,695 ± 2,831 (4)	–		
2nd Look	12,23 (1)	12,84 (1)	– (0)	8,065 ± 2,722 (2)	–		
Nach R. /vor R.	1,083 ± 0,056 (4)	1,070 ± 0,076 (3)	1,050 ± 0,161 (3)	0,915 ± 0,244 (4)	–		
2ndLook /vor R.	1,680 (1)	1,290 (1)	– (0)	1,480 (1)	–		

Die Resultate der im Tiermodell detektierten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen unterstützend zeigt sich ebenso in humanen Biopsien eine Assoziation einer hohen CD3-mRNA-Expression mit dem IRS und der Marginalität humaner Transplantate.

### 5.2.6.2 mRNA-Expressionslevel von TNF- $\alpha$ und CXCL-1

Der partielle warme IRS im Tiermodell geht mit signifikant erhöhten mRNA-Expressionslevel für TNF- $\alpha$  und CXCL-1 einher (5.1.3). Diese Parameter wurden bereits mit der hepatischen Schädigung im Rahmen von Ischämie und Reperfusion im Anschluss an die T-Zellaktivierung in Zusammenhang gebracht.<sup>119</sup>

#### Das Zytokin TNF- $\alpha$ ist in der Gruppe der Patienten mit IRS erhöht

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen im Tiermodell zeigt sich eine tendenziell höhere mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  in der IRS-Gruppe (Tab. 5-16 A).

**Tab. 5-16. TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate.** Mittelwerte mit Standardabweichungen der  $\Delta C_T$ -Werte der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung der Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion, des 2nd-Look sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion und 2nd-Look/vor Reperfusion. Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS		NM	M	p
Vor R.	10,83 $\pm$ 2,820 (13)	11,95 $\pm$ 2,562 (5)	10,13 $\pm$ 2,902 (8)	0,143	10,72 $\pm$ 4,083 (6)	10,93 $\pm$ 1,409 (7)	0,910
Nach R.	10,91 $\pm$ 1,384 (10)	11,16 $\pm$ 1,610 (7)	10,32 $\pm$ 0,299 (3)	–	10,87 $\pm$ 1,218 (6)	10,97 $\pm$ 1,806 (4)	–
2nd Look	12,28 $\pm$ 0,406 (3)	12,46 $\pm$ 0,368 (2)	11,92 (1)	–	12,72 (1)	12,06 $\pm$ 0,198 (2)	–
Nach R. /vor R.	0,889 $\pm$ 0,130 (8)	0,912 $\pm$ 0,164 (5)	0,850 $\pm$ 0,036 (3)	–	0,910 $\pm$ 0,161 (5)	0,853 $\pm$ 0,064 (3)	–
2ndLook /vor R.	1,565 $\pm$ 0,120 (2)	1,650 (1)	1,480 (1)	–	1,650 (1)	1,480 (1)	–
<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM		IRS + M		p
Vor R.	11,84 $\pm$ 3,591 (3)	12,12 $\pm$ 0,615 (2)	9,597 $\pm$ 5,000 (3)		10,45 $\pm$ 1,376 (5)		–
Nach R.	11,13 $\pm$ 1,463 (4)	11,21 $\pm$ 2,135 (3)	10,35 $\pm$ 0,417 (2)		10,26 (1)		–
2nd Look	12,72 (1)	12,20 (1)	– (0)		11,92 (1)		–
Nach R. /vor R.	0,963 $\pm$ 0,203 (3)	0,835 $\pm$ 0,078 (2)	0,830 $\pm$ 0,014 (2)		0,890 (1)		–
2ndLook /vor R.	1,650 (1)	– (0)	– (0)		1,480 (1)		–

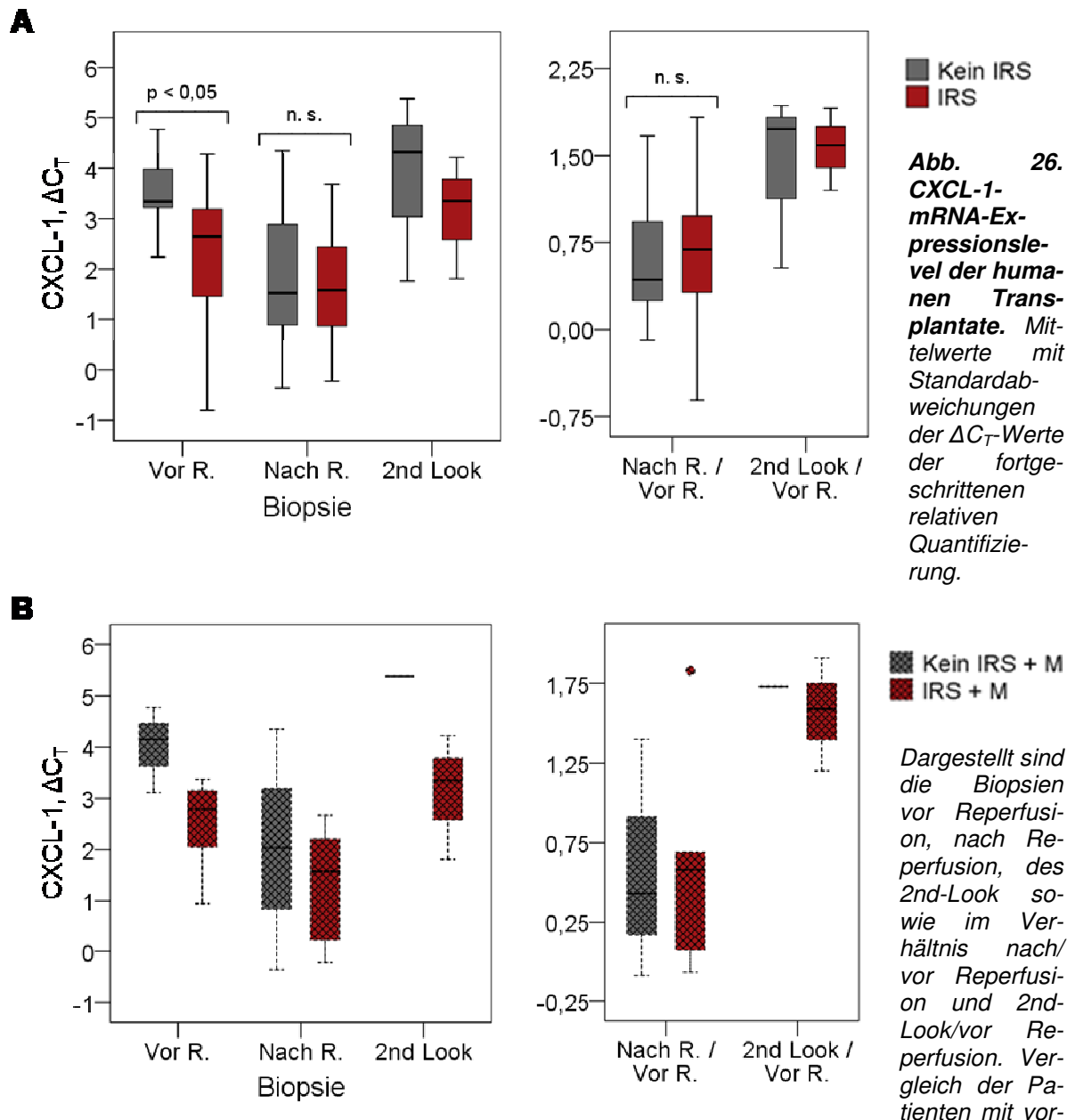
Dahingegen zeigen sich bei Vergleich der Patienten mit marginalem versus nicht marginalem Transplantat keine wesentlichen Unterschiede (Tab. 5-16 A). Überdies demonstriert die isolierte Betrachtung der marginalen Transplantate in Abhängigkeit von der An beziehungsweise Abwesenheit eines IRS höhere Expressionslevel zugunsten der Transplantate mit IRS (Tab. 5-16 B).

### Die CXCL-1-mRNA-Expressionslevel vor Reperfusion sind im Mittel bei Patienten mit IRS im Vergleich zu Patienten ohne IRS signifikant gesteigert

Analog zu dem Zytokin TNF- $\alpha$  präsentieren Transplantate mit IRS erhöhte mRNA-Expressionslevel des Chemokins CXCL-1, wobei der Unterschied im Vergleich zu Patienten ohne IRS in der Biopsie vor Reperfusion sogar signifikant verschieden ist (Abb. 26 A; Tab. 5-17 A). Besonders deutlich fallen die Unterschiede auch bei der isolierten Analyse der Patienten mit marginalem Organ auf, bei denen wiederum die Biopsien der Transplantate mit IRS höhere Expressionslevel präsentieren (Abb. 26 B; Tab. 5-17 B). Für die alleinige Gegenüberstellung der Patienten mit marginalem und nicht marginalem Transplantat ergeben sich jedoch keine wegweisenden Unterschiede (Tab. 5-17 A).

**Tab. 5-17. CXCL-1-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate.** Mittelwerte mit Standardabweichungen der  $\Delta C_T$ -Werte der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung der Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion, des 2nd-Look sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion und 2nd-Look/vor Reperfusion. Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenanzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Vor R.	2,707 $\pm$ 1,352 (20)	3,536 $\pm$ 0,808 (7)	2,261 $\pm$ 1,397 (13)	0,041	2,458 $\pm$ 1,568 (10)	2,956 $\pm$ 1,124 (10)	0,425
Nach R.	1,774 $\pm$ 1,353 (19)	1,867 $\pm$ 1,666 (7)	1,720 $\pm$ 1,214 (12)	0,827	1,964 $\pm$ 1,242 (10)	1,563 $\pm$ 1,514 (9)	0,535
2nd Look	3,473 $\pm$ 1,458 (6)	3,820 $\pm$ 1,861 (3)	3,127 $\pm$ 1,220 (3)	–	3,040 $\pm$ 1,810 (2)	3,690 $\pm$ 1,504 (4)	–
Nach R. /vor R.	0,625 $\pm$ 0,632 (18)	0,624 $\pm$ 0,652 (7)	0,626 $\pm$ 0,651 (11)	0,997	0,648 $\pm$ 0,650 (9)	0,602 $\pm$ 0,652 (9)	0,884
2ndLook /vor R.	1,482 $\pm$ 0,537 (6)	1,397 $\pm$ 0,757 (3)	1,567 $\pm$ 0,356 (3)	–	1,230 $\pm$ 0,990 (2)	1,608 $\pm$ 0,302 (4)	–
<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p		
Vor R.	3,180 $\pm$ 0,665 (4)	4,010 $\pm$ 0,839 (3)	1,977 $\pm$ 1,861 (6)	2,504 $\pm$ 0,932 (7)	–		
Nach R.	1,760 $\pm$ 1,348 (4)	2,010 $\pm$ 2,355 (3)	2,100 $\pm$ 1,277 (6)	1,340 $\pm$ 1,126 (6)	–		
2nd Look	3,040 $\pm$ 1,810 (2)	5,380 (1)	– (0)	3,127 $\pm$ 1,220 (3)	–		
Nach R. /vor R.	0,658 $\pm$ 0,683 (4)	0,580 $\pm$ 0,756 (3)	0,640 $\pm$ 0,703 (5)	0,613 $\pm$ 0,671 (6)	–		
2ndLook /vor R.	1,230 $\pm$ 0,990 (2)	1,730 (1)	– (0)	1,567 $\pm$ 0,356 (3)	–		



Im Einklang mit den Ergebnissen des Tiermodells weisen die Ergebnisse der humanen Genexpressionsanalyse darauf hin, dass TNF- $\alpha$  und CXCL-1 und damit die Beteiligung des unspezifischen Immunsystems beim humanen IRS eine Rolle spielen. Dabei sind die mRNA-Expressionslevel der Patienten mit IRS bedeutenderweise bereits in der Biopsie vor Reperfusion erhöht, was möglicherweise Hinweise auf eine Vorschädigung der Transplantate durch Ischämie abbildet. Basierend auf den Erkenntnissen des Tiermodells bedarf es bezüglich der Beteiligung des Immunsystems insbesondere im Hinblick auf die beteiligten T-Zellpopulationen im Folgenden einer näheren Betrachtung.

### 5.2.6.3 mRNA-Expressionslevel von TBX-21, RORc und TCR $\gamma$

Basierend auf den Ergebnissen im hiesigen Mausmodell erfolgte eine weiterführende Analyse der beteiligten T-Zellsubpopulationen im Hinblick auf den humanen IRS. CD3<sup>+</sup>-Zellen stellen beispielsweise Th-Zellen dar, die entsprechend ihres Zytokinprofils unter anderem in Th1-, Th2- und Th17-Zellen unterteilt werden.<sup>58</sup> Dabei demonstrieren die Ergebnisse verschiedener tierexperimenteller Verfahren, dass nicht nur Th1-Zellen unter anderem durch die Freisetzung von IFN- $\gamma$ ,<sup>134,139</sup> sondern auch Th17-Zellen als Hauptquelle für IL-17A entscheidend an der Pathophysiologie des IRS beteiligt sein sollen<sup>110</sup>. Entgegen dieser Ergebnisse demonstriert das Tiermodell dieser Arbeit, dass zum einen das IRS-bezogene Schlüssel-molekül IFN- $\gamma$  beim akuten IRS keine Rolle spielt (5.1.4). Zum anderen sind CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen sowie unkonventionelle IFN- $\gamma$ NK1.1<sup>-</sup>CD27- $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen die prominenteste Quelle für IL-17A (5.1.4). Dabei konnte mithilfe einer Reportermauslinie bewiesen werden, dass die den frühen IRS vermittelnden DN-T-Zellen und IL-17A-produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen von dem Th17-induzierten Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t abhängig sind.<sup>199</sup> Daher wurden analog dazu sowohl die Rolle des in den Differenzierungsprozess zu Th1-Zellen involvierten Transkriptionsfaktors TBX-21 als auch des humanen Transkriptionsfaktors RORc bei der humanen LTx mittels RT-PCR (4.2.4) untersucht. Darüber hinaus wurde auch die Rolle des TCR $\gamma$ -Genlokus analysiert, wobei die Ketten der  $\gamma\delta$ -T-Zellen neben dem  $\delta$ -Genlokus durch den  $\gamma$ -Genlokus kodiert werden.

#### **Es bestehen keine konstanten Assoziationen des histopathologischen IRS mit der Höhe des TBX-21-Expressionsniveaus**

Die Analyse des in den Differenzierungsprozess zu Th1-Zellen involvierten Transkriptionsfaktors TBX-21 ergibt, dass sich im Mittel in den Biopsien vor und nach Reperfusion sowie den 2nd-Look-Biopsien keine konstant vorhandenen Expressionserhöhungen zugunsten einer bestimmten Gruppe zeigen (Tab. 5-18 A). In einigen Proben wurden neben unspezifischen Schmelztemperaturen in der RT-PCR keine spezifischen Peaks an dem der TBX-21-entsprechenden Schmelztemperatur angezeigt. So konnten spezifische Schmelztemperaturen in nur 8 der 21 Biopsien vor Reperfusion, in 5 der Biopsien nach Reperfusion und in 3 der 2nd-Look-Biopsien nachgewiesen werden (Tab. 5-18).

**Tab. 5-18. TBX-21-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate.** Mittelwerte mit Standardabweichungen der  $\Delta C_T$ -Werte der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung der Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion, des 2nd-Look sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion und 2nd-Look/vor Reperfusion. Vergleiche entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenanzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Vor R.	13,74 ± 0,891 (8)	13,90 ± 0,638 (4)	13,58 ± 1,174 (4)	–	14,43 ± 0,488 (4)	13,05 ± 0,593 (4)	–
Nach R.	13,70 ± 2,533 (5)	13,62 ± 2,918 (4)	14,02 (1)	–	12,44 ± 4,137 (2)	14,54 ± 1,272 (3)	–
2nd Look	14,19 ± 1,399 (3)	14,97 ± 0,559 (2)	12,64 (1)	–	14,57 (1)	14,00 ± 1,923 (2)	–
Nach R. /vor R.	1,070 ± 0,057 (2)	1,070 ± 0,057 (2)	– (0)	–	1,110 (1)	1,030 (1)	–

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Vor R.	14,29 ± 0,714 (2)	13,52 ± 0,354 (2)	14,58 ± 0,346 (2)	12,59 ± 0,233 (2)	–
Nach R.	12,44 ± 4,137 (2)	14,80 ± 1,683 (2)	– (0)	14,02 (1)	–
2nd Look	14,57 (1)	15,36 (1)	– (0)	12,64 (1)	–
Nach R. /vor R.	1,110 (1)	1,030 (1)	– (0)	– (0)	–

### In den Biopsien vor und nach Reperfusion sind im Vergleich zu Patienten ohne IRS höhere RORc-Expressionslevel in der IRS-Gruppe zu verzeichnen

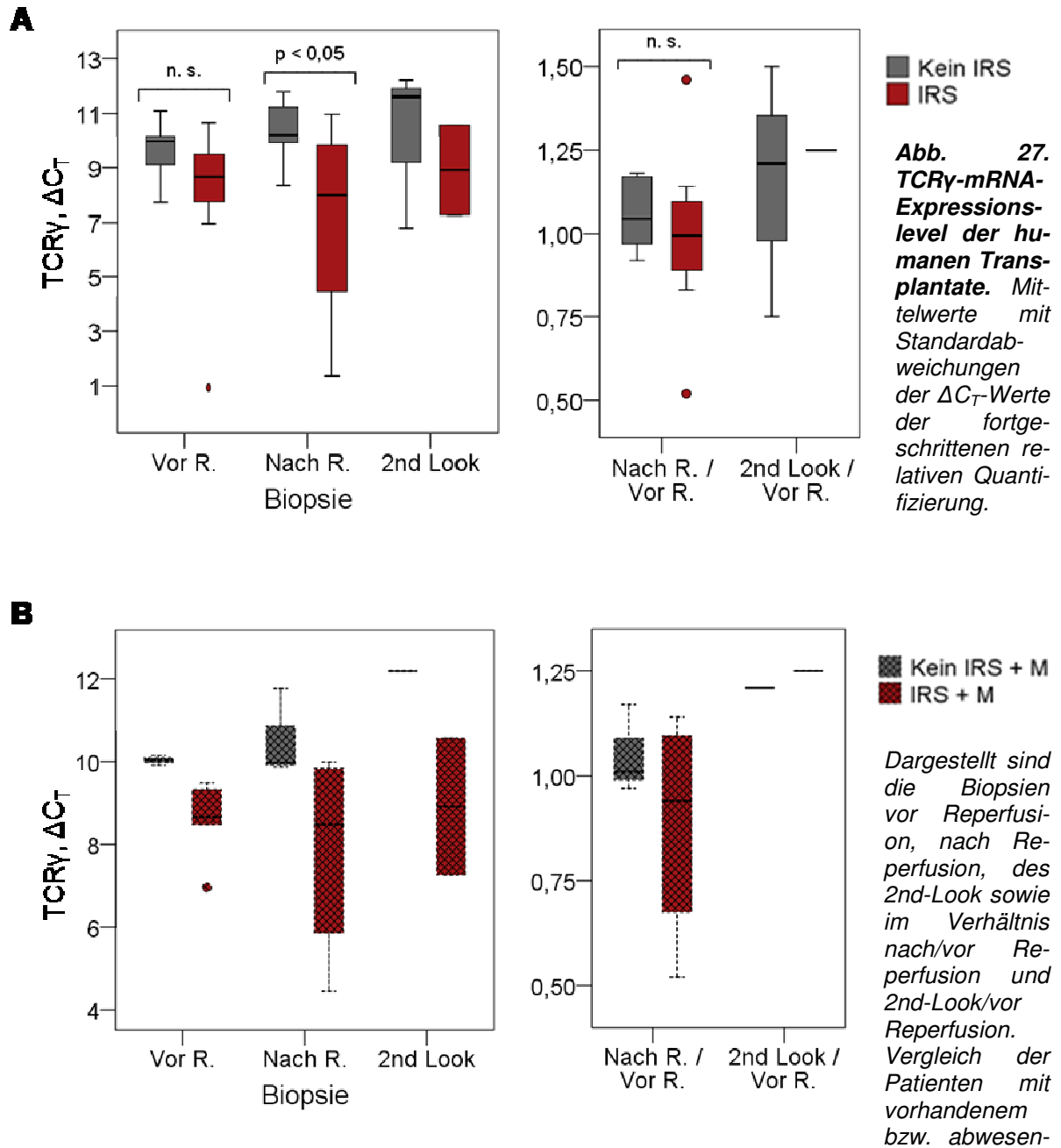
DN-T-Zellen und IL-17A-produzierende  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind gemäß dem Tiermodell von dem Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t abhängig. Die Analyse ergibt, dass Transplantate mit IRS erhöhte mRNA-Expressionslevel in der Biopsie vor und nach Reperfusion aufweisen, wobei jedoch in den 2nd-Look-Biopsien Patienten in Abwesenheit eines IRS eine höhere Expression zeigen (Tab. 5-19 A). Für die Gegenüberstellung der Patienten mit marginalem und nicht marginalem Transplantat ergeben sich in der Biopsie vor und nach Reperfusion höhere Expressionslevel zugunsten der Patienten mit marginalem Transplantat (Tab. 5-19 B). Genauso fallen die Unterschiede bei isolierter Analyse der Patienten mit marginalem Transplantat aus, bei denen wiederum die Biopsien der Transplantate mit IRS vor und nach Reperfusion höhere Expressionslevel präsentieren (Tab. 5-19 B).

**Tab. 5-19. RORc-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate.** Mittelwerte mit Standardabweichungen der  $\Delta C_T$ -Werte der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung der Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion, des 2nd-Look sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion und 2nd-Look/vor Reperfusion. Vergleiche entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Vor R.	8,021 ± 0,982 (15)	8,345 ± 0,767 (6)	7,804 ± 1,091 (9)	0,314	8,318 ± 1,006 (6)	7,822 ± 0,973 (9)	0,357
Nach R.	7,843 ± 1,511 (15)	8,106 ± 1,563 (7)	7,614 ± 1,531 (8)	0,183	8,018 ± 1,388 (8)	7,644 ± 1,730 (7)	0,562
2nd Look	9,602 ± 2,252 (6)	8,633 ± 0,857 (3)	10,57 ± 3,022 (3)	–	8,295 ± 0,884 (2)	10,26 ± 2,547 (4)	–
Nach R. /vor R.	0,968 ± 0,151 (13)	0,972 ± 0,140 (6)	0,964 ± 0,171 (7)	0,617	0,977 ± 0,176 (6)	0,960 ± 0,141 (7)	0,853
2ndLook /vor R.	1,298 ± 0,354 (5)	1,077 ± 0,184 (3)	1,630 ± 0,255 (2)	–	1,100 ± 0,255 (2)	1,430 ± 0,390 (3)	–
<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p		
Vor R.	8,067 ± 0,978 (3)	8,623 ± 0,530 (3)	8,570 ± 1,176 (3)	7,422 ± 0,908 (6)	–		
Nach R.	7,603 ± 1,940 (4)	8,777 ± 0,705 (3)	8,433 ± 0,521 (4)	6,795 ± 1,848 (4)	–		
2nd Look	8,295 ± 0,884 (2)	9,310 (1)	– (0)	10,57 ± 3,022 (3)	–		
Nach R. /vor R.	0,923 ± 0,203 (3)	1,020 ± 0,026 (3)	1,030 ± 0,165 (3)	0,915 ± 0,182 (4)	–		
2ndLook /vor R.	1,100 ± 0,255 (2)	1,030 (1)	– (0)	1,630 ± 0,255 (2)	–		

### Transplantate mit IRS zeigen nach Reperfusion signifikant höhere mRNA-Expressionslevel des TCR $\gamma$ -Genlokus im Vergleich zu Transplantaten ohne IRS

Im Hinblick auf die Analyse des TCR $\gamma$ -Genlokus mit der Frage nach einer Beteiligung  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen am hepatischen IRS und der Bedeutung marginaler Organe ergeben sich tatsächlich deutliche Unterschiede mit einer vermehrten Expression in Transplantaten mit IRS im Vergleich zu Transplantaten ohne IRS (Abb. 27 A; Tab. 5-20 A). Dabei ist dieser Unterschied in der Biopsie nach Reperfusion sogar statistisch signifikant verschieden (Abb. 27 A; Tab. 5-20 A). Paradoxerweise zeigt die Gegenüberstellung der Patienten mit marginalem und nicht marginalem Transplantat, dass eher nicht marginale Transplantate im Mittel eine höhere Expression aufweisen im Vergleich zu marginalen Transplantaten (Tab. 5-20 A). Dennoch zeigt die isolierte Analyse der Patienten mit marginalem Transplantat, dass Transplantate mit zusätzlichem IRS deutlich höhere Expressionslevel aufweisen als Transplantate ohne IRS (Abb. 27 B; Tab. 5-20 B).



Dargestellt sind die Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion, des 2nd-Look sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion und 2nd-Look/vor Reperfusion. Vergleich der Patienten mit vorhandenem bzw. abwesendem IRS (A) sowie der Patienten mit marginalem Transplantat und vorhandenem bzw. abwesendem IRS (B). Ausreißer o und Extremwerte 0 abgebildet. Signifikanzniveau über dem Querbalken. Patientenzahl der Gruppen jeweils in Tab. 5-20.

**Tab. 5-20. TCR $\gamma$ -mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate.** Mittelwerte mit Standardabweichungen der  $\Delta C_T$ -Werte der fortgeschrittenen relativen Quantifizierung der Biopsien vor Reperfusion, nach Reperfusion, des 2nd-Look sowie im Verhältnis nach/vor Reperfusion und 2nd-Look/vor Reperfusion. Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Patientenzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Vor R.	8,693 $\pm$ 2,359 (16)	9,672 $\pm$ 1,148 (6)	8,106 $\pm$ 2,742 (10)	0,159	8,201 $\pm$ 3,469 (7)	9,076 $\pm$ 1,015 (9)	0,958
Nach R.	8,341 $\pm$ 3,278 (18)	10,37 $\pm$ 1,188 (7)	7,047 $\pm$ 3,562 (11)	0,013	7,920 $\pm$ 3,784 (11)	9,003 $\pm$ 2,397 (7)	0,892
2nd Look	9,680 $\pm$ 2,497 (5)	10,19 $\pm$ 2,960 (3)	8,915 $\pm$ 2,341 (2)	–	9,190 $\pm$ 3,394 (2)	10,01 $\pm$ 2,513 (3)	–
Nach R. /vor R.	1,019 $\pm$ 0,209 (14)	1,055 $\pm$ 0,107 (6)	0,993 $\pm$ 0,267 (8)	0,600	1,083 $\pm$ 0,189 (7)	0,956 $\pm$ 0,223 (7)	0,272
2ndLook /vor R.	1,178 $\pm$ 0,313 (4)	1,153 $\pm$ 0,378 (3)	1,250 (1)	–	1,125 $\pm$ 0,530 (2)	1,230 $\pm$ 0,028 (2)	–
<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p		
Vor R.	9,310 $\pm$ 1,700 (3)	10,03 $\pm$ 0,120 (3)	7,370 $\pm$ 4,471 (4)	8,597 $\pm$ 0,904 (6)	–		
Nach R.	10,25 $\pm$ 1,419 (4)	10,54 $\pm$ 1,069 (3)	6,587 $\pm$ 4,142 (7)	7,853 $\pm$ 2,572 (4)	–		
2nd Look	9,190 $\pm$ 3,394 (2)	12,19 (1)	– (0)	8,915 $\pm$ 2,341 (2)	–		
Nach R. /vor R.	1,060 $\pm$ 0,131 (3)	1,050 $\pm$ 0,106 (3)	1,100 $\pm$ 0,243 (4)	0,885 $\pm$ 0,276 (4)	–		
2ndLook /vor R.	1,125 $\pm$ 0,530 (2)	1,210 (1)	– (0)	1,250 (1)	–		

Diese Ergebnisse offenbaren, dass einige im Tiermodell detektierte und damit an der Ätiologie des IRS beteiligte Faktoren gleichermaßen im Setting des IRS der humanen LTx eine Rolle spielen. So ist die hohe Expression von CD3 kennzeichnend für die Beteiligung des spezifischen Immunsystems in Form von einer T-Zellinfiltration, während die erhöhten Expressionslevel des Zytokins TNF- $\alpha$  und des Chemokins CXCL-1 auf die ätiologische Miteinbeziehung des unspezifischen Immunsystems hinweisen. Über die T-Zellinfiltration in Form der erhöhten CD3-Expressionslevel hinaus wird mit der gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors RORc sowie vor allem des TCR $\gamma$ -Genlokus, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Tiermodells, ein wichtiger Schritt in Richtung einer weiterführenden Differenzierung der beteiligten T-Zellsubpopulationen vollzogen. Zusammenfassend kann damit angenommen werden, dass TBX-21<sup>+</sup>RORc<sup>+</sup>TCR $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen in der Pathophysiologie des humanen IRS im Rahmen der orthotopen LTx eine entscheidende Rolle spielen.



## 6 Diskussion

Der IRS stellt ein zentrales Problem der Transplantationschirurgie dar, der durch den zunehmenden Organmangel und der damit verbundenen Allokation marginaler Spenderorgane immer mehr zum Gegenstand intensiver Forschung wird. Denn marginale Organe tragen ein höheres Risiko für die Entwicklung eines IRS. Dabei kommen zunehmend Hinweise darauf auf, dass CD3<sup>+</sup>-T-Zellen eine zentrale Rolle in der Vermittlung des frühen IRS einnehmen. Jedoch wird der präzise Phänotyp der T-Zellen, der dem Mechanismus solch einer Immunreaktion zugrunde liegt, genauso wie dessen klinische Relevanz in dem großen Komplex der Literatur von Forschungsergebnissen im Zusammenhang mit dem IRS noch nicht erwähnt. Zwar besteht die Möglichkeit einer T-Zellimmunsuppression mittels Calcineurininhibitoren, wie Cyclosporin A und Tacrolimus, auch FK506 genannt, welche die IL-2-Produktion und -Freisetzung hemmen, oder mithilfe des Immunglobulins Antithymozytenglobulin. Jedoch gibt es in der Literatur keine eindeutigen Daten, die die Schlüsselrolle der T-Zellen in dem transplantationsbezogenen humanen IRS identifizieren.

Daher werden im Rahmen dieser Dissertation zum einen in einem Tiermodell des partiellen warmen IRS die Effektor-T-Zellpopulationen, die den frühen IRS in der Maus vermitteln, exploriert. Zum anderen wird im Zuge der Erforschung des frühen IRS im Tiermodell in dieser Arbeit das größte Augenmerk auf die Erforschung des frühen IRS im Kontext der humanen orthotopen LTx im Rahmen einer retrospektiven klinischen Studie gerichtet. Dazu wurden neben dem Spenderprofil im Hinblick auf die Allokation marginaler Organe auch die Empfängercharakteristika der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten in Augenschein genommen. Die Auswirkungen des IRS hinsichtlich der humanen LTx wurden anhand der Prävalenzen von Abstoßungsreaktionen und Re-LTx, des Patientenüberlebens sowie der Resultate der laborchemischen Verlaufsparemeter analysiert. Im experimentellen Teil dieser klinischen Studie wurde auf Grundlage der Ergebnisse des Mausmodells die Relevanz der im Mausmodell ermittelten Faktoren, die für den frühen IRS verantwortlich sind, analysiert. Dazu wurden Leberbiopsien orthotop transplantierte erwachsener Patienten histologisch und molekularbiologisch untersucht mit der Hypothese, dass die im Mausmodell detektierten Faktoren ebenso beim frühen humanen IRS eine Rolle spielen.

## 6.1 Der partielle warme IRS im Tiermodell

Im IRS-Modell dieser Arbeit ist schon bei makroskopischer Betrachtung der Leber eindeutig ersichtlich, wie schädigend sich eine 90-minütige warme Ischämie mit anschließender Reperfusion auf das Leberparenchym auswirkt. Dazu wurden die prozentuale nekrotische Fläche der totalen Mikrometerfläche und die GPT-Spiegel ausgewertet (5.1.1). Ebenso schlägt sich die Leberschädigung durch warme Ischämie und Reperfusion auch im IRS-Modell nach Abe et al. in einer Erhöhung der Lebertransaminasen nieder.<sup>178</sup>

### Komponenten des unspezifischen Immunsystems

Diese bezeichnende ischämie-reperusionsbedingte Schädigung der Leber wird mit einer Aktivierung von Immunreaktionen in Zusammenhang gebracht. Dabei sind Faktoren des unspezifischen Immunsystems in Form von signifikant hochregulierten Zytokinen involviert. So zeigen Tiere nach 90-minütiger Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion neben signifikant erhöhten Expressionslevel des Zytokins TNF- $\alpha$  auch erhöhte Proteinspiegel in isolierten, restimulierten hepatischen Leukozyten von IRS-Tieren (5.1.3). TNF- $\alpha$  spielt vor allem in der akuten Frühphase des IRS eine Rolle, die innerhalb der ersten 6 Stunden nach Reperfusion abläuft.<sup>83</sup> Weiterhin stellt TNF- $\alpha$  einen zentralen Mediator des IRS dar, der neben anderen Mediatoren die subakute Phase des IRS einleitet.<sup>83</sup> Neben TNF- $\alpha$  kann gezeigt werden, dass das Chemokin CXCL-1 ebenso signifikant hochregulierte Expressionslevel im Zusammenhang mit dem IRS aufweist (5.1.3), wobei bekannt ist, dass es neben TNF- $\alpha$  und weiteren Mediatoren für die Akkumulation neutrophiler Granulozyten verantwortlich ist<sup>116</sup> und von aktivierten Kupfferzellen<sup>119</sup> stammt. Folglich spielen mit diesen beiden Komponenten auch Faktoren der Steuerung von Immunreaktionen eine wichtige Rolle im tierexperimentellen IRS.

Neben den involvierten Zytokinen sind auch zelluläre Faktoren am Pathomechanismus des IRS involviert. So zeigt sich eine signifikant höhere Infiltration neutrophiler Granulozyten bei Tieren mit induziertem IRS (5.1.2). Dabei ist aus Tiermodellen bereits bekannt, dass in der sogenannten subakuten Phase im Zeitraum von etwa 20 Stunden nach Reperfusion eine Infiltration neutrophiler Granulozyten in das Leberparenchym stattfindet.<sup>110,111</sup> Allerdings zeigte die Arbeitsgruppe um Ziser et al. im humanen Setting mittels radionuklidpräparierter Granulozyten, die innerhalb eines Tages nach humaner LTx gewonnen und präpariert reinjiziert wurden, dass keine Korrelation zwischen der Aufnahme der Granulozyten in die Leber und der biochemischen und histologischen Parameter des Leberschadens bestand.<sup>203</sup> Die Arbeitsgruppe folgerte daraus, dass Granulozyten keine

wichtige Rolle beim IRS des neu transplantierten Organs innerhalb eines Tages nach LTx einnehmen.<sup>203</sup> Die Diskrepanz der Infiltration dieser Zellen im Tiermodell und im humanen Setting könnte darauf zurückgeführt werden, dass im humanen Setting eine derartige Infiltration zu einem späteren Zeitpunkt stattfinden könnte.

### **Komponenten des spezifischen Immunsystems**

Über die Komponenten des angeborenen Immunsystems hinaus kommt es mit der signifikant erhöhten CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration bei Tieren mit induziertem IRS im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (5.1.2) auch zu einer Beteiligung des spezifischen Immunsystems. Die Ergebnisse des Tiermodells sprechen deutlich dafür, dass T-Lymphozyten mit dem Oberflächenrezeptor CD3 in den Pathomechanismus des hepatischen IRS involviert sind. Auf den ersten Blick ist diese CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration, ungeachtet weiterer T-Zelloberflächenmerkmale, übereinstimmend mit dem bisherigen Dogma, dass konventionelle CD3<sup>+</sup>-T-Zellen des CD4<sup>+</sup>-Effektorphänotyps entscheidend in der frühen, akuten IRS-bezogenen Immunantwort sind.<sup>111,134</sup> Diese Annahme basiert hauptsächlich auf Mausstudien, in denen spezifische T-zelldepletierende Antikörper<sup>111</sup> und Mäuse, die genetisch defizient sind für verschiedene T-Zelluntergruppen, einschließlich CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup><sup>135,136</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen<sup>136</sup>, eingesetzt wurden. Dabei konnte eine Abhängigkeit der Infiltration neutrophiler Granulozyten und des Leberschadens von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gezeigt werden, wobei die Anzahl CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine Stunde nach Reperfusion am größten war.<sup>111</sup> Um auf die Rolle der CD3<sup>+</sup>-T-Zellen noch genauer einzugehen, bedarf es einer präziseren Differenzierung der beteiligten T-Zellsubpopulationen.

Konventionelle CD3<sup>+</sup>-T-Zellen des CD4<sup>+</sup>-Effektorphänotyps, die angeblich beim frühen, akuten IRS beteiligt sein sollen,<sup>134</sup> sind beispielsweise Th-Zellen<sup>57</sup>. Diese Th-Zellen werden entsprechend ihres Zytokinprofils unter anderem in Th1- und Th17-Zellen unterteilt.<sup>58</sup> Daneben gehören zu den CD4<sup>+</sup>-Zellen unter anderem klassische NKT-Zellen, die CD1d-restriktiv sind und sowohl den TCR als auch NK-Marker, wie NK1.1, exprimieren,<sup>61</sup> wobei Typ-1-NKT-Zellen angeblich den IRS fördern.<sup>133</sup> In den Prozess der Differenzierung zu Th1-Zellen ist unter anderem IFN- $\gamma$  involviert,<sup>58</sup> wobei Th1-Zellen wiederum IFN- $\gamma$  bilden<sup>58</sup>, welches die Fähigkeit besitzt, über den indirekten Signalweg Makrophagen zu aktivieren<sup>138</sup>. Diverse Studien implizieren, dass Th1-Zellen die Schlüssel-T-Zelluntergruppe darstellen, die verantwortlich für die Initiierung und Verstärkung des hepatischen IRS mittels TIM-vermittelter T-Zell-Kupfferzell-Interaktionen und Freisetzung von IFN- $\gamma$  sind.<sup>134,139</sup> Allerdings zeigt das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse dieser Dissertation, dass das IRS-bezogene Schlüssel-molekül IFN- $\gamma$  von Th1-Zellen in

Mäusen mit induziertem IRS im Vergleich zu scheinoperierten Tieren nicht unterschiedlich exprimiert wird, womit CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen beim akuten IRS keine Rolle spielen (5.1.4). Jüngste Daten deuten darauf hin, dass Th17-Zellen entscheidend an der Pathophysiologie des IRS beteiligt sein sollen. Diese Th17-Zellen bilden das proinflammatorische IL-17A.<sup>58</sup> Dabei soll ein proinflammatorisches Zytokinmilieu bestehend aus TGF- $\beta$  und IL-6 die Th17-Differenzierung<sup>140,141</sup> durch die Induktion von ROR $\gamma$ t,<sup>60,142</sup> den kennzeichnenden Transkriptionsfaktor von Th17, fördern<sup>143</sup>. In Bezug auf den IRS zeigte sich, dass die Neutralisierung von IL-17 und die genetische Defizienz die Einwanderung neutrophiler Granulozyten signifikant reduziert und den hepatischen IRS verringert.<sup>135</sup> Passend zu dieser Theorie des IL-17A-vermittelten IRS zeigt auch diese Dissertation in Tieren mit warmer Ischämie und 24 Stunden nach Reperfusion im Vergleich zu scheinoperierten Tieren signifikant erhöhte Expressionslevel für IL-17A (5.1.3). Dabei weisen isolierte, restimulierte hepatische Leukozyten im Rahmen des IRS auch signifikant höhere Proteinspiegel von IL-17A im Vergleich zu scheinoperierten Tieren auf (5.1.3). Zudem zeigt die mRNA-Expressionsanalyse von Tierlebern mit IRS signifikant erhöhte ROR $\gamma$ t-Werte im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (5.1.3). Aber nur eine kleine Fraktion konventioneller CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen produziert in der frühen Phase nach dem IRS IL-17A (5.1.4). Ebenso offenbarte die sorgfältige Bewertung der Daten von Kono et al., dass jeweils nur 0,29 % und 2,11 % der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in der Leber und Milz von IRS-Tieren fähig waren, IL-17A zu produzieren.<sup>110</sup> Eine frühere Veröffentlichung von Caldwell et al. konnte ebenfalls nicht definitiv zeigen, dass CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen die IL-17A-Produzenten in diesem Setting waren, da Beobachtungen hauptsächlich nur auf der Arbeit mit CD4-Knock-out-Mäusen oder dem Gebrauch von IL-17A-neutralisierenden Antikörpern basierten.<sup>135</sup> Die Aussage, dass CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen nicht die Hauptquelle von IL-17A innerhalb von 24 Stunden nach Reperfusion sein können, deckt sich mit der Tatsache, dass deren Differenzierung in IL-17A-bildende Effektorzellen im Kontext eines proinflammatorischen Zytokinmilieus mit IL-6, IL-21 und TGF- $\beta$  stattfindet und Tage benötigt<sup>60,204</sup>. Interessanterweise können neben den CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine zusätzliche potenzielle Quelle der IL-17A-Produktion sein,<sup>144</sup> wobei sie dafür bekannt sind, umgehend IL-17A ohne Bindung an den TCR freizulassen<sup>146</sup>.

### **Der partielle warme IRS im Tiermodell wird durch ROR $\gamma$ t-exprimierende IFN- $\gamma$ -NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen über einen IL-17A-vermittelten Mechanismus vorangetrieben**

Erstaunlicherweise offenbaren die Resultate der durchflusszytometrischen Analyse im Tiermodell, dass unkonventionelle IFN- $\gamma$ -NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen neben

CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, den sogenannten DN-Zellen, die prominenteste Quelle für IL-17A sind (5.1.4). Dabei ist die absolute Anzahl IL-17A<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>γδTCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen im warmen IRS 24 Stunden nach Reperfusion signifikant höher im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (5.1.4). Diese Hypothese spricht gegen die vorherrschende Ansicht, dass CD3<sup>+</sup>-T-Zellen des CD4<sup>+</sup>-Effektortyps beim frühen akuten IRS beteiligt sein sollen<sup>134</sup> und dass konventionelle CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen die Hauptquelle für IL-17A in diesem Zusammenhang darstellen<sup>110</sup>. Nichtsdestotrotz kann gezeigt werden, dass nur eine kleine Fraktion konventioneller CD4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen IL-17A in der Frühphase nach dem hepatischen IRS bilden (5.1.4). Die Resultate dieser Dissertation werden durch vorangegangene Studien unterstützt, die zeigten, dass γδTCR-Knock-out-Mäuse eine beträchtlich geringere Infiltration neutrophiler Granulozyten während des hepatischen IRS aufweisen.<sup>205</sup> Im Gegensatz dazu zeigte diese Studie aber keine Unterschiede im Hinblick auf den Leberschaden zwischen γδTCR-Knock-out- und Wildtypmäusen, quantifiziert anhand der GPT-Spiegel.<sup>205</sup> Dies könnte eventuell durch deren Verwendung einer kürzeren Reperfusionzeit von 8 Stunden<sup>205</sup> im Vergleich zu der Reperfusionzeit dieser Dissertationsarbeit von 24 Stunden erklärbar sein. Dennoch behauptete eine frühere Veröffentlichung, dass neutrophile Granulozyten die hauptsächlichen IL-17A-produzierenden Effektorzellen im Rahmen des renalen IRS sein sollen.<sup>206</sup> Das bedeutet, dass eine zeitliche Verschiebung der IL-17A-Sekretion neutrophiler Granulozyten ursächlich sein könnte, sobald der Prozess durch γδ- und DN-T-Zellen initiiert wurde.

CD27<sup>-</sup>γδ-T-Zellen spielen eine wichtige pathogenetische Rolle in anderen Modellen IL-17A-vermittelter Immunreaktionen und sind beispielsweise auch im Darm und in der Haut lokalisiert.<sup>207</sup> Zudem konnte mittels der Analyse von γδ-T-Zellen aus der Maus gezeigt werden, dass die meisten das TNF-Rezeptorfamilienmitglied CD27 exprimieren und IFN-γ produzieren, wohingegen die IL-17-Produktion auf CD27<sup>-</sup>γδ-T-Zellen beschränkt ist.<sup>208</sup> Auch CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>-T-Zellen sind bereits bekannt für IL-17A-abhängige Immunreaktionen.<sup>209,210</sup> Außerdem wurden γδ-T-Zellen vor kurzem als Effektorzellen in Modellen mit dem zerebralen<sup>211</sup> und kardialen IRS<sup>144</sup> in Zusammenhang gebracht, was die Tatsache untermauert, dass γδ-T-Zellen entscheidende Effektorzellen bei dem frühen ischämischen Schaden in Mäusen darstellen. γδ-T-Zellen und RORγt wurden bereits in einem Mausmodell zur Erforschung der nicht autoimmunen Arthritis miteinander in Zusammenhang gebracht, da IL-23 die Expression von RORγt und IL-17A durch γδ-T-Zellen reguliert.<sup>212</sup>

Weitere Analysen der Arbeitsgruppe um Eggenhofer et al. konnten mit dem Einsatz von γδTCR-Knock-out-Mäusen zeigen, dass die Abwesenheit von γδ-T-Zellen den frühen hepatischen IRS vermindert.<sup>199</sup> Es wurden beispielsweise Rorc<sup>gfp/wt</sup>-Reporter-mäuse ein-

gesetzt, bei denen der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t genetisch zur Koexpression von GFP verknüpft ist.<sup>142</sup> Dabei zeigten Rorc<sup>gfp/wt</sup>-Mäuse ähnlich hohe Level des hepatischen Schadens im Rahmen des partiellen warmen IRS wie Wildtypmäuse.<sup>199</sup> Mit dieser Reportermauslinie wurde demonstriert, dass die den frühen IRS vermittelnden, IL-17A-produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen und DN-T-Zellen von dem Th17-induzierten Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t abhängig sind.<sup>199</sup> Darüber hinaus wurde mithilfe einer Rorc<sup>gfp/gfp</sup>-Mauslinie, der die genetische Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t fehlt<sup>142</sup>, bewiesen, dass die Expression von ROR $\gamma$ t für die Rolle von IL-17A-produzierenden, unkonventionellen T-Zellen bei der Initiierung des hepatischen IRS entscheidend ist<sup>199</sup>. Damit ist die Rorc<sup>gfp/gfp</sup>-Mauslinie im Vergleich zu den Wildtyp- und Rorc<sup>gfp/wt</sup>-Kontrollen vor dem IRS geschützt.<sup>199</sup> Dementsprechend fehlen IL-17A-produzierende GFP<sup>+</sup>CD27- $\gamma\delta$ -T-Zellen und DN-T-Zellen komplett in Leberproben der Rorc<sup>gfp/gfp</sup>-Mauslinie mit induziertem IRS, was beweist, dass ROR $\gamma$ t für unkonventionelle T-Zellen unabdingbar notwendig ist, um den IL-17A-abhängigen IRS zu vermitteln. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass während der akuten und subakuten Phase nach dem hepatischen IRS  $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht nur die Hauptquelle für IL-17A in der Leber, sondern auch in der Milz von Wildtypmäusen darstellen.<sup>199</sup>

Schließlich bleibt noch offen, welche Upstreamfaktoren von ROR $\gamma$ t die CD27- $\gamma\delta$ - und DN-T-Zellen dazu bringen, ROR $\gamma$ t hochzuregeln und damit IL-17A im Rahmen des hepatischen IRS zu produzieren. Wahrscheinlich kontrollieren IRF-3-abhängige Ereignisse die IL-23/IL-17-Achse in der Leber, wobei IRF-3 einen Transkriptionsfaktor im Rahmen des TLR-4-Signalwegs darstellt.<sup>213</sup> So zeigte sich bei einer Defizienz von IRF-3, dass die TLR-4-induzierte IL-27-Expression in Kupfferzellen und dendritischen Zellen supprimiert war, wobei eine verstärkte Expression von IL-23 in den Kupfferzellen vorlag, wahrscheinlich resultierend in vermehrten IL-17A-produzierenden invarianten NKT-Zellen und  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Mausleber und damit einem verstärkten hepatischen IRS.<sup>213</sup> Dabei zeigte sich eine IL-17A-abhängige Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, die in der späten Phase des Schadens 48 Stunden nach Reperfusion dominierte.<sup>213</sup>

Auch die Daten der Arbeitsgruppe um Eggenhofer et al. bestätigten neben der Expression von IL-1 $\beta$  die Expression von IL-23 in Leberproben von Wildtypmäusen, was andeutet, dass diese Zytokine während des hepatischen IRS eine Rolle dabei spielen könnten, unkonventionelle T-Zellen in IL-17A-produzierende Effektorzellen umzuwandeln<sup>199</sup>, was bereits in Studien veröffentlicht wurde<sup>146</sup>.

Im Kontext der vorliegenden Forschungsergebnisse betrachtet, werden in der akuten Frühphase des IRS innerhalb der ersten 6 Stunden nach Reperfusion<sup>83</sup> Kupfferzellen von aus Gewebsschäden hervorgehenden DAMP-Molekülen<sup>64,68</sup> über Rezeptoren, wie

die TLR und der RAGE, aktiviert<sup>68</sup>. Daraufhin produzieren die Kupfferzellen dann nicht nur ROS<sup>83-85</sup> und schädigen damit die Leber, sondern exprimieren über IRF-3-abhängige Ereignisse auch verstärkt IL-23<sup>213</sup>, was mithilfe des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t<sup>199</sup> zu einer vermehrten Produktion von IL-17A beispielsweise durch  $\gamma\delta$ -T-Zellen<sup>199,213</sup> und DN-T-Zellen<sup>199</sup> führt. Vor allem in der subakuten Phase des IRS im Zeitraum von etwa 20 Stunden nach Reperfusion<sup>110,111</sup> bewirken dann Zelladhäsionsmoleküle und inflammatorische Mediatoren, wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , eine vermehrte Infiltration neutrophiler Granulozyten<sup>83</sup>. Dabei stimuliert TNF- $\alpha$  die Produktion und Freisetzung von CXC-Chemokinen<sup>83</sup> wie CXCL-1, was die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten hervorruft<sup>119</sup>. Daneben bewirken die IL-17A-produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen<sup>83,199,213</sup> und DN-T-Zellen<sup>199</sup> ebenfalls eine vermehrte Infiltration neutrophiler Granulozyten, die durch Oxidantien und Proteasen letztendlich das Leberparenchym folgenschwer schädigen<sup>125</sup>.

### **Das Herzglykosid Digoxin als potenzielles Therapeutikum**

Das Ausmaß der klinischen Relevanz der Schlüsselrolle dieser ROR $\gamma$ t-abhängigen IRS-vermittelnden Zellen wird bei Betrachtung der Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Eggenhofer et al. zunehmend deutlich. Diese Ergebnisse zeigten, dass Digoxin einen therapeutischen Effekt auf unkonventionelle ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-T-Zellen beim IRS ausübt<sup>199</sup> und damit die aktuelle Literatur erweiternd, dass Digoxin ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen in Autoimmunmodellen inhibieren kann<sup>214</sup>. Digoxin stellt ein kardiales Glykosid dar, das an die ligandenbindende Domäne von ROR $\gamma$ t andockt, wodurch dessen Aktivität gehemmt wird.<sup>214</sup> Rorc<sup>gfp/wt</sup>-Mäuse, die mit Digoxin behandelt wurden, zeigten bezüglich des IRS einen Phänotyp ähnlich dem von Rorc<sup>gfp/gfp</sup>-Mäusen, da bei Rorc<sup>gfp/gfp</sup>-Mäusen die genetische Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t fehlt<sup>142</sup> und die Tiere dadurch wenigstens teilweise vor einem hepatischen IRS geschützt waren<sup>199</sup>. Obwohl die granulozytäre Infiltration in diesen Mäusen nicht konsistent reduziert wurde, zeigten sich zum einen niedrigere Level der hepatozellulären Nekrose und der Transaminase GPT.<sup>199</sup> Zum anderen waren die Sekretionslevel von IL-17A und TNF- $\alpha$  sowie die Expressionslevel von TNF- $\alpha$  und CXCL-1 im Vergleich zu Rorc<sup>gfp/wt</sup>-Mäusen, die nicht mit Digoxin behandelt wurden, signifikant reduziert.<sup>199</sup> Rorc<sup>gfp/wt</sup>-Mäuse, die mit Digoxin behandelt wurden, hatten auch signifikant niedrigere Expressionslevel von  $\gamma\delta$ TCR und GFP, was einen direkten antagonisierenden, therapeutischen Effekt von Digoxin auf IRS-vermittelnde ROR $\gamma$ t-exprimierende  $\gamma\delta$ -T-Zellen untermauert.<sup>199</sup> Die demonstrierten Ergebnisse des partiellen warmen IRS im Mausmodell könnten im Rahmen einer orthotopen LTx im Mausmodell noch aussagekräftiger werden, da auch eine kalte Ischämiephase mit inbegriffen wäre. Zudem könnten höhere T-Zellinfiltrationslevel nach der Reperfusion entste-

hen. Außerdem sind weitere Experimente dazu notwendig, den protektiven Effekt von Digoxin im Rahmen des IRS zu bestätigen. Die experimentelle Intervention mit Digoxin stellt nur eine von vielen potenziellen Therapieoptionen dar.

## **6.2 Der IRS im Rahmen der humanen Lebertransplantation**

### **6.2.1 Bedeutung des frühen IRS im menschlichen Organismus**

Das Ausmaß der klinischen Relevanz des hepatischen IRS im Rahmen der orthotopen LTx ist von enormer Dimension. Denn die histopathologische Befundung der beiden Biopsien der Lebertransplantate, die zum einen am Ende der Kaltpräparation und zum anderen etwa 2 Stunden nach Reperfusion entnommen wurden, ergibt erstaunlicherweise, dass mit einer Prävalenz von etwa 63 % ein früher IRS vorliegt (5.2.1).

#### **Erst mit der histopathologischen Befundung der Biopsien nach Reperfusion ergibt sich die hohe Prävalenz des IRS von 63 %**

Die isolierte Betrachtung des Auftretens eines IRS zeigt in etwa 26 % der Biopsien vor Reperfusion und in etwa 59 % der Biopsien nach Reperfusion einen IRS (5.2.1). Eine vergleichbare Studie von Gaffey et al. zeigte eine Prävalenz des Konservierungsschadens in 8 % der Leberbiopsien vor und in 70 % der Leberbiopsien nach Reperfusion, wobei diese Studie den Konservierungsschaden anhand der kombinierten Anwesenheit sinusoidaler Neutrophilie und hepatozellulärer Nekrose definierte.<sup>215</sup> Diese Daten signalisieren übereinstimmend die hohe Prävalenz und Bedeutung des IRS im Rahmen der humanen LTx.

Eine Studie von Kakizoe et al. verglich die Leberbiopsien vor Transplantation und nach Reperfusion für lichtmikroskopische, immunhistochemische und ultrastrukturelle Analysen.<sup>216</sup> Laut Kakizoe et al. schädigt die kalte Ischämie vor allem Sinusendothelzellen.<sup>216</sup> Dieser Schaden kann mit dem Lichtmikroskop unzureichend erfasst werden, weshalb diesbezüglich nur die elektronenmikroskopische Untersuchung die Funktion nach Transplantation vorherzusagen vermag.<sup>216</sup> Dahingegen kann mittels Lichtmikroskop die Leberbiopsie nach Reperfusion besser beurteilt und eine Aussage über die frühe Transplantatfunktion getroffen werden.<sup>216</sup> Bei den meisten Patienten sagte die Präsenz zonaler oder schwerer fokaler Nekrose und schwerer neutrophiler Exsudation in der Biopsie nach Reperfusion einen schlechten frühen postoperativen Verlauf voraus.<sup>216</sup> Diese Untersuchung deckt sich sowohl mit der Analyse dieser Dissertation als auch mit

der Arbeit von Gaffey et al., dass erst mittels der Biopsien nach Reperfusion eine derart hohe Prävalenz des IRS erreicht wird.

### **Die Problematik der einheitlichen Definition des IRS**

Die histopathologischen Zeichen, die zur Beurteilung der Präsenz eines IRS herangezogen wurden, ergeben sich aus dem Gesamtbild der Kriterien hepatozellulärer Einzelzell- und Gruppenzellnekrosen, granulozytärer Abräumreaktion der Nekrosen, intra- und interzellulärer Ödeme, Infiltration von Kupferzellen, Granulozyten und Lymphozyten, Leberparenchymverfettung, hepatokanalikulärer Cholestase sowie portaler und intraaziniär-perizellulärer Faservermehrung (5.2.1). Jedoch definierten andere Arbeiten den IRS nur anhand von Hepatozytenschwellung und/oder -nekrosen<sup>217</sup> oder anhand von der kombinierten Anwesenheit sinusoidaler Neutrophilie und hepatozellulärer Nekrosen<sup>215</sup>. Wieder eine andere Arbeit legte das Ausmaß des IRS anhand erhöhter Lebertransaminasen- und Bilirubinspiegel sowie anhand einer erhöhten Rate akuter Abstoßungsreaktionen und primärer Nichtfunktionen fest.<sup>45</sup>

Somit wird die Problematik im Rahmen der Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Arbeiten zu dem Thema des IRS ersichtlich. Denn es werden jeweils verschiedene Kriterien zur Definition eines IRS herangezogen. Ursache dafür ist, dass keine klare allgemeingültige Definition dieser Erkrankung existiert. Eine weitere Herausforderung stellt zudem die Abgrenzung des IRS zu akuten zellulären Abstoßungsreaktionen dar. Folglich existieren bereits Arbeiten, die versuchten anhand von Biopsien, die eine Woche nach Transplantation entnommen wurden, bestimmte histologische Kriterien dem Konservierungs-Reperfusionsschaden oder der Abstoßungsreaktion zuzuordnen.<sup>218</sup> Dabei wurden Verfettung, Cholestase und Schwellung weitgehend dem Konservierungs-Reperfusionsschaden zugeordnet, während der zentrilobuläre Hepatozytenverlust dem abstoßungsbezogenen Phänomen zugeordnet wurde.<sup>218</sup>

Eine andere Arbeit sprach die Problematik der Neutrophilie an.<sup>200</sup> Dabei wurden als Indikatoren für einen schweren Konservierungsschaden zonale oder konfluierende, koagulative Nekrosen, vor allem, wenn diese periportal oder überbrückend auftreten, sowie eine schwere neutrophile Exsudation herangezogen.<sup>200</sup> Dabei ist die Neutrophilie ohne Nekrose, die sogenannte operative Hepatitis, davon abzugrenzen, die allein durch operative Manipulation auftreten kann und kein Zeichen des schweren Schadens darstellt.<sup>200</sup> Dadurch wird die allgemeingültige Abgrenzbarkeit zwischen physiologischen und pathologischen Veränderungen im Rahmen von Transplantationen bezüglich des IRS erschwert. Außerdem ist bei der Beurteilung von Leberbiopsien zu berücksichtigen, dass vor allem das subkapsuläre Parenchym anfällig für Schäden und Austrocknung ist.<sup>200</sup> Somit kann

dieses subkapsuläre Parenchym im Vergleich zu tiefer sitzendem Parenchym schwerere pathologische Prozesse aufweisen und damit nicht mehr repräsentativ sein.<sup>200</sup> Das bedeutet, dass unterschiedliche Biopsieentnahmestellen die Schwere eines IRS fälschlicherweise beeinflussen könnten.

## 6.2.2 Einfluss von Spenderfaktoren auf den IRS

Bestimmte Spendereigenschaften üben einen Einfluss auf die Entwicklung eines hepatischen IRS aus. Eine Studie vertritt sogar die Ansicht, dass der Konservierungsschaden nur in einer Teilmenge der Lebertransplantate für die Nichtfunktion nach Transplantation verantwortlich ist und dass eher die Spender- und Empfängerfaktoren diesbezüglich analysiert werden sollten.<sup>216</sup>

### Die Bedeutung des Spendergeschlechts

So zeigt beispielsweise die Analyse des Spendergeschlechts dieser Arbeit, dass Transplantate von männlichen Spendern, unabhängig vom Geschlecht des Empfängers, signifikant häufiger einen IRS entwickeln (5.2.2.1). Somit bilden Transplantate männlicher Spender eine schlechtere Voraussetzung bezüglich des Auftretens eines histopathologisch gesicherten IRS. Andererseits konnte eine klinische Studie mit 436 eingeschlossenen lebertransplantierten Patienten keine Unterschiede hinsichtlich des Spendergeschlechts in Bezug auf die primäre Nichtfunktion und das verspätete Transplantatversagen aufgrund ischämischer Schädigungen feststellen.<sup>219</sup> Das kann unter anderem daran liegen, dass in dieser Arbeit nicht primär der IRS analysiert wurde, sondern das Transplantatversagen, definiert als Patiententod oder Notwendigkeit einer Re-Transplantation.<sup>219</sup>

### Der potenziell protektive Effekt des Einsatzes von Katecholaminen und Kortikoiden

Ferner könnten im Hinblick auf die Organperfusion kreislaurelevante Parameter einen Einfluss auf die spätere Organfunktion ausüben. Es zeigt sich, dass Spender von Organen ohne IRS im Mittel mehr Noradrenalin erhalten haben (5.2.2.1). Passend dazu konnte in einem Experiment mit hirntoten Tieren die Applikation von Vasopressin und Adrenalin synergistisch wirksame Effekte hervorbringen, die die Hämodynamik verbesserten und den Energiestatus der Leber aufrechterhielten.<sup>220</sup> Eine retrospektive Studie, deren Daten auf dem Eurotransplant-Register basierten, untersuchte systematisch 755 Spenderlebern im Hinblick auf die Applikation adrenerger Substanzen an die Spender.<sup>221</sup> Durch die

Anwendung adrenerger Substanzen konnte dabei ein Benefit auf das Outcome nach Transplantation verzeichnet werden, wobei jedoch keine statistische Signifikanz erreicht wurde.<sup>221</sup> Darüber hinaus gibt es in der Literatur vermehrt Hinweise darauf, dass Katecholamine einen modulierenden Effekt auf inflammatorische Reaktionen des Immunsystems haben.<sup>222,223</sup> In Zusammenschau dieser Ergebnisse könnte somit eine Spenderbehandlung mit Katecholaminen nicht nur durch eine Verbesserung der Hämodynamik, sondern auch durch eine Beeinflussung des Immunsystems protektive Effekte im Hinblick auf die Entwicklung eines IRS ausüben.

Da Kortikoide eine mögliche antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung auf den IRS ausüben könnten, wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss der Behandlung der Spender mit Kortikoiden analysiert. Das Ergebnis zeigt, dass bei etwa 47 % der Organe ohne IRS und bei etwa 45 % der Organe mit IRS zuvor eine Kortikoidbehandlung des Spenders, ungeachtet der Höhe der Dosierung, stattgefunden hat, wobei aber kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ist (5.2.2.1). Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer prospektiven randomisierten Studie von Kotsch et al., die anhand einer Spenderbehandlung mit einer definierten Menge an Methylprednisolon eine Reduktion IRS-bezogener Zytokine erreichen konnten, resultierend in einem verminderten IRS und einer geringeren Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen.<sup>224</sup> Die Diskrepanz dieser verschiedenen Ergebnisse liegt sicherlich unter anderem darin begründet, dass bei Kotsch et al. zum einen im Rahmen einer prospektiven randomisierten Studie eine definierte Menge des gleichen Kortikoids zum Einsatz kam und zum anderen der IRS anhand der Höhe der Lebertransaminasen definiert wurde.<sup>224</sup>

### **Die Spender- $\gamma$ -GT ist bei Transplantaten mit IRS signifikant höher im Vergleich zur $\gamma$ -GT von Spendern mit Transplantaten ohne IRS**

Diese Arbeit demonstriert, dass Lebertransplantate von Spendern mit erhöhter  $\gamma$ -GT signifikant häufiger einen histopathologischen IRS entwickeln (5.2.2.3). Im Rahmen einer ausgedehnten Studie von Silberhumer et al. in Kollaboration mit Eurotransplant und dem ELTR wurde der Einfluss spenderspezifischer Risikofaktoren auf die 1-Jahresüberlebensraten nach LTx untersucht.<sup>225</sup> In deren Untersuchung war der Spenderlaborparameter  $\gamma$ -GT signifikant mit einem erhöhten Transplantatversagen im Rahmen einer Uni- und Multivariatanalyse für das 3- und 12-Monatsüberleben assoziiert, während kein signifikanter Einfluss der spenderspezifischen Risikofaktoren GPT, GOT und Bilirubin zu verzeichnen war.<sup>225</sup> Somit könnte die  $\gamma$ -GT einen chronischen Organschaden eher widerspiegeln als beispielsweise die Spendertransaminasen.<sup>225</sup> Im Einklang mit dieser Aussage zeigen auch die Ergebnisse dieser Dissertation keinen signifikanten Einfluss

der Spendertransaminasen und des Spenderbilirubins auf die IRS-Entstehung. Interessanterweise können spenderbezogene Komorbiditäten, wie kardiovaskuläre Erkrankungen<sup>226</sup>, Diabetes mellitus Typ II<sup>227</sup>, chronische Nierenerkrankungen<sup>228</sup> oder Alkoholkonsum<sup>226,229</sup>, auch zu einer Erhöhung der  $\gamma$ -GT beitragen. Diese Erkrankungen könnten mit ursächlich für einen chronischen Organschaden sein.

### **Das Auftreten eines IRS ist mit signifikant erhöhter Spenderglucose und signifikant erniedrigter Spender-CKMB assoziiert**

Im Hinblick auf den Kohlenhydratstoffwechsel zeigt sich, dass Transplantate von Spendern mit hohem Glucosewert signifikant häufiger einen IRS aufweisen (5.2.2.3), was auf eine Störung des Glucosestoffwechsels hindeuten könnte, aber auch eine Auswirkung von Hormonen, Medikamenten, Stresssituationen und Hirnschädigung darstellen könnte. Allerdings ist dieses Ergebnis mit Vorsicht als aussagekräftig zu erklären, da entsprechend der Anleitung von Eurotransplant der Glucosehaushalt des Spenders beispielsweise mittels Insulin- und Glucoseapplikation in bestimmten Grenzen gehalten werden soll<sup>230</sup> und damit stark beeinflusst wird. Interessanterweise offenbart die Analyse verschiedener Enzyme, die unter anderem bei Zellzerfall und im Rahmen von Schädigungen der Leber freigesetzt werden, dass die LDH und CK tendenziell und die CKMB sogar signifikant höher sind in Spendern, für deren Transplantate kein histopathologischer IRS diagnostiziert wurde (5.2.2.3). Die LDH kommt in allen Zellen des Körpers vor und ist unter anderem bei Lebererkrankungen erhöht. Die CK und CKMB werden bei ausgedehntem Zellzerfall unter anderem im Rahmen von Leberschäden freigesetzt. Das Ergebnis der signifikant erniedrigten CKMB der IRS-Gruppe erscheint jedoch paradox, da der IRS normalerweise mit einem ausgedehnteren Zellzerfall assoziiert ist. Das kann dadurch erklärbar sein, dass die diskutierten Laborparameter nicht ausschließlich von der Leber abhängig sind.

### **Die Bedeutung der zunehmenden Allokation marginaler Organe**

Es ist naheliegend, dass Transplantate minderer Organqualität eine eingeschränkte Organfunktion nach Transplantation aufweisen. Daher ist die Analyse weiterer Spenderfaktoren insbesondere in Bezug auf die An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS notwendig, der unter Betrachtung der Marginalität, entsprechend den von Eurotransplant definierten Kriterien<sup>34</sup>, Rechnung getragen wird. Bedeutenderweise wurden entsprechend den von Eurotransplant definierten Kriterien und Grenzwerten (5.2.2.4, Tab. 5-4) in etwa 54 % der Fälle marginale Organe transplantiert (5.2.2.4, Tab. 5-46). Im Einklang mit diesen Daten wird das Ausmaß der Allokation marginaler Organe augenscheinlich, wenn

man bedenkt, dass allein in der Eurotransplant-Region 50 % der Lebertransplantate von Spendern mit erweiterten Spenderkriterien stammen.<sup>47</sup> Des Weiteren zeigt sich im Zusammenhang mit dem Auftreten eines IRS, dass 68 % des Patientenkollektivs bei Transplantation eines marginalen Organs einen IRS entwickeln (5.2.2.4). Hierbei liegt bei einem marginalen Organ das Entwicklungsrisiko eines IRS etwa 59 % höher im Vergleich zur Transplantation einer nicht marginalen Leber (5.2.2.4). Analog der Problematik einer allgemeingültigen Definition des IRS existiert auch zur Begrifflichkeit der Marginalität von Lebertransplantaten keine generelle Festlegung. Beispielsweise wurde im Rahmen einer klinischen Studie der Einfluss möglicher Faktoren untersucht, welche die Marginalität eines Organs definieren könnten: Spenderalter über 60 Jahre, ICU-Aufenthalt mit Beatmung über 4 Tage, kalte Ischämiezeit über 14 Stunden, Dopaminapplikation über 15 µg/kg/min, hypotensive Episoden über 1 Stunde und unter 60 mmHg des systolischen Blutdrucks, Serumnatriumspiegel über 155 mEq/l, Bilirubin über 2 mg/dl, GPT über 170 U/l und GOT über 140 U/l.<sup>201</sup> Dabei zeigte sich ein schwerer viertgradiger IRS, gemäß histologischer Einteilung in 4 Grade, in 46,8 % der Spenderorgane, deren Spender ein Kriterium der Marginalität erfüllt hat.<sup>201</sup> Demgegenüber beinhaltet die von Eurotransplant festgelegte Definition marginaler Organe, von der auch in der hiesigen Arbeit Gebrauch gemacht wird, das Abweichen mindestens eines Grenzwerts der folgenden Kriterien: Alter über 65 Jahre, ICU-Aufenthalt über 7 Tage, BMI über 30 kg/m<sup>2</sup>, Steatose über 40 %, Serum-GPT über 105 U/l, -GOT über 90 U/l, -Bilirubin über 3 mg/dl, und -Natrium über 165 mmol/l.<sup>34</sup> Die oben genannte Prävalenz eines schweren viertgradigen IRS in 46,8 % der Spenderorgane<sup>201</sup> könnte mit der 68%igen Prävalenz dieser Dissertation vergleichbar sein (5.2.2.4). Denn in dieser Dissertation wurde zum einen keine Einteilung in Schweregrade vorgenommen und zum anderen wurden andere Grenzwerte beziehungsweise Marginalitätskriterien angewendet. Die hohe Prävalenz des hepatischen IRS kann nicht zuletzt auf die zunehmende Allokation marginaler Organe<sup>7</sup> zurückgeführt werden. Analog zur Betrachtung der Häufigkeit eines IRS fällt bei der beachtlichen Menge marginaler transplantierte Organe wiederum die klinische Relevanz dieser Thematik ins Gewicht.

### **Die Problematik des hohen Spenderalters und des langen ICU-Aufenthalts im Zusammenhang mit dem IRS und der Transplantatdysfunktion**

Die Auswertung der kategorisch eingeteilten Marginalitätskriterien nach den von Eurotransplant festgelegten Grenzwerten<sup>34</sup> ergeben keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich der Transplantate mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS (5.2.2.4, Tab. 5-4). Dabei wird ein Grenzwert des Spenderalters von über 65 Jahre ver-

wendet.<sup>34</sup> Bei einer Veränderung dieses Grenzwerts auf über 60 Jahre ist jedoch in insgesamt 9 Fällen der Spender über 60 Jahre alt, wobei von diesen 9 Spendertransplantanten 7 Fälle einen IRS entwickelt haben (5.2.2.4). So konnte auch die klinische Studie von Briceño et al. einen Einfluss des Spenderalters über 60 Jahre auf die IRS-Entstehung zeigen.<sup>201</sup> Eine weitere Studie konnte zeigen, dass sich das Spenderalter ab der sechsten Lebensdekade in einer signifikant häufigeren Rate eines schweren IRS, gemessen an Lebertransaminasen und AP nach LTx, sowie einem signifikant verminderten 3- und 5-Jahrestransplantat- und -patientenüberleben niederschlägt.<sup>231</sup> Um eine prädiktive Aussage bezüglich des Risikos einer IRS-Entstehung treffen zu können, sollte daher ein Spenderalter ab 60 Jahren herangezogen werden. Ferner kann ein hohes Spenderalter für eine erhöhte Rate späterer Nichtfunktionen verantwortlich sein<sup>232</sup> genauso wie für eine frühe schlechte Transplantatfunktion<sup>233,234</sup>.

Die Anzahl über 65-jähriger verstorbener Spender für die LTx stieg allein von 284 Spendern im Jahr 2007<sup>235</sup> auf 348 Spender im Jahr 2013<sup>41</sup>, was einem Zuwachs von 23 % entspricht, während die Spender im Alter von 56–64 Jahren von 260<sup>235</sup> auf 303 Spender<sup>41</sup> nur um 17 % zugenommen haben und die Spender im Alter von 16–55 Jahren sogar von 960<sup>235</sup> auf 811 Spender<sup>41</sup> um 16 % abgenommen haben. Diese Entwicklung spiegelt die zunehmende Allokation von Organen älterer Spender wider, die das Risiko der Entstehung eines IRS augmentiert.

Im Hinblick auf die ICU-Aufenthaltsdauer zeigt diese Arbeit, dass die der IRS-Patienten im Mittel länger ist (5.2.2.4, Tab. 5-5). Auch die Arbeit von Briceño et al. bestätigte den Einfluss eines verlängerten intensivmedizinischen Aufenthalts über 4 Tage auf die IRS-Entstehung.<sup>201</sup> Zudem ist ein langer Aufenthalt des Spenders auf der Intensivstation mit einer höheren Rate von primärer Nichtfunktion und früher schlechter Transplantatfunktion assoziiert.<sup>234</sup>

### **Signifikanter Zusammenhang des Grades der Leberverfettung mit der IRS-Prävalenz**

Weitere Faktoren, die in die Definition der Marginalität entsprechend Eurotransplant mit einfließen, stellen die Höhe des BMI sowie das Ausmaß der Leberparenchymverfettung dar.<sup>34</sup> Dabei besteht eine signifikante Korrelation zwischen dem BMI und dem Grad der Gesamtsteatose des Organs.<sup>236</sup> Nach den von Eurotransplant festgesetzten Grenzwerten ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bei Vergleich der Patienten ohne versus mit IRS in Bezug auf einen BMI über 30 kg/m<sup>2</sup> und eine Steatose über 40 % (5.2.2.4, Tab. 5-4). Jedoch offenbart die Veränderung des Grenzwerts auf eine Steatose über 30 % sowie die quantitative Auswertung des BMI im Mittel einen signifikanten Zusammenhang

mit dem IRS (5.2.2.4, Tab. 5-45). Damit wird demonstriert, dass neben dem Grenzwert für das Spenderalter über 65 Jahre der Grenzwert der Steatose über 40 % bezüglich der Marginalität von Organen im Zusammenhang mit der IRS-Prävalenz möglicherweise inadäquat gewählt ist, zumal der Grenzwert der Steatose von Eurotransplant von initialen 30 % auf 40 % erhöht wurde. Ebenso konnte im Rahmen einer klinischen Studie neben anderen Spenderkriterien die Steatose über 30 % einen Einfluss auf die IRS-Entstehung zeigen, wobei die Hauptursache für den schweren IRS in dieser Studie sogar die Steatose über 30 % darstellte.<sup>201</sup> Außerdem führen Transplantate mit schwerer Verfettung häufiger zu primärer Nichtfunktion und früher schlechter Transplantatfunktion.<sup>234,237</sup>

### **Hohe Spendernatriumwerte sind signifikant mit dem Auftreten eines IRS und einem frühem Transplantatverlust assoziiert**

Die Natriumwerte des Spenders sind entsprechend dem Eurotransplant-Grenzwert<sup>34</sup> nicht signifikant mit dem Auftreten eines IRS assoziiert (5.2.2.4, Tab. 5-4). Die grenzwertunabhängige Analyse der kontinuierlichen Variablen hingegen zeigt, dass Spender mit Organen, die einen IRS entwickeln, zuletzt signifikant höhere Serumnatriumwerte hatten im Vergleich zu den Spendern mit Organen ohne IRS (5.2.2.4, Tab. 5-5). Dabei ist bekannt, dass ein hoher Serumnatriumspiegel des Spenders nicht nur als potenzieller Risikofaktor für eine Transplantatdysfunktion gilt,<sup>7</sup> sondern auch signifikant mit einem frühen Transplantatverlust in den ersten drei Monaten nach LTx assoziiert ist<sup>238</sup>. Der Mechanismus, der hinter dem schädlichen Effekt hoher Spendernatriumwerte auf die Transplantatfunktion liegt, wird der Zellschwellung und Exazerbation des reperusionsvermittelten Schadens zugeordnet.<sup>7</sup>

### **6.2.3 Rolle der Empfängercharakteristika im Hinblick auf den IRS**

Die gegebenen Voraussetzungen im Empfängerorganismus, wie beispielsweise die Nierenfunktion, können zum Teil einen Einfluss auf die Entwicklung eines IRS ausüben.

#### **Alter, Geschlecht, BMI, Ischämiezeiten, Grunderkrankungen und Allokationskriterien der Empfänger zeigen jeweils keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten eines IRS**

Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss von Alter, Geschlecht und BMI auf die IRS-Entstehung (5.2.3.1). In Übereinstimmung mit diesen Daten wurde in einer klinischen Studie gezeigt, dass Empfängeralter und -geschlecht keinen Effekt auf die Schwere des unmittelbaren Transplantatschadens nach Transplantation ausübten.<sup>231</sup> Ebenso konnte

die Analyse der BMI-Daten einer prospektiv gewarteten Datenbank lebertransplantierten Patienten keinen Unterschied zwischen verschiedenen Einstufungen des BMI in Bezug auf das todeszensierte Transplantat- oder Patientenüberleben nachweisen.<sup>239</sup>

Überraschenderweise hat die Dauer der Ischämiezeiten keinen signifikanten Einfluss auf die Entstehung eines IRS (5.2.3.1). Diese Daten widersprechen einer klinischen Studie, die wohl einen Einfluss der kalten Ischämiezeit auf den IRS verzeichnen konnte<sup>201</sup>, sowie einer retrospektiven Datenanalyse, die signifikant verschiedene kalte Ischämiezeiten zwischen Patienten mit leichtem und schwerem IRS, gemessen an GOT-Werten des zweiten POT, verzeichnen konnte<sup>240</sup>. Andererseits konnte eine Studie, die den Beitrag der Apoptose zum IRS im Rahmen der humanen LTx untersuchte, ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil apoptotischer Hepatozyten und der Dauer der kalten Ischämie aufzeigen.<sup>241</sup> Dazu wurde ein TUNEL-Assay zur Demonstration apoptotischer Zellen von Biopsien, die unmittelbar nach Reperfusion gewonnen wurden, angewendet.<sup>241</sup>

Ein weiterer möglicher Einfluss auf die Entstehung eines IRS könnten die Grunderkrankungen der Empfänger darstellen, da diese den Gesundheitszustand des Empfängerorganismus widerspiegeln. Die Analyse der Empfängergrunderkrankungen, die als Indikation für eine LTx gestellt wurden, zeigt, dass die alkoholische Leberzirrhose und das hepatozelluläre Karzinom die häufigsten Grunderkrankungen darstellen (5.2.3.2). Jedoch ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der IRS-Entstehung (5.2.3.2). Im Zuge einer retrospektiven Studie wurde gezeigt, dass es keinen Unterschied in Bezug auf akute und chronische Abstoßungsreaktionen sowie auf die 1- und 5-Jahresüberlebensraten zwischen Patienten gibt, die wegen alkoholischer beziehungsweise nicht alkoholischer Lebererkrankung transplantiert wurden.<sup>242</sup> Damit scheint die Indikation zur LTx bezüglich der Entstehung eines IRS und bezüglich des weiteren Verlaufs keine Rolle zu spielen.

Neben den Ischämiezeiten und Grunderkrankungen der Empfänger zeigen auch die Allokationskriterien Lab-MELD, Exceptional-MELD sowie HU-LTx keinen signifikanten Zusammenhang mit dem IRS (5.2.3.3). In Übereinstimmung dazu konnten auch im Rahmen einer klinischen Studie keine Effekte des MELD-Scores auf die Schwere des unmittelbaren Transplantatschadens nach Transplantation detektiert werden.<sup>231</sup> Demzufolge können diese Allokationskriterien nicht zur Beurteilung des Risikos der Entwicklung eines IRS verwendet werden.

### **Signifikanter Einfluss der präoperativen Nierenfunktion auf den IRS**

Patienten, die vor LTx symptomatisch mittels Dialyse therapiert wurden, entfalten signifikant häufiger einen IRS (5.2.3.1). Die insuffiziente Nierenfunktion könnte in einem hepato-renalen Syndrom begründet liegen, welches eine funktionelle und potenziell reversible renale Dysfunktion darstellt, die primär mit Lebererkrankungen assoziiert ist<sup>243</sup>. Patienten mit hepato-renalem Syndrom werden häufig mittels Dialyse symptomatisch behandelt, bis gegebenenfalls eine LTx möglich wird. Dabei ist bekannt, dass das hepato-renale Syndrom mit einem schlechten Outcome nach LTx assoziiert ist.<sup>244</sup>

### **Patienten mit IRS haben häufiger Abstoßungsreaktionen und Re-Lebertransplantationen**

Abstoßungsreaktionen binnen 6 Wochen nach Transplantation treten gehäuft in der Gruppe der Patienten mit histopathologischem IRS auf (5.2.3.4). Dabei haben IRS-Patienten ein etwa 56 % höheres Risiko einer akuten Abstoßungsreaktion (5.2.3.4). Paradoxerweise zeigen marginale Organe keine große Tendenz zu einer Häufung von Abstoßungsreaktionen, wobei diese Patienten gegenüber Patienten mit nicht marginalem Transplantat ein nur 0,58-mal so großes Risiko einer zellulären Abstoßungsreaktion aufweisen (5.2.3.4). Auch für die Notwendigkeit von Re-LTx ergeben sich keine großen Unterschiede, wobei Patienten mit IRS etwas häufiger retransplantiert werden (5.2.3.4). Dennoch kann gefolgert werden, dass Patienten mit eingetroffenem IRS, wenn auch nicht signifikant, nicht nur etwas häufiger eine histopathologische Abstoßungsreaktion zeigen, sondern auch häufiger retransplantiert werden.

### **Der Faktor der Marginalität wirkt sich signifikant auf das Patientenüberleben aus**

Um überdies auf die Prognose des IRS und marginaler allozierter Organe noch genauer einzugehen, bedarf es einer Betrachtung des längerfristigen Erfolgs nach der LTx. Dabei besteht die Annahme, dass Patienten, deren Organe einen IRS entwickelt haben, schlechtere Überlebensdaten aufweisen. Diesbezüglich zeigt der Vergleich, dass Patienten gehäuft in der IRS-Gruppe verstorben sind und diese eine im Schnitt kürzere Überlebensdauer und geringere Überlebenswahrscheinlichkeit aufweisen im Vergleich zu Patienten ohne IRS, wobei überraschenderweise jedoch kein Signifikanzniveau erreicht wird (5.2.3.5). Erstaunlicherweise offenbart demgegenüber der Vergleich der Patienten mit marginalem beziehungsweise nicht marginalem Organ, dass Patienten mit marginalem Transplantat nicht nur signifikant häufiger versterben, sondern dass diese Patienten auch eine signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit besitzen (5.2.3.5). Die Dimension der klinischen Relevanz dieser Ergebnisse wird jedoch erst bei der Analyse des

Überlebens, basierend sowohl auf dem Parameter des IRS als auch der Marginalität, ersichtlich. Denn Patienten mit marginalem Transplantat, die zudem noch einen IRS entwickeln versterben nicht nur signifikant häufiger, sondern weisen auch signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeiten auf (5.2.3.5). Demnach beträgt die 1-Jahresüberlebensrate innerhalb der Gruppe der Patienten mit marginalem Transplantat bei An- versus Abwesenheit eines histopathologischen IRS 51 % versus 75 % (5.2.3.5). Dahingegen spielt es innerhalb der Gruppe der Patienten mit nicht marginalem Transplantat für das Überleben kaum eine Rolle, ob ein IRS an- oder abwesend ist (5.2.3.5).

Erst damit wird die Dimension der Problematik marginaler Organe im Zusammenhang mit dem IRS evident. Denn der Bedarf an Spenderorganen hat infolge der zunehmenden Inzidenz von Organversagen deutlich zugenommen, wohingegen das Angebot optimaler verstorbener Spender niedrig und ungenügend ist, um dem steigenden Bedarf gerecht zu werden. Aus diesem Grund werden zunehmend marginale Organe alloziert, die im Zusammenhang mit der hohen Prävalenz des IRS eine ungünstige Kombination in Bezug auf das Outcome nach Transplantation abgeben. Der IRS stellt eine Untermauerung der Transplantatdysfunktion in marginalen Organen dar,<sup>7</sup> womit deutlich wird, dass insbesondere marginale Organe einen IRS entwickeln und damit auch auf das Überleben Einfluss nehmen. So kam eine klinische Studie zu dem Ergebnis, dass die frühe Transplantatdysfunktion in 56 % der Empfänger eintrat, wenn die Spender höhere BMI-Indizes aufwiesen.<sup>245</sup> Während dabei das Patientenüberleben nicht signifikant verschieden war in Bezug auf die An- beziehungsweise Abwesenheit einer frühen Transplantatdysfunktion, war das Transplantatüberleben in Abwesenheit einer frühen Transplantatdysfunktion signifikant höher.<sup>245</sup> Eine weitere klinische Studie zeigte, dass Spenderlebern mit über 30%iger Verfettung mit einer signifikanten Abnahme sowohl des 4-Monatstransplantatüberlebens als auch des 2-Jahres-Empfängerüberlebens einhergingen.<sup>246</sup> Neben dem Spender-BMI definiert auch das Spenderalter die Marginalität von Organen und kann damit einen Einfluss auf die Transplantatfunktion im Sinne eines marginalen Organs ausüben. So untersuchte eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie das Outcome nach LTx im Vergleich von Spendern über 70 Jahre mit Spendern unter 60 Jahre, wobei das Langzeitüberleben von Transplantatempfängern der älteren Spender signifikant geringer war.<sup>247</sup> Zudem ergab eine Multivariatanalyse im Rahmen dieser Arbeit, dass Transplantatdysfunktion, Mortalität und reduziertes Überleben signifikant mit dem Spendergewicht und Empfänger-MELD-Score assoziiert waren.<sup>247</sup> In diesem Sinne demonstriert auch diese Arbeit, dass sich die Marginalität von Organen, unter anderem definiert durch einen hohen Spender-BMI und ein hohes Spenderalter, auf das Patientenüberleben negativ auswirkt.

## 6.2.4 Bedeutung der laborchemischen Verläufe

Die Überlebensanalyse demonstriert, dass Patienten mit marginalem Transplantat, die zudem noch einen IRS entwickeln eine viel schlechtere Prognose aufweisen gegenüber Patienten mit marginalem Organ ohne IRS (5.2.3.5). Aus diesem Grund wurde auf den Vergleich dieser beiden Gruppen ein besonderes Augenmerk gelegt.

### **Patienten mit marginalem Transplantat und IRS zeigen ab dem 3. POT zum Teil eine signifikant langsamere Reduktion der GPT und GOT im Vergleich zu Patienten mit marginalem Transplantat ohne IRS**

Wie zu erwarten, sind sowohl die leberspezifische GPT als auch die GOT und GLDH bei Patienten mit IRS und marginalem Organ erhöht. Dabei zeigt sich bei Patienten mit marginalem Transplantat bei vorhandenem IRS eine zum Teil signifikant langsamere Reduktion der Transaminasen ab dem 3. POT im Vergleich zu Patienten ohne IRS (5.2.4.1). Die Erhöhung der GPT steht damit im Einklang zu dem Ergebnis im Tiermodell (5.1.1) als Zeichen einer frühen Leberzellschädigung im Rahmen des IRS. Eine klinische Studie teilte die Schwere des Konservierungsschadens anhand histologischer Kriterien ein und konnte zeigen, dass die GPT- und GOT-Höchstwerte bei Patienten mit moderatem bis schwerem Konservierungsschaden am 2.–14. POT signifikant höher waren im Vergleich zu Patienten mit mildem oder fehlendem Konservierungsschaden.<sup>215</sup> Damit korreliert die Schwere des IRS mit der Höhe der Transaminasen. Jedoch war in dieser Studie durch eine beträchtliche Überlappung der GPT- und GOT-Werte zwischen den drei Gruppen die Höhe der Transaminasen nicht zur Prädiktion der An- beziehungsweise Abwesenheit eines Konservierungsschadens im individuellen Fall geeignet.<sup>215</sup> Genauso demonstriert die Analyse dieser Dissertation, dass vereinzelt sehr hohe Werte dieser Parameter auch bei Patienten ohne IRS auftreten (5.2.4.1).

### **Patienten mit marginalem Transplantat und IRS zeigen an allen POT signifikant höhere Bilirubinwerte und zum Teil signifikant niedrigere Faktor-V-Werte als Patienten mit marginalem Transplantat ohne IRS**

Die detaillierte Analyse der Serumbilirubinwerte im Vergleich der Patienten ohne versus mit IRS demonstriert an den ersten beiden POT statistisch signifikante Unterschiede (5.2.4.2). Der isolierte Vergleich der Patienten mit marginalem Organ und An- beziehungsweise Abwesenheit eines IRS ergibt erstaunlicherweise, dass sogar an allen POT die Bilirubinwerte von IRS-Patienten statistisch signifikant höher sind (5.2.4.2).

Dahingegen zeigen die Vergleiche der cholestatischen Parameter  $\gamma$ -GT und AP, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit An- beziehungsweise Abwesenheit eines histopathologischen IRS sowie mit marginalem oder nicht marginalem Organ ergeben (5.2.4.2). Jedoch treten die meisten Ausreißer und Extremwerte in der Gruppe der Patienten mit IRS und marginalem Organ auf (5.2.4.2). Dennoch ist dieses Ergebnis auffallend, da zwar die  $\gamma$ -GT und AP auch im Rahmen anderer Erkrankungen erhöht sein können, aber die im Serum messbare  $\gamma$ -GT-Aktivität ausschließlich auf die Leber zurückzuführen ist und damit eigentlich ein organspezifisches Leitenzym darstellt.<sup>202</sup> Überdies sind die Spender- $\gamma$ -GT-Werte der Patienten mit Entwicklung eines IRS signifikant höher, als die Spender- $\gamma$ -GT-Werte der Patienten, die von einem IRS verschont bleiben (5.2.2.3). Das bedeutet, dass die Höhe der Spender- $\gamma$ -GT signifikant mit dem IRS im Empfänger assoziiert ist, dass aber die Empfänger- $\gamma$ -GT dabei keine Rolle spielt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die  $\gamma$ -GT-Werte der Spender vermutlich chronisch erhöht sind und damit eine Vorschädigung der Organe darstellen, während es im Empfänger zu einer IRS-unspezifischen akuten Erhöhung der  $\gamma$ -GT im Rahmen des perioperativen Zeitfensters kommt. Im Rahmen einer retrospektiven Studie wurden unter anderem die Parameter GPT, GOT,  $\gamma$ -GT und AP im Zusammenhang mit histologisch klassifizierten Abstoßungsreaktionen untersucht mit dem Ergebnis, dass immer nur an vereinzelten Tagen der ersten 10 POT signifikante Unterschiede dieser Parameter zwischen Patienten mit schwerer bis moderater im Vergleich zu milder bis fehlender Abstoßungsreaktion zu verzeichnen waren.<sup>248</sup> Das spricht dafür, dass der IRS in Verbindung mit akuten Abstoßungsreaktionen nicht mit konstanten Veränderungen der  $\gamma$ -GT und AP einhergeht und diese daher häufig nicht auf den Individualfall angewendet werden können.

Die Analyse der Syntheseleistung der Leber anhand von Faktor V ergibt, dass Patienten ohne IRS zum Teil signifikant bessere Syntheseleistungen der ersten 7 POT aufweisen (5.2.4.3). Eine Studie, die den Beitrag der Apoptose zum IRS im Rahmen der humanen LTx mittels TUNEL-Assay auf Postreperfusionsbiopsien untersuchte, zeigte, dass der prozentuale Anteil TUNEL-positiver Hepatozyten signifikant mit den postoperativen GOT- und invers mit den Faktor-V-Werten korrelierte.<sup>241</sup> Allerdings demonstrierte diese Studie auch, dass sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil TUNEL-positiver Hepatozyten und den postoperativen Serumbilirubinwerten ergab.<sup>241</sup> Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei einer Leberschädigung der Anstieg der GOT und GPT häufig vor dem des Bilirubins stattfindet.

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse, dass bereits in der ersten Woche nach Transplantation Patienten mit marginalem Transplantat und IRS sowohl eine höhe-

re Leberzellschädigung aufweisen als auch eine schlechtere Organfunktion bezüglich der Syntheseleistung von Faktor V und der Erhöhung des Cholestaseparameters Bilirubin, was sich letztendlich auch in der Überlebensanalyse niederschlägt.

### **6.2.5 Bedeutung der Infiltration CD3<sup>+</sup>- und $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen**

Im Folgenden wird eruiert, ob die im Mausmodell detektierte CD3<sup>+</sup>-T-Zellinfiltration beim humanen IRS und marginalen Organen ebenfalls eine Rolle spielt.

#### **Marginale Transplantate mit IRS weisen im Mittel eine höhere CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration auf gegenüber nicht marginalen Transplantaten ohne IRS**

Interessanterweise kann im Tiermodell gezeigt werden, dass es im Zusammenhang mit dem induzierten IRS zu einer beträchtlichen Infiltration CD3<sup>+</sup>-T-Zellen kommt (5.1.2). Dabei ergibt die Analyse der Transplantatbiopsien von 21 Patienten, dass marginale Transplantate mit IRS zwar im Mittel eine höhere CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration aufweisen gegenüber nicht marginalen Transplantaten ohne IRS, sich aber keine statistisch signifikanten Unterschiede ergeben (5.2.5.1). Bedeutenderweise gehören aber Ausreißer und Extremwerte in Richtung einer vermehrten Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen in die lobulären Bereiche fast ausschließlich der IRS-Gruppe an (5.2.5.1). Trotzdem ist die Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen nicht zur Prädiktion der An- beziehungsweise Abwesenheit eines Konservierungsschadens im individuellen Fall geeignet. Möglicherweise findet eine signifikante CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration erst zu einem späteren Zeitpunkt nach Transplantation statt, wenn man insbesondere bedenkt, dass im Tiermodell die Lebern erst 24 Stunden nach Reperfusion untersucht wurden im Gegensatz zu den humanen Biopsien, die bereits den Zeitpunkt von etwa 2 Stunden nach Reperfusion abbilden.

Ein weiterer Faktor, der die Vergleichbarkeit der Biopsien untereinander einschränkt, ist die Tatsache, dass vor allem das subkapsuläre Parenchym anfällig für Schäden und Austrocknung ist und somit schwerere pathologische Prozesse aufweisen kann als tiefer sitzendes Parenchym.<sup>200</sup> Außerdem zeigte eine Studie, die den Beitrag der Apoptose zum IRS im Rahmen der humanen LTx mittels TUNEL-Assay auf Postreperusionsbiopsien untersuchte, dass TUNEL-positive Hepatozyten in 30,4 %  $\pm$  18,7 % in der subkapsulären Region, 14,5 %  $\pm$  13,5 % in der zentrilobulären Zone und 10,3 %  $\pm$  9,5 % in der periportalen Zone auftraten,<sup>241</sup> wodurch die Vergleichbarkeit der Biopsien sogar auf histologischer Ebene erschwert ist.

Interessanterweise hängen die Marginalität und damit auch die Organqualität unter anderem davon ab, ob das Transplantat von einem verstorbenen Spender oder einer Leberlebendspende stammt, wobei in diesen Fällen auch Infiltrationen CD3<sup>+</sup>-Zellen zu verzeichnen sind.<sup>249</sup> So zeigte die Studie von Jassem et al. anhand des Vergleichs präoperativer Leberbiopsien von verstorbenen Spendern und Lebendspendern mittels Antikörperfärbung, dass signifikant höhere Level CD3<sup>+</sup>-Lymphozyten in Lebern von verstorbenen Spendern gefunden wurden im Vergleich zu Lebendspenderorganen.<sup>249</sup> Die Studie kam interessanterweise zu dem Schluss, dass Lebern verstorbener Spender bereits vor Transplantation einen inflammatorischen Schaden erfahren, was zu einem subsequenten IRS und erhöhter Suszeptibilität des Organs für weitere Immunreaktionen führen könnte.<sup>249</sup> Diese Aussage von Jassem et al. steht unter der Beachtung des Aspekts der Organqualität somit im Einklang mit den Ergebnissen dieser Dissertation, da bereits vor Reperfusion eine Infiltration CD3<sup>+</sup>-Zellen zu verzeichnen ist (5.1.2; 5.2.5.1).

### **Zwei Stunden nach Reperfusion besteht eine nur sehr geringe Infiltration $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen**

Der partielle warme IRS im Tiermodell wird durch ROR $\gamma$ t-exprimierende IFN- $\gamma$ NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen über einen IL-17A-vermittelten Mechanismus vorangetrieben (5.1.4). Dazu wird der Zeitpunkt 24 Stunden nach Reperfusion betrachtet (5.1.4). Im Setting der humanen LTx besteht 2 Stunden nach Reperfusion jedoch nur sehr vereinzelt eine Infiltration  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen, weshalb eine Quantifizierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht sinnvoll war (5.2.5.2). Das kann daran liegen, dass eine signifikante  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellinfiltration in humane Lebertransplantate möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet. Darüber hinaus stellen  $\gamma\delta$ -T-Zellen eine eher kleine Fraktion aller in der Leber vorkommenden Immunzellen dar, wenn man bedenkt, dass nur 25 % der nicht hepatozytischen Zellen Lymphozyten sind, von denen wiederum 63 % T-Zellen sind.<sup>50</sup> Dabei stellen lediglich 15–25 % dieser intrahepatischen T-Zellen  $\gamma\delta$ -T-Zellen dar, wobei unkonventionelle T-Zellen, die keine NK-Zellmarker exprimieren, die hauptsächliche Gruppe der  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einschließen.<sup>50</sup> Zusammenfassend gilt die Leber zwar als eine der reichsten Quellen von  $\gamma\delta$ -T-Zellen im Körper,<sup>50</sup> jedoch stellt lediglich eine kleine Population  $\gamma\delta$ -T-Zellen dar. Diese Tatsache erschwert in Anbetracht des kurzen Zeitintervalls von nur 2 Stunden nach Reperfusion den signifikanten Nachweis infiltrierender  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-Zellen im Zusammenhang mit dem IRS und der Marginalität von Lebertransplantaten.

## 6.2.6 Diskussion der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Die für den induzierten IRS ursächlichen CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden im Tiermodell dieser Arbeit mittels gentechnischer (5.1.3) und durchflusszytometrischer (5.1.4) Analysen weiter differenziert. Dabei zeigt sich, dass neben CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen, den sogenannten DN-T-Zellen, unkonventionelle IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen die prominenteste Quelle für IL-17A sind (5.1.4). Dabei ist IL-17A maßgeblich in den Pathomechanismus des IRS involviert und auch im Rahmen der RT-PCR signifikant erhöht im Zusammenhang mit dem IRS (5.1.3). Zudem konnte mithilfe einer Reportermauslinie bewiesen werden, dass die den frühen IRS vermittelnden DN-T-Zellen und IL-17A-produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen von dem Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t abhängig sind,<sup>199</sup> der ebenso in der RT-PCR eine signifikante Erhöhung aufweist (5.1.3). Die Besonderheit der Untersuchung der humanen Proben mittels RT-PCR liegt darin, dass die zweite Biopsie bereits 2 Stunden nach Reperfusion entnommen wurde und auch 2nd-Look-Biopsien von 6 der 21 Patienten gentechnisch analysiert wurden, deren Entnahme im Zeitraum innerhalb von 1–2 Tagen nach Transplantation stattfand. Dabei bietet die RT-PCR den Vorteil eines sensitiveren und spezifischeren experimentellen Verfahrens gegenüber der immunhistochemischen Quantifizierung.

### Der T-Zelloberflächenrezeptor CD3

In Anlehnung an die tendenziell höhere CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration in humane Biopsien mit IRS (5.2.5.1) kann gezeigt werden, dass der T-Zelloberflächenrezeptor CD3 tendenziell erhöhte mRNA-Expressionslevel in Verbindung mit dem IRS und der Marginalität von Organen aufweist (5.2.6.1). Dabei zeigen sich analog der immunhistochemischen Analyse (5.2.5.1) interessanterweise bereits in den Biopsien vor Reperfusion beachtlich höhere Expressionslevel in der IRS-Gruppe, was möglicherweise auf eine ischämische Vorschädigung der Transplantate zurückgeführt werden kann (5.2.6.1).

Um den Einfluss des Hirntods auf inflammatorische Veränderungen und auf die Verstärkung eines IRS des Spendertransplantats zu untersuchen, wurden in einer Studie Biopsien unmittelbar vor der Spenderlaparotomie, vor Perfusion, vor Reperfusion und eine Stunde nach Reperfusion untersucht.<sup>45</sup> Dabei zeigten sich zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant höhere mRNA-Level von CD3 bei hirntoten Spendern im Vergleich zu Lebendspendern.<sup>45</sup> Diese Ergebnisse untermauern die erhöhte CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration im Zusammenhang mit dem IRS, da der Hirntod zu einem schwerer ausgeprägten IRS führt.<sup>45</sup>

### **Das Chemokin CXCL-1 ist in der Biopsie vor Reperfusion bei Patienten mit IRS signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten ohne IRS**

Wie zuvor im Tiermodell demonstriert, geht der partielle warme IRS mit signifikant erhöhten mRNA-Expressionslevel für TNF- $\alpha$  und CXCL-1 einher (5.1.3), wobei TNF- $\alpha$  einen zentralen Mediator des IRS darstellt, der die Produktion und Freisetzung von CXC-Chemokinen stimuliert<sup>83</sup>. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen im Tiermodell zeigen die Resultate bezüglich der humanen Biopsien eine tendenziell höhere TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression in der IRS-Gruppe, die bereits in der Biopsie vor Reperfusion manifest wird (5.2.6.2). Dahingegen zeigen sich bei Vergleich der Patienten mit marginalem versus nicht marginalem Transplantat keine wesentlichen Unterschiede (5.2.6.2). Auch hier demonstriert der isolierte Vergleich der marginalen Organe, dass ein zusätzlicher IRS mit einer höheren mRNA-Expression für TNF- $\alpha$  einhergeht als bei Transplantaten ohne IRS (5.2.6.2). Hinweise darauf, dass der IRS mit einer TNF- $\alpha$ -Überexpression assoziiert ist, liefern auch Ergebnisse aus Ansätzen der Behandlung eines IRS mittels Methylprednisolontherapie des Spenders, wobei der IRS allerdings anhand der Höhe der Lebertransaminasen festgemacht wurde.<sup>224</sup>

Neben dem Zytokin TNF- $\alpha$  wurde auch das Chemokin CXCL-1 analysiert. CXCL-1, auch als Gro- $\alpha$  bezeichnet,<sup>250</sup> ist neben anderen Chemokinen in der Leber dafür bekannt, durch Stimulation mit IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  oder durch bakterielle Invasion hochreguliert zu werden, was zu einer vermehrten Infiltration neutrophiler Granulozyten führt<sup>251</sup>. Interessanterweise ergibt die Analyse dieser Arbeit, dass der humane IRS mit erhöhten mRNA-Expressionslevel des Chemokins CXCL-1 einhergeht, wobei der Unterschied der IRS-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne IRS in der Biopsie vor Reperfusion sogar signifikant verschieden ist (5.2.6.2). Dies ist ein Hinweis auf eine Vorschädigung der Transplantate durch die Ischämie. Besonders fallen die Unterschiede auch deutlich bei der isolierten Analyse der Patienten mit marginalem Transplantat auf, bei denen wiederum die Biopsien der Transplantate mit IRS höhere Expressionslevel präsentieren (5.2.6.2).

### **Die Bedeutung verschiedener T-Zellsubpopulationen im Kontext des IRS**

Da sowohl im Tiermodell als auch in der Untersuchung der humanen Proben eine Beteiligung des spezifischen Immunsystems am IRS in Form von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen zu verzeichnen ist, wurde auf Basis der Ergebnisse im hiesigen Mausmodell eine weiterführende Analyse der beteiligten T-Zellsubpopulationen im Hinblick auf den humanen IRS durchgeführt. CD3<sup>+</sup>-Zellen stellen beispielsweise Th-Zellen dar, die entsprechend ihres Zytokinprofils unter anderem in Th1- und Th17-Zellen unterteilt werden können, die CD4<sup>+</sup>

sind. Bislang wurde angenommen, dass Th1-Zellen unter anderem durch die Freisetzung von IFN- $\gamma$ <sup>134,139</sup> sowie Th17-Zellen als Hauptquelle für IL-17A entscheidend an der Pathophysiologie des IRS beteiligt sein sollen<sup>110</sup>. Entsprechend den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse im Tiermodell spielen IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen, wie beispielsweise Th1-Zellen, jedoch keine Rolle in Bezug auf den IRS (5.1.4). Außerdem demonstriert das Tiermodell dieser Arbeit, dass zum einen CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen sowie unkonventionelle IFN- $\gamma$ NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen die prominenteste Quelle für IL-17A sind (5.1.4). Mithilfe einer Reportermauslinie wurde sogar bewiesen, dass die den frühen IRS vermittelnden DN-T-Zellen und IL-17A-produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen von dem Th17-induzierten Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t abhängig sind.<sup>199</sup> Daher wird die Hypothese formuliert, dass der in den Differenzierungsprozess zu Th1-Zellen involvierte Transkriptionsfaktor TBX-21 im Komplex des humanen IRS keine Rolle spielt. Darüber hinaus weisen der humane Transkriptionsfaktor RORc und der TCR $\gamma$ -Genlocus, der die  $\gamma$ -Kette des  $\gamma\delta$ TCR der  $\gamma\delta$ -T-Zellen kodiert, eine höhere Expression im Zusammenhang mit dem humanen IRS auf.

### **Der Th1-Zelltranskriptionsfaktor TBX-21**

Im Tiermodell spielen IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen, wie Th1-Zellen, 24 Stunden nach Reperfusion keine Rolle im Pathomechanismus des humanen IRS (5.1.4). In Übereinstimmung dazu zeigt die mRNA-Expressionsanalyse der humanen Biopsien des in den Differenzierungsprozess zu Th1-Zellen involvierten Transkriptionsfaktors TBX-21 keine konstanten Assoziationen der Mittelwerte mit dem Auftreten eines IRS (5.2.6.3). So werden in einigen Proben neben unspezifischen Schmelztemperaturen in der RT-PCR keine spezifischen Peaks an dem der TBX-21-entsprechenden Schmelztemperatur angezeigt (5.2.6.3). Das spricht dafür, dass TBX-21 in vielen Proben vermutlich gar nicht exprimiert wird und somit Th1-Zellen im Rahmen des humanen IRS keine entscheidende Rolle spielen.

Um den Einfluss des Hirntods auf inflammatorische Veränderungen und auf die Verstärkung eines IRS des Spendertransplantats zu untersuchen, wurden in einer Studie Biopsien unmittelbar vor der Spenderlaparotomie, vor Perfusion, vor Reperfusion und eine Stunde nach Reperfusion untersucht.<sup>45</sup> Dabei zeigte sich, dass trotz einer konsistenten Erhöhung von IFN- $\gamma$  bei hirntoten Spendern im Vergleich zu Lebendspendern lediglich in der Biopsie im Rahmen der Laparotomie die mRNA-Expression statistisch signifikant erhöht war,<sup>45</sup> was die Daten der hiesigen Arbeit unterstreicht, dass Th1-Zellen wahrscheinlich nicht signifikant in den Pathomechanismus des IRS mit involviert sind.

### **Der Transkriptionsfaktor RORc und der TCR $\gamma$ -Genlokus**

Tatsächlich zeigt die detaillierte mRNA-Genexpressionsanalyse dieser Arbeit, dass beim IRS in den Biopsien vor und nach Reperfusion im Vergleich zu Patienten ohne IRS höhere RORc-Expressionslevel in der IRS-Gruppe zu verzeichnen sind (5.2.6.3). Jedoch scheint in der 2nd-Look-Biopsie, das heißt 1–2 Tage nach Transplantation, die hohe RORc-Expression bezüglich des IRS keine Rolle mehr zu spielen (5.2.6.3). Für die Gegenüberstellung der Patienten mit marginalem und nicht marginalem Transplantat ergeben sich ebenso in der Biopsie vor und nach Reperfusion höhere RORc-mRNA-Expressionslevel zugunsten der Patienten mit marginalem Transplantat (5.2.6.3). Das bedeutet, dass der IRS und die Marginalität der Organe mit einer erhöhten RORc-mRNA-Expression sowohl im ischämisch vorgeschädigten Organ als auch in der reperfundierten Leber einhergehen. Diese Ergebnisse sind somit ein Hinweis darauf, dass die im Tiermodell 24 Stunden nach Reperfusion detektierten ROR $\gamma$ t-abhängigen  $\gamma\delta$ - und DN-T-Zellen auch im humanen Setting der ischämie-reperusionsbedingten Leberschädigung eine Funktion einnehmen.

Der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t ist im Zusammenhang mit hepatischen Störungen bereits bekannt. So wurde interessanterweise für ROR $\gamma$ t neben ROR $\alpha$  gezeigt, dass diese im Zusammenhang mit einem akut-auf-chronischen Hepatitis-B-Leberversagen hochreguliert waren.<sup>252</sup> Dazu wurden genexpressionstechnisch periphere mononukleäre Zellen untersucht, wobei die Frequenz peripherer Th17-Zellen in Patienten mit Leberversagen signifikant erhöht war im Vergleich zu Patienten mit chronischer Hepatitis B oder Kontrollen.<sup>252</sup>

Im Hinblick auf die Analyse des TCR $\gamma$ -Genlokus mit der Frage nach einer Beteiligung von  $\gamma\delta$ -T-Zellen am hepatischen IRS und der Marginalität von Organen ergeben sich tatsächlich in der Biopsie nach Reperfusion statistisch signifikante Unterschiede in Richtung einer erhöhten mRNA-Expression bei Patienten mit IRS (5.2.6.3). Paradoxerweise zeigt die Gegenüberstellung der Patienten mit marginalem und nicht marginalem Transplantat, dass eher nicht marginale Transplantate im Mittel eine höhere Expression aufweisen im Vergleich zu marginalen Transplantaten (5.2.6.3). Dennoch zeigt die isolierte Analyse der Patienten mit marginalem Transplantat, dass Transplantate mit zusätzlichem IRS deutlich höhere Expressionslevel präsentieren als Transplantate ohne IRS (5.2.6.3).

### **Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse deuten auf eine Beteiligung TBX-21<sup>-</sup>RORc<sup>+</sup>TCR $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen am IRS hin**

In Anlehnung an die Resultate des partiellen warmen IRS im Tiermodell spielen möglicherweise die im Tiermodell detektierten Faktoren gleichermaßen im Setting des humanen transplantationsassoziierten IRS eine entscheidende Rolle. Dabei wird angenommen, dass in der frühen Phase des IRS proinflammatorische Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  von Kupfferzellen,<sup>106–108</sup> freigesetzt werden. TNF- $\alpha$  leitet neben anderen Mediatoren die subakute Phase ein, indem die Produktion und Freisetzung von CXC-Chemokinen,<sup>83</sup> wie CXCL-1, stimuliert wird, was zu einer Akkumulation neutrophiler Granulozyten mit der Folge einer Leberschädigung führt<sup>119</sup>. Das spezifische Immunsystem ist in Form von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen beteiligt. Dabei wird insbesondere mit der hohen mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors RORc sowie der signifikant höheren TCR $\gamma$ -Expression ein wichtiger Schritt in Richtung einer weiterführenden Differenzierung der beteiligten T-Zellsubpopulationen vollzogen. Damit kann angenommen werden, dass TBX-21<sup>-</sup>RORc<sup>+</sup>TCR $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen in der Pathophysiologie des humanen IRS im Rahmen der orthotopen LTx eine entscheidende Rolle spielen.

### **6.2.7 $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext anderer Erkrankungen**

Bedeutenderweise werden  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Literatur bereits in einer Vielzahl von Arbeiten im Zusammenhang mit Erkrankungen, wie beispielsweise entzündlichen Veränderungen, erwähnt.  $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden bereits mit Hirnläsionen bei multipler Sklerose in Zusammenhang gebracht<sup>253</sup> und im Liquor eines Patienten mit subakuter sklerosierender Panenzephalitis nachgewiesen, wobei die TCR $\gamma$ -Klone CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup> waren<sup>254</sup>. Eine weitere Studie offenbarte, dass IL-17-produzierende  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Patienten mit aktiver Lungentuberkulose erhöht waren.<sup>255</sup> Im Bereich der Hämatonkologie analysierte eine Studie CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>- $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut von allogenen Knochenmarksempfängern.<sup>256</sup> Das Ergebnis zeigte, dass CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>- $\gamma\delta$ -T-Zellen in den ersten 4 Wochen nach Transplantation bei Patienten erhöht waren, die hämatopoetische Wachstumsfaktoren bekommen hatten, und 3–12 Monate nach Transplantation bei Patienten mit chronischer Graft-versus-host-disease deutlich vermindert waren.<sup>256</sup>

Auch in Bezug auf Lebererkrankungen wurden  $\gamma\delta$ -T-Zellen bereits erwähnt. So fand eine Studie heraus, dass die Proportion von  $\gamma\delta$ -T-Zellen in Blutproben von Patienten mit Hepatitis-B-assoziiertem, akut-auf-chronischem Leberversagen viel niedriger war als in Proben von Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Virusinfektion oder gesunden Kontrol-

len.<sup>257</sup> Dabei produzierten  $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin bei Patienten mit Hepatitis-B-assoziiertem, akut-auf-chronischem Leberversagen die größte Menge an TNF- $\alpha$  oder IL-17 im Vergleich dieser drei Gruppen.<sup>257</sup> Damit wird angenommen, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen beim Hepatitis-B-assoziierten, akut-auf-chronischen Leberversagen involviert sind durch die Produktion erhöhter Mengen inflammatorischer Zytokine und oder durch zytotoxische Fähigkeiten.<sup>257</sup> Folglich spielen die im Tiermodell dieser Arbeit abgebildeten IL-17-produzierenden  $\gamma\delta$ -T-Zellen auch im Rahmen virusassoziiertes Leberversagen im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle.

### **Untersuchungen des Migrationsverhaltens deuten auf eine hohe Migrationskapazität von $\gamma\delta$ -T-Zellen hin**

Interessanterweise existieren auch Arbeiten zum Migrationsverhalten von T-Zellen im Zusammenhang mit der LTx. So widmete sich eine prospektive Studie den Lymphozytensubpopulationen, um die Persistenz und Migration der Spenderleukozyten zu untersuchen.<sup>258</sup> Das Ergebnis dieser Arbeit zeigte, dass vor Transplantation  $\alpha\beta$ -T-Zellen mit 94 % häufiger im peripheren Spenderblut auftraten im Vergleich zur Leber mit 75,5 %.<sup>258</sup> Dahingegen waren  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit 24,5 % vor allem in der Leber lokalisiert im Vergleich zum peripheren Spenderblut mit nur 6 %.<sup>258</sup> Im peripheren Empfängerblut blieben  $\alpha\beta$ -T-Zellen im Vergleich der Proben vor und 2 Stunden nach Reperfusion mit 87 % versus 92 % und  $\gamma\delta$ -T-Zellen mit 13 % versus 8 % relativ unverändert.<sup>258</sup> Während jedoch  $\alpha\beta$ -T-Zellen in der Leber im Vergleich vor Reperfusion und nach Transplantation mit 75,5 % versus 81,5 % dazu tendierten zuzunehmen, nahmen  $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Leber von 24,5 % auf 18,5 % ab, wobei das Signifikanzniveau mit einem p-Wert von jeweils 0,09 aber nicht erreicht wurde.<sup>258</sup> Damit wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Abnahme der  $\gamma\delta$ -T-Zellen sowohl im peripheren Blut als auch in der Leber auf einen Mechanismus der Rezirkulation von  $\gamma\delta$ -T-Zellen und der Abwanderung in andere lymphatische Organe hindeutet.<sup>258</sup> Diese Daten implementieren, dass die Anzahl von  $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Reperfusion in der Leber abnimmt, ohne jedoch eine Differenzierung in Transplantate mit beziehungsweise ohne histopathologischen IRS vorzunehmen. Diese Hypothese erklärt jedoch die Ergebnisse der hiesigen Dissertation. Denn  $\gamma\delta$ TCR-gefärbte Zellen der Leberstanzbiopsien waren 2 Stunden nach Reperfusion nur in einer spärlichen Anzahl nachweisbar, sodass eine Quantifizierung dieser nicht sinnvoll war (5.2.5.2).

Eine weitere Studie untersuchte T-Zellen auf deren transendotheliale Migrationskapazität hin.<sup>259</sup> Diesbezüglich wiesen  $CD4^-$ -T-Zellen eine größere Kapazität auf gegenüber  $CD4^+$ -T-Zellen, während  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>-T-Zellen die größte migratorische Kapazität zeigten, womit ein Eingriff in inflammatorische Prozesse, durch den Vorzug der intrinsischen Fähigkeit

über das Endothel zu migrieren, möglich ist.<sup>259</sup> Damit kann die Hypothese formuliert werden, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Inflammation im Rahmen eines transplantationsbedingten IRS in die Leber migrieren, wobei eine signifikante Infiltration zu einem späteren Zeitpunkt als 2 Stunden nach Reperfusion stattfindet.

### **Untergruppierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen entsprechend deren Zytokinmuster**

Eine sehr aufschlussreiche klinische Studie lieferte die Arbeitsgruppe um Caccamo et al.<sup>260</sup> mit vielen Parallelen bezüglich der dort beteiligten humanen Zellen zur hiesigen Zellpopulation des tierexperimentellen IRS. Diese Arbeitsgruppe analysierte periphere mononukleäre Blutzellen und die zerebrospinale Flüssigkeit von Kindern mit bakterieller Meningitis sowie Kontrollen mit nichtinflammatorischen neurologischen Erkrankungen.<sup>260</sup> Interessanterweise wurde dabei eine weitere Untergruppierung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen entsprechend dem Zytokinmuster in  $\gamma\delta 1$ -,  $\gamma\delta 2$ - und  $\gamma\delta 17$ -T-Zellen vorgenommen.<sup>261</sup> Dabei können sich, analog zu den  $\alpha\beta$ -T-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen in IFN- $\gamma$  ( $\gamma\delta 1$ -), IL-4 ( $\gamma\delta 2$ )<sup>261,262</sup>- und IL-17A ( $\gamma\delta 17$ )-produzierende Zellen<sup>263</sup> differenzieren. Ähnlich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, bei denen eine Fülle spezialisierter Subsets die Empfängerreaktion affektiert, können  $\gamma\delta$ -T-Zellen ohne Weiteres und rasch verschiedene Th1-, Th2-, Th17-, Th-follikuläre- und T-regulatorisch-ähnliche Effektorfunktionen übernehmen, darauf hindeutend, dass diese tiefgreifend zellvermittelte und humorale Immunreaktionen beeinflussen.<sup>261</sup>

### **TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, und IL-23 als IL-17-polarisierende Bedingung für eine hohe Expression von RORc**

In gesunden Erwachsenen exprimiert das hauptsächlich im Blut vorkommende  $\gamma\delta$ -T-Zellsubset den V $\gamma 9$ V $\delta 2$ -TCR und zeichnet sich durch pleiotrope Merkmale aus.<sup>260,264–266</sup> Die Arbeitsgruppe um Caccamo et al. konnte zeigen, dass die Häufigkeit zirkulierender IL-17<sup>+</sup>-V $\gamma 9$ V $\delta 2$ -T-Zellen in allen Patienten mit bakterieller Meningitis signifikant erhöht war im Vergleich zu den Kontrollen, wobei dieses Muster nach einer erfolgreichen antibakteriellen Therapie aufgehoben wurde.<sup>260</sup> Caccamo et al. fanden kaum IL-17-produzierende Zellen unter den V $\gamma 9$ V $\delta 2$ -T-Zellen im peripheren Blut gesunder Probanden auf kurzfristige Stimulation mit Antigen hin, wobei diese bei bakterieller Meningitis dann signifikant erhöht waren.<sup>260</sup> Zudem demonstrierte diese Arbeitsgruppe mittels Analyse humaner Zellkulturen, dass die Kokultur naiver V $\gamma 9$ V $\delta 2$ -T-Zellen mit Phosphoantigenen und den Zytokinen IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-6 und IL-23 zu einer selektiven Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t und einer Polarisierung in Richtung einer IL-17-Produktion führte.<sup>260</sup> So zeigte die Kultur naiver V $\gamma 9$ V $\delta 2$ -T-Zellen unter IL-17-polarisierten Bedingungen mit IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , IL-6 und IL-23 eine hohe Expression von RORc, wo-

hingegen die Expression von TBX-21 nur leicht oder gar nicht induziert wurde.<sup>260</sup> Eine andere Studie untersuchte den Effekt von IL-23 auf neonatale V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen, stimuliert via deren TCR, mit dem Ergebnis, dass neonatales IL-23, abgeleitet von dendritischen Zellen, die Generierung von V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen förderte, ausgestattet mit einer Reihe an zytotoxischen Mediatoren und verschiedenen IFN- $\gamma$ - und IL-17-produzierenden Subpopulationen.<sup>267</sup> Die Arbeitsgruppe um Eggenhofer et al. konnte im Rahmen des partiellen warmen IRS im Tiermodell demonstrieren, dass eine hohe Expression von IL-1 $\beta$  und IL-23 in Tieren mit induziertem IRS besteht.<sup>199</sup> Des Weiteren wurden IL-17 und IL-23 im Zusammenhang mit der akuten Abstoßungsreaktion nach LTx erwähnt und wurden mit einer Beteiligung von Th17-Zellen in Zusammenhang gebracht,<sup>268</sup> womit diese Zytokine im Rahmen der Differenzierung von T-Zellen in IL-17-produzierende Effektorzellen nicht nur beim IRS eine Rolle spielen.

### **Untergeordnete Rolle von IFN- $\gamma$ im Rahmen der Differenzierung zu $\gamma\delta$ 17-T-Zellen**

Eine weitere Übereinstimmung ergibt sich in Bezug auf die Tatsache, dass IFN- $\gamma$ -produzierende Zellen, wie beispielsweise Th1-Zellen, keine Rolle im Rahmen des IRS im Tiermodell spielen (5.1.4). So teilte auch die Arbeitsgruppe um Caccamo et al. die Ansicht, dass die Differenzierung zu  $\gamma\delta$ 17-T-Zellen auf hohem Level der RORc- und Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Expression beruht gegenüber einem niedrigen Level der T-bet-Expression in diesen Zellen.<sup>260</sup> T-bet stellt den Th1-Transkriptionsfaktor dar, der im humanen Setting TBX-21 entspricht, für den sich in der hiesigen humanen Analyse keine wegweisenden Ergebnisse in Richtung eines Zusammenhangs mit dem IRS ergeben (5.2.6.3). Analog der Rolle des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t beim IRS im Tiermodell (5.1.3) und auch der wahrscheinlichen Beteiligung im Rahmen des transplantationsassoziierten humanen IRS (5.2.6.3) zeigt sich eine Beteiligung von RORc somit auch im Setting der bakteriellen Meningitis<sup>260</sup>.

### **Bedeutung der CD27-Negativität der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der TCR-Bindung**

Weitere Analysen von Caccamo et al. ergaben, dass IL-17<sup>+</sup>-V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen einen prädominierenden, terminal differenzierten CD27<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>-Phänotyp haben.<sup>260</sup> Die Arbeitsgruppe um Ribot et al. zeigte mittels der Analyse im Tiermodell, dass die meisten  $\gamma\delta$ -T-Zellen das TNF-Rezeptor-Familienmitglied CD27 exprimieren und IFN- $\gamma$  produzieren, wohingegen die IL-17-Produktion auf CD27<sup>-</sup> $\gamma\delta$ -T-Zellen beschränkt ist.<sup>208</sup>

Im Mausexperiment von Sutton et al. konnte gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$ -T-Zellen IL-23R und den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t exprimieren und IL-17, IL-21 und IL-22 als Reaktion auf IL-1 $\beta$  und IL-23 ohne TCR-Bindung produzieren.<sup>146</sup> Im Gegensatz zu dieser Studie

fand die Arbeitsgruppe um Caccamo et al. aber heraus, dass die TCR-Bindung für die Differenzierung humaner IL-17<sup>+</sup>-V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen notwendig ist.<sup>260</sup> Somit scheinen bezüglich der TCR-Bindung Unterschiede im Tierexperiment und im humanen Setting zu bestehen. Folglich ist die Entschlüsselung der relativen Funktionen der Zytokine und der TCR-abhängigen oder TCR-unabhängigen Aktivierung humaner IL-17<sup>+</sup>-V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T-Zellen und deren Rolle in protektiven Immunreaktionen oder -pathologien eine große Herausforderung für deren potenziellen Nutzen im klinischen Setting.<sup>260</sup>

Zusammenfassend existieren also einige Parallelen der detektierten T-Zellen der bakteriellen Meningitis im menschlichen Organismus<sup>260</sup> zu den T-Zellen der hiesigen IRS-Erforschung in Bezug auf den  $\gamma\delta$ TCR, die IL-17-Produktion, den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t, die Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-23 sowie die CD27-Negativität (5.1.4). Diese Tatsache demonstriert, dass die im Tiermodell detektierten Zellen auch im menschlichen Organismus existieren und möglicherweise eine Rolle im Rahmen von Entzündungsprozessen, wie zum Beispiel dem IRS bei der humanen orthotopen LTx, spielen.

Diese Dissertationsschrift demonstriert in einem Tiermodell des partiellen warmen IRS, dass CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen und unkonventionelle IFN- $\gamma$ NK1.1<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>- $\gamma\delta$ -T-Zellen in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t über einen IL-17A-bedingten Mechanismus den IRS vorantreiben (5.1.4). In Anlehnung daran zeigen die Ergebnisse des IRS im humanen Setting eine Überexpression von CD3, RORc und TCR $\gamma$ , wobei TCR $\gamma$  bei Patienten mit IRS im Mittel nach Reperfusion sogar signifikant höher ist im Vergleich zu Patienten ohne IRS (5.2.6.3). Dabei scheint TBX-21 keine Rolle zu spielen (5.2.6.3). Diese Forschung zeigt als Erste, dass der histopathologische IRS bei der humanen LTx mit erhöhten Expressionslevel für CD3, TCR $\gamma$  und RORc bereits 2 Stunden nach Reperfusion einhergeht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass transplantatinfiltrierende IRS-vermittelnde CD3<sup>+</sup>-T-Zellen höchstwahrscheinlich vielmehr unkonventionelle RORc<sup>+</sup>- $\gamma\delta$ -T-Zellen sind als konventionelle CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen. Ferner kann eine starke Tendenz zu höheren Expressionslevel IRS-bezogener Zytokine und Chemokine, wie TNF- $\alpha$  und CXCL-1, der humanen IRS-Proben im Vergleich zu Proben mit abwesendem IRS verzeichnet werden, wobei CXCL-1 in der Biopsie vor Reperfusion bei Patienten mit IRS sogar signifikant erhöht ist (5.2.6.2). Überraschenderweise offenbart die detaillierte Expressionsanalyse, dass das Th1-bezogene Schlüsselmolekül TBX-21 in IRS-Patienten im Vergleich zu Nicht-IRS-Patienten nicht unterschiedlich exprimiert wird (5.2.6.3). Dabei wird TBX-21 in den meisten LTx-Proben nicht in relevanten Mengen exprimiert, was das Argument gegen die These unterstützt, dass TBX-21<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen eine Rolle bei dem akuten IRS nachfolgend der humanen LTx spielen. Dieses Argument steht Studien gegenüber, die implizieren, dass STAT-4<sup>+</sup>-Th1-Zellen die Schlüssel-T-Zelluntergruppe

darstellen,<sup>137</sup> die verantwortlich für die Initiierung und Verstärkung des hepatischen IRS mittels TIM-vermittelter T-Zell-Kupfferzell-Interaktionen<sup>138</sup> und Freisetzung von IFN- $\gamma$ <sup>137</sup> sind. Stattdessen wird im Rahmen dieser Dissertationsschrift gezeigt, dass der Th17-kennzeichnende Transkriptionsfaktor RORc neben dem TCR $\gamma$ -Genloкус, der die  $\gamma$ -Kette des  $\gamma\delta$ TCR kodiert, in LTx-Biopsien von IRS-Patienten nach Reperfusion überexprimiert wird, was darauf hindeutet, dass TBX-21<sup>-</sup>RORc<sup>+</sup>TCR $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen die Haupteffektorzellen bei dem IRS im Rahmen der humanen LTx darstellen.

Problematisch ist bei der Vergleichbarkeit der Ergebnisse des Tiermodells mit denen der humanen Proben, dass im Mausmodell die ischämische Phase konstant 90 Minuten betrug und der Zeitpunkt 24 Stunden nach Reperfusion betrachtet wurde. Dahingegen ist der Zeitraum der ischämischen Phase im humanen Setting variabel. Überdies wurde im Rahmen der klinischen Studie die zweite Biopsie bereits etwa 2 Stunden nach Reperfusion entnommen und damit ein deutlich früherer Zeitpunkt nach Reperfusion untersucht als im Tiermodell. Auf der anderen Seite könnten damit die häufig nur tendenziell veränderten und nicht signifikanten Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse dahingehend erklärt werden, dass der Zeitpunkt der Entnahme der zweiten Biopsie zu früh ist, um signifikante Unterschiede zu detektieren. Diesbezüglich könnten die 2nd-Look-Biopsien herangezogen werden, die aber zum einen mit dem Entnahmezeitraum von 1–2 Tagen nach Transplantation schon zu spät sein könnten, um die akute Zellinfiltration zu detektieren. Zum anderen besteht die Problematik darin, dass nicht von allen Patienten 2nd-Look-Biopsien entnommen und untersucht wurden und dadurch die Vergleichbarkeit aufgrund der geringen Probenanzahl eingeschränkt ist. Generell bedarf es zudem einer Betrachtung einer größeren Menge an Patienten, um gegebenenfalls signifikante Unterschiede feststellen zu können. In Bezug auf die vermutlich fehlende Beteiligung CD4<sup>+</sup>-T-Zellen am IRS könnten weitere Analysen angeschlossen werden, die speziell den Oberflächenrezeptor CD4 und das Zytokin IFN- $\gamma$  in humanen Proben untersuchen. Außerdem wurde bei der Analyse der humanen Proben auch die Rolle der im Tiermodell untersuchten Faktoren NK1.1, CD8, CD27 und IL-17 außen vor gelassen. Die Analyse dieser Faktoren könnte für die weitere Differenzierung der TBX-21<sup>-</sup>RORc<sup>+</sup>TCR $\gamma$ <sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>-T-Zellen im humanen Setting angeschlossen werden.

### 6.3 Ausblick

Da eine Vielfalt an Faktoren die IRS-Entstehung beeinflusst, existieren verschiedenste Ansätze potenzieller therapeutischer Möglichkeiten. Beispielsweise kann die Korrektur von Elektrolytstörungen des Spenders als Ansatzpunkt einer verbesserten Transplantatfunktion dienen. Die hiesigen Ergebnisse zeigen, dass hohe Spendernatriumwerte signifikant mit einer hohen IRS-Prävalenz assoziiert sind (5.2.2.3). Diesbezüglich ergab eine Pilotstudie an der Universität von Kalifornien einen protektiven Effekt der Infusion 5%iger Dextrose in Wasser über die Vena mesenterica inferior der Spender, die Natriumspiegel über 160 mmol/l aufwiesen, um das Serumnatrium auf unter 155 mmol/l zu reduzieren.<sup>7</sup> In den 17 Spendern, die diese Infusion zur Reduktion der Hypernatriämie bekamen, traten keine verspäteten und primären Nichtfunktionen auf im Vergleich zu einer historischen Kontrollgruppe, die eine 60%ige Inzidenz verspäteter und primärer Nichtfunktionen zeigte.<sup>7</sup> Daneben werden vor allem auch immunmodulierende Therapieansätze verfolgt. Ein potenzieller Nutzen könnte dabei beispielsweise aus der Spenderbehandlung mit Katecholaminen resultieren, von denen angenommen wird, dass sie einen modulierenden Effekt auf inflammatorische Reaktionen des Immunsystems ausüben<sup>222, 223</sup>. In tierexperimentellen und humanen Studien wird zudem nicht nur der Versuch unternommen, die Einflüsse von Prostaglandinen, Zytokinen sowie weiteren Faktoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems zu verändern, sondern auch durch den Einsatz immunsuppressiver Strategien einen therapeutischen Effekt auf den IRS zu erzielen.

#### Modulation des Immunsystems

Im Tierversuch zeigte niedrigdosiertes TNF- $\alpha$  paradoxerweise einen protektiven Effekt gegenüber dem IRS, der damit begründet wird, dass durch die exogene Zufuhr von TNF- $\alpha$  die TNF- $\alpha$ -Freisetzung während des IRS vermindert wird, was dann in einer Reduktion von oxidativem Stress und entzündlichen Vorgängen resultiert.<sup>269</sup> Ferner hemmen TNF- $\alpha$ -Antikörper die Leberregeneration im Rahmen der partiellen Hepatektomie, was darauf hindeutet, dass TNF- $\alpha$  die Leberregeneration unter diesen Bedingungen fördert.<sup>270</sup> Es bestehen Hinweise darauf, dass der PAF als Schlüsselmediator der Induktion von Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  und CINC, fungiert und damit neutrophile Granulozyten aktiviert.<sup>115</sup> Der PAF wird von Thrombozyten,<sup>271</sup> Kupfferzellen<sup>272</sup>, neutrophilen Granulozyten<sup>271</sup> und Endothelzellen<sup>273</sup> freigesetzt. Im Tiermodell wurde ein protektiver Effekt von PAF-Antagonisten mit einer geringeren Infiltration neutrophiler Granulozyten gezeigt.<sup>274</sup>

Ebenso wurden bereits im Rahmen klinischer Studien durch den Einsatz von Prostaglandinen Erfolge erzielt. Während Prostaglandin-E<sub>1</sub> in klinischen Studien zur Therapie der primären Nichtfunktion in 80 % der Fälle ein Transplantatüberleben herbeiführte im Vergleich zu den 17 % der unbehandelten Gruppe,<sup>275</sup> zeigten andere Studien keinen Effekt auf die primäre Nichtfunktion, jedoch signifikant kürzere intensivmedizinische Aufenthalte<sup>276,277</sup>. Interessanterweise zeigte eine prospektive Studie, die Spender mit Prostaglandin-I<sub>2</sub> (Epoprostenol) vor der kalten Perfusion behandelte, eine Reduktion des IRS und der Lebertransaminasen.<sup>278</sup>

Das Komplementsystem als Teil des angeborenen Immunsystems hat unter anderem die Aufgabe Leukozyten zu rekrutieren und zu aktivieren.<sup>57</sup> Im Rahmen der klassischen Aktivierung der Komplementkaskade durch Antigen-Antikörper-Komplexe kommt es zur Formation eines Membranangriffkomplexes, der den nachfolgenden Zelltod herbeiführt.<sup>57</sup> Im Tierversuch konnten durch die Inhibition des Komplementsystems eine Verbesserung der Mikrozirkulation, eine Reduktion der Akkumulation neutrophiler Granulozyten und der Kupfferzellaktivierung sowie ein verminderter Parenchymschaden erreicht werden.<sup>279</sup> Des Weiteren konnten im Tierversuch die Kupfferzellen dahingehend beeinflusst werden, dass Gadoliniumchlorid die Kupfferzellfunktion inhibiert und den Sinusendothelzellschaden vermindert.<sup>280</sup> In einem weiteren Tierversuch wurde sogar der Einfluss der Spendervorbehandlung mit Gadoliniumchlorid auf die LTx untersucht, mit dem Ergebnis einer Reduktion des IRS, gemessen an histologischen Parametern, GPT-Spiegeln und der Blutzirkulation.<sup>281</sup>

Die Infiltration von Immunzellen des erworbenen Immunsystems nimmt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des IRS ein und wird unter anderem durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Das LFA-1 wird als CD11a/CD18-Heterodimer auf der Oberfläche von Lymphozyten und Monozyten exprimiert und vermittelt die Leukozytenadhäsion durch Bindung an ICAM-1 und ICAM-2 auf der konjugierenden Zelle.<sup>282,283</sup> ICAM-1 wird auf Kupfferzellen, Sinusendothelzellen und Hepatozyten exprimiert.<sup>284</sup> Interessanterweise korrelierte die ICAM-1-Expression mit dem Ausmaß des Postreperfusionsschadens, gemessen an histologischen Veränderungen.<sup>285</sup> In einer tierexperimentellen Studie wurde der histologische Leberschaden durch Einsatz monoklonaler Antikörper gegen ICAM-1 vermindert.<sup>286</sup> Ferner demonstrierte eine weitere Studie bei Einsatz von Antikörpern gegen ICAM-1 und LFA-1 eine bessere Überlebensrate als bei alleinigem Einsatz von Antikörpern gegen ICAM-1.<sup>287</sup>

## Einsatz von Immunsuppressiva und Digoxin als potenzielles Therapeutikum

Immunsuppressiva kommen nicht nur zur Prävention von Abstoßungsreaktionen zum Einsatz, sondern werden zunehmend auch im Hinblick auf einen IRS bewertet. Yamashita et al. setzten im Rahmen einer prospektiven randomisierten Studie die präoperative intravenöse Applikation von 500 mg Methylprednisolon ein.<sup>288</sup> Dabei zeigte sich eine Reduktion inflammatorischer Zytokine, wie IL-6, eine Reduktion von C-reaktivem Protein, eine Erhöhung antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-10, und eine Prävention vor postoperativen Bilirubinerhöhungen.<sup>288</sup> Auch Kotsch et al. demonstrierten in einer prospektiven randomisierten Studie durch die Spenderbehandlung mit Methylprednisolon beispielsweise eine Reduktion von IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1 und MHC-II, resultierend in einem verminderten IRS und einer geringeren Inzidenz akuter Abstoßungsreaktionen.<sup>224</sup> Initial dachte man, dass der Calcineurininhibitor Tacrolimus eine konservierende Funktion neben seiner hauptsächlich immunsuppressiven Funktion einnehmen könnte.<sup>129</sup> Denn Tacrolimus verbessert die Mikrozirkulation<sup>289</sup> und vermindert zelluläres Calcium<sup>290</sup>. Die Spülung der humanen Leber mit Tacrolimus vor der Transplantation zeigte eine bessere frühe Transplantatfunktion und einen verminderten hepatozellulären Schaden nach Reperfusion.<sup>291</sup> Allerdings detektierte eine randomisierte kontrollierte Studie bei intrahepatischer Applikation von Tacrolimus keine Reduktion der Lebertransaminasen innerhalb der ersten Woche nach Transplantation im Vergleich zur Placebogruppe.<sup>292</sup> In einer prospektiven multizentrischen Studie zur Behandlung des IRS in marginalen Organen wurde eine zunächst vielversprechende Ex-vivo-Tacrolimusperfusion von ECD-Lebern versucht,<sup>293</sup> die jedoch die postoperativen GPT-Spiegel im Vergleich zu Kontrollen nicht reduzierte und sogar die GOT-Spiegel erhöhte, womit eine Tacrolimusperfusion von ECD-Lebern nicht geeignet ist<sup>294</sup>.

FTY720, auch als Fingolimod bezeichnet, ist ein neuer Immunmodulator, der bei einer Vielzahl solider Organtransplantationen eingesetzt wird<sup>295</sup> und dessen Wirksamkeit auf einer Sequestration peripherer T-Lymphozyten in sekundär lymphatische Organe beruht<sup>296</sup>. Im Tiermodell verbesserte FTY720 biochemische und histologische Parameter des IRS und sorgte für ein verlängertes Überleben.<sup>297</sup> Daneben stellt Sotrastaurin ein neues Immunsuppressivum dar, das gezielt die Pan-Protein-Kinase-C inhibiert und damit die frühe T-Zellaktivierung via Calcineurin-unabhängigem Signalweg verhindert.<sup>298</sup> In einem tierexperimentellen Modell der orthotopen LTx zeigten sich bei Einsatz von Sotrastaurin ein verbessertes Überleben, ein verminderter hepatozellulärer Schaden und verbesserte histologische Merkmale.<sup>299</sup>

Die Arbeitsgruppe um Eggenhofer et al. machte die Entdeckung, dass ROR $\gamma$ t-abhängige  $\gamma\delta$ - und DN-T-Zellen die hauptsächlichen IL-17-produzierenden Effektorzellen des IRS im Tiermodell darstellen.<sup>199</sup> Der dort demonstrierte, erfolgreiche Einsatz des kardialen Glykosids Digoxin,<sup>199</sup> das an die ligandenbindende Domäne von ROR $\gamma$ t andockt, wodurch dessen Aktivität gehemmt wird<sup>214</sup>, stellt eine potenzielle therapeutische Intervention des humanen IRS im Rahmen der LTx dar. Da Digoxin in hohen Konzentrationen für menschliche Zellen toxisch ist, könnte die therapeutische Verwendung nicht toxischer, synthetischer Derivate, von denen gezeigt wurde, dass sie humane CD4<sup>+</sup>-Th17-Zellen hemmen,<sup>214</sup> eine mögliche therapeutische Option darstellen, um unkonventionelle IL-17A-produzierende ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-T-Zellen beim IRS zu beeinflussen. Es könnte alternativ ein therapeutischer Ansatz auf ein kurzes perioperatives Zeitfenster der Behandlung reduziert werden, um die medikamentenbezogenen Nebenwirkungen zu vermindern. Darüber hinaus konnten basierend auf den Ergebnissen dieser Dissertation bereits weitere Erkenntnisse getroffen werden. So zeigten ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>, IL-22-produzierende NKp46<sup>+</sup>-Zellen einen protektiven Effekt auf den IRS in Mäusen.<sup>300</sup> Möglicherweise dienen diese Zellen dazu, die proinflammatorischen Effekte der unkonventionellen, IL-17-produzierenden ROR $\gamma$ t<sup>+</sup>-Zellen zu kompensieren.<sup>300</sup>

Zusammenfassend besteht eine Vielfalt an Therapieansätzen, den Pathomechanismus des hepatischen IRS zu beeinflussen. Häufig sind die zugrunde liegenden Mechanismen zwar im Tiermodell untersucht, jedoch fehlt die klinische Evidenz, diese Ansätze standardisiert in der humanen Transplantationsmedizin einzusetzen. Auf der anderen Seite wird mit wachsendem Know-how im Hinblick auf den tierexperimentellen und humanen, hepatischen IRS die Durchführung klinischer Studien zunehmend möglich. Gleichwohl hofft man darauf, dass durch das Verständnis des Mechanismus des frühen IRS eine spezifischere Therapie verantwortlicher Zellpopulationen mit weniger begleitenden Nebenwirkungen ermöglicht wird. Von diesem Ansatz könnten Empfänger von Lebertransplantaten genauso wie Patienten mit IRS in anderen Organen oder Geweben profitieren.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Dissertationsschrift wird die Rolle der im Mausmodell identifizierten T-Zellsubpopulationen im Rahmen des frühen IRS bei der humanen orthotopen LTx erforscht. Dabei werden auch die Kriterien der Marginalität im Zusammenhang mit dem IRS analysiert.

Die fachkundige histopathologische Befundung der Leberstanzbiopsien, die von 46 Patienten vor und etwa 2 Stunden nach Reperfusion entnommen wurden, ergibt, dass in 63 % der Fälle ein früher IRS bereits 2 Stunden nach Reperfusion vorliegt. Außerdem wurde entsprechend den von Eurotransplant definierten Kriterien in etwa 54 % der Fälle ein marginales Transplantat alloziert. Diesbezüglich entwickeln Transplantate von Spendern mit hohem BMI, über 30%iger hepatischer Steatose sowie hohem Serumnatrium signifikant häufiger einen IRS. Damit stellt der IRS vor dem Hintergrund des vorherrschenden Organmangels mit der Folge einer vermehrten Allokation marginaler Organe ein zentrales Problem dar. In Anlehnung daran versterben Empfänger mit marginalem Organ signifikant häufiger und weisen signifikant schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeiten auf im Gegensatz zu Patienten mit nicht marginalem Transplantat. Zudem treten Abstoßungsreaktionen und Re-LTx gehäuft in der Gruppe der Patienten mit IRS auf. Interessanterweise weisen Patienten mit marginalem Lebertransplantat bei zusätzlicher Entwicklung eines IRS deutlich schlechtere Überlebensraten auf als Patienten ohne IRS. Demnach beträgt die 1-Jahresüberlebensrate innerhalb der Gruppe der Patienten mit marginalem Transplantat bei abwesendem IRS 75 % im Vergleich zu 51 % bei Vorhandensein eines IRS. Demgegenüber spielt es innerhalb der Gruppe der Patienten mit nicht marginalem Transplantat für das Überleben kaum eine Rolle, ob ein IRS an- oder abwesend ist. Des Weiteren ergibt die Analyse der Spenderkriterien, dass männliche Spenderorgane signifikant häufiger einen IRS entwickeln und der IRS mit einer signifikant erhöhten  $\gamma$ -GT und Glucose sowie erniedrigter CKMB des Spenders einhergeht. Im Hinblick auf das Empfängerprofil zeigt sich, dass Patienten, die zuvor mittels Nierenerersatzverfahren behandelt wurden, signifikant häufiger einen IRS entwickeln. Außerdem manifestiert sich der IRS bereits frühzeitig in der ersten Woche nach Transplantation in Form von signifikant schlechteren laborchemischen Verläufen. So weisen marginale Transplantate mit IRS einen höheren Leberzellschaden, gemessen anhand von GPT, GOT und GLDH, eine verminderte hepatische Syntheseleistung, demonstriert anhand von Faktor V, sowie ein höheres Level des Cholestaseparameters Bilirubin auf. Anhand der Überlebensdaten und des Verlaufs nach Transplantation wird die klinische Relevanz

des IRS bei der orthotopen LTx insbesondere im Hinblick auf den vorherrschenden Organmangel ersichtlich.

Diese Dissertationsschrift analysiert anhand eines Tiermodells des partiellen warmen 90-minütigen IRS mithilfe histologischer, molekularbiologischer und durchflusszytometrischer Methoden die beim hepatischen IRS involvierten Zellpopulationen. Es zeigt sich, dass 24 Stunden nach Reperfusion unkonventionelle  $\text{IFN-}\gamma\text{-NK1.1}^-\text{CD27}^-\gamma\delta\text{TCR}^+\text{CD3}^+$ -T-Zellen und  $\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD3}^+$ -T-Zellen, sogenannte DN-T-Zellen, in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t über einen IL-17A-bedingten Mechanismus den IRS vorantreiben. Dabei sind das IRS-spezifische Zytokin TNF- $\alpha$  und das Chemokin CXCL-1 bei Tieren mit induziertem IRS signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrolltieren. Somit scheinen entgegen der bisherigen Annahme  $\text{CD4}^+$ -Th17- und  $\text{CD4}^+$ -Th1-Zellen nicht in den Prozess des IRS im Tiermodell involviert zu sein.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit lautet, ob die im Tiermodell involvierten Faktoren gleichermaßen im Rahmen des IRS der humanen LTx eine Rolle spielen. Die histologische Quantifizierung ergibt im Mittel eine höhere  $\text{CD3}^+$ -Zellinfiltration in marginale Transplantate mit IRS gegenüber nicht marginalen Transplantaten ohne IRS. In Anlehnung daran demonstriert die mRNA-Genexpressionsanalyse, dass der IRS und die Marginalität von Organen mit erhöhten Level des Oberflächenrezeptors CD3 einhergehen. Neben dem Th1-kennzeichnenden Transkriptionsfaktor TBX-21 wurden der im Tiermodell detektierte IRS-effektorzellvermittelnde Transkriptionsfaktor RORc und der TCR $\gamma$  analysiert. Während der IRS und die Marginalität von Organen offenbar keinen Einfluss auf die Höhe des TBX-21 haben, zeigen sich in den Biopsien mit IRS vor und nach Reperfusion im Vergleich zu Biopsien ohne IRS höhere RORc-Expressionslevel. Ferner ist RORc in den Biopsien marginaler Transplantate vor und nach Reperfusion überexprimiert im Vergleich zu nicht marginalen Transplantaten. Überraschenderweise ist eine histologische Quantifizierung der Infiltration  $\gamma\delta\text{TCR}^+$ -Zellen 2 Stunden nach Reperfusion aufgrund einer zu geringen Infiltration nicht möglich. Dennoch zeigen Transplantate mit IRS nach Reperfusion signifikant höhere mRNA-Expressionslevel des TCR $\gamma$ -Genlokus, der die  $\gamma$ -Kette des  $\gamma\delta\text{TCR}$  kodiert, im Vergleich zu Organen in Abwesenheit eines IRS. Dabei exprimieren marginale Organe bei zusätzlicher Entwicklung eines IRS verstärkt TCR $\gamma$  im Vergleich zum Ausbleiben eines IRS. Darüber hinaus sind TNF- $\alpha$  und CXCL-1 ebenfalls in Biopsien mit IRS erhöht, wobei CXCL-1 in der Biopsie vor Reperfusion im Mittel sogar signifikant höher ist im Vergleich zu Biopsien ohne IRS. Somit agieren möglicherweise  $\text{TBX-21}^+\text{RORc}^+\text{TCR}\gamma^+\text{CD3}^+$ -T-Zellen als die Haupteffektorzellen beim humanen, hepatischen IRS als Pendant zu den ROR $\gamma$ t-abhängigen  $\text{IFN-}\gamma\text{-NK1.1}^-\text{CD27}^-\text{CD3}^+$ - $\gamma\delta\text{TCR}^+$ - und  $\text{CD4}^-\text{CD8}^-\text{CD3}^+$ -T-Zellen im Tiermodell.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 *Toledo-Pereyra LH, Simmons RL, Najarian JS.* Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *Am. J. Surg.* 1975; 129(5): 513–517.
- 2 *Teoh NC, Farrell GC.* Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 18(8): 891–902.
- 3 *Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW.* Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant. Proc.* 2005; 37(4): 1653–1656.
- 4 *Birrer R, Takuda Y, Takara T.* Hypoxic hepatopathy: pathophysiology and prognosis. *Intern. Med.* 2007; 46(14): 1063–1070.
- 5 *Rushing GD, Britt LD.* Reperfusion injury after hemorrhage: a collective review. *Ann. Surg.* 2008; 247(6): 929–937.
- 6 *Kim YI.* Ischemia-reperfusion injury of the human liver during hepatic resection. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 2003; 10(3): 195–199.
- 7 *Busuttil RW, Tanaka K.* The utility of marginal donors in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003; 9(7): 651–663.
- 8 *Howard TK, Klintmalm GB, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA.* The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation* 1990; 49(1): 103–107.
- 9 *Henderson JM.* Liver transplantation and rejection: an overview. *Hepatogastroenterology* 1999; 46 Suppl 2: 1482–1484.
- 10 *Lemasters JJ, Thurman RG.* Reperfusion injury after liver preservation for transplantation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37: 327–338.
- 11 *Deutsche Stiftung Organtransplantation.* Organspende und Transplantation in Deutschland, Jahresbericht 2013. Frankfurt am Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation 2014; 126S.
- 12 *Ferraz-Neto BH, Afonso RC, Leitão R, Macedo CP, Parra OM, Goehler F, Silva ED.* Liver transplantation using "refused grafts": analysis of initial function and survival. *Transplant. Proc.* 2002; 34(2): 521–522.
- 13 *Hałoń A, Patrzalek D, Rabczyński J.* Hepatic steatosis in liver transplant donors: rare phenomenon or common feature of donor population? *Transplant. Proc.* 2006; 38(1): 193–195.
- 14 *Afonso RC, Saad WA, Parra OM, Leitão R, Ferraz-Neto BH.* Impact of steatotic grafts on initial function and prognosis after liver transplantation. *Transplant. Proc.* 2004; 36(4): 909–911.
- 15 *Boros P, Bromberg JS.* New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Transplant.* 2006; 6(4): 652–658.

- 16 *Woodruff MF*. The transplantation of tissues and organs. Springfield, Illinois, USA: Charles C. Thomas 1960; 617S.
- 17 *Starzl TE, Murase N, Marcos A, Fung JJ*. History of liver and multivisceral transplantation. In: Busutil RW, Klintmalm GB, Hrsg. Transplantation of the liver. 2. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania, USA: W.B. Saunders Company 2005; 3–22.
- 18 *Welch CS*. A note on transplantation of the whole liver in dogs. *Transplant. Bull.* 1955; 2: 54–55.
- 19 *Starzl TE, Fung JJ*. Themes of liver transplantation. *Hepatology* 2010; 51(6): 1869–1884.
- 20 *Starzl TE, Marchioro TL, von Kaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR*. Homotransplantation of the liver in humans. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1963; 117: 659–676.
- 21 *National Institutes of Health*. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: liver transplantation – June 20–23, 1983. *Hepatology* 1984; 4(1 Suppl): 107S–110S.
- 22 *European Liver Transplant Registry*. Pediatric transplantation. Indication in 0–2 yrs patients. Indication in 2–18 yrs patients. Villejuif Cedex, Frankreich: European Liver Transplant Registry. URL: <http://www.eltr.org/Pediatric-transplantation.html>; Zugriff: 18.4.2017.
- 23 *Thies J, Moench C*. Lebertransplantation. In: Riemann JF, Fischbach W, Galle PR, Moessner J, Hrsg. Gastroenterologie: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis. Band 2: Leber, Galle, Pankreas. 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2010; 1568–1584.
- 24 *European Liver Transplant Registry*. Overall indication and results. Primary disease leading to LT in europe. Villejuif Cedex, Frankreich: European Liver Transplant Registry. URL: <http://www.eltr.org/Overall-indication-and-results.html>; Zugriff: 18.4.2017.
- 25 *European Liver Transplant Registry*. Specific results by disease. Cirrhosis as primary disease. Villejuif Cedex, Frankreich: European Liver Transplant Registry. URL: <http://www.eltr.org/Specific-results-by-disease.html>; Zugriff: 18.4.2017.
- 26 *Deutsche Stiftung Organtransplantation*. Organspende und Transplantation in Deutschland, Jahresbericht 2012. Frankfurt am Main: Deutsche Stiftung Organtransplantation 2013; 50S.
- 27 *Bader M*. Entwicklungsbedingungen in der Anfangszeit. In: Organmangel und Organverteilung. 1. Aufl. Tübingen: Mohr Siebeck GmbH & Co. KG 2010; 79.
- 28 *Rahmel A*. Eurotransplant und die Organverteilung in Deutschland. In: Krukemeyer MG, Lison AE, Hrsg. Transplantationsmedizin. Ein Leitfaden für den Praktiker. 1. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter GmbH Co. KG 2006; 65–80.
- 29 *Eurotransplant International Foundation*. About Eurotransplant. History. Leiden, Niederlande: Eurotransplant International Foundation. URL: <http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=history>; Zugriff: 19.4.2017.

- 30 *Eurotransplant International Foundation*. Cooperation. Eurotransplant region. Leiden, Nederlande: Eurotransplant International Foundation. URL: [http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=et\\_region](http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=et_region); Zugriff: 19.4.2017.
- 31 *Persijn GG, Cohen B; Eurotransplant International Foundation*. Annual report 2000. Den Haag, Nederlande: CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek 2001; 88S.
- 32 *Oosterlee A, Rahmel A, van Zwet W; Eurotransplant International Foundation*. Annual report 2006. Den Haag, Nederlande: CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek 2007; 54S.
- 33 *Jung GE, Encke J, Schmidt J, Rahmel A*. [Model for end-stage liver disease. New basis of allocation for liver transplantations.] *Chirurg* 2008; 79(2): 157–163. Deutsch.
- 34 *Eurotransplant International Foundation*. Chapter 5. ET liver allocation system (ELAS). In: *Eurotransplant Manual – version 4.0*. Leiden, Nederlande: Eurotransplant International Foundation 2013; 98S.
- 35 *Freeman RB Jr, Wiesner RH, Harper A, McDiarmid SV, Lake J, Edwards E, Merion R, Wolfe R, Turcotte J, Teperman L; UNOS/OPTN Liver Disease Severity Score, UNOS/OPTN Liver and Intestine, and UNOS/OPTN Pediatric Transplantation Committees*. The new liver allocation system: moving toward evidence-based transplantation policy. *Liver Transpl.* 2002; 8(9): 851–858.
- 36 *Biggins SW, Bambha K*. MELD-based liver allocation: who is underserved? *Semin. Liver Dis.* 2006; 26(3): 211–220.
- 37 *Freeman RB Jr, Wiesner RH, Roberts JP, McDiarmid S, Dykstra DM, Merion RM*. Improving liver allocation: MELD and PELD. *Am. J. Transplant.* 2004; 4 Suppl 9: 114–131.
- 38 *McDiarmid SV, Anand R, Lindblad AS; Principal Investigators and Institutions of the Studies of Pediatric Liver Transplantation (SPLIT) Research Group*. Development of a pediatric end-stage liver disease score to predict poor outcome in children awaiting liver transplantation. *Transplantation* 2002; 74(2): 173–181.
- 39 *Freeman RB, Harper A, Edwards EB*. Excellent liver transplant survival rates under the MELD/PELD system. *Transplant. Proc.* 2005; 37(2): 585–588.
- 40 *Cohen B, Persijn G, De Meester J; Eurotransplant International Foundation*. Annual report 1995. Den Haag, Nederlande: CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek 1996; 70S.
- 41 *Rahmel A; Eurotransplant International Foundation*. Annual report 2013. Den Haag, Nederlande: CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek 2014; 156S.
- 42 *Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Cherqui D, Alonso EA, Woodle IS, Vogelbach P, Busse-Henry SM, Zucker AR, Broelsch CE*. Transplantation of two patients with one liver. Analysis of a preliminary experience with 'split-liver' grafting. *Ann. Surg.* 1990; 212(1): 14–22.
- 43 *Broelsch CE, Whittington PF, Emond JC, Heffron TG, Thistlethwaite JR, Stevens L, Piper J, Whittington SH, Lichtor JL*. Liver transplantation in children from living related donors. Surgical techniques and results. *Ann. Surg.* 1991; 214(4): 428–439.

- 44 *Ericzon B, Larsson M, Wilczek HE.* Domino liver transplantation: risks and benefits. *Transplant. Proc.* 2008; 40(4): 1130–1131.
- 45 *Weiss S, Kotsch K, Francuski M, Reutzel-Selke A, Mantouvalou L, Klemz R, Kuecuk O, Jonas S, Wesslau C, Ulrich F, Pascher A, Volk HD, Tullius SG, Neuhaus P, Pratschke J.* Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2007; 7(6): 1584–1593.
- 46 *Barshes NR, Horwitz IB, Franzini L, Vierling JM, Goss JA.* Waitlist mortality decreases with increased use of extended criteria donor liver grafts at adult liver transplant centers. *Am. J. Transplant.* 2007; 7(5): 1265–1270.
- 47 *Blok JJ, Braat AE, Adam R, Burroughs AK, Putter H, Kooreman NG, Rahmel AO, Porte RJ, Rogiers X, Ringers J.* Validation of the donor risk index in orthotopic liver transplantation within the Eurotransplant region. *Liver Transpl.* 2012; 18(1): 113–120.
- 48 *Bundesärztekammer.* Bekanntmachungen. Richtlinien zur Organtransplantation gem. § 16 TPG. *Deutsches Ärzteblatt* 2016; 113(43): B-1635. URL: [http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user\\_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/RiliOrgaWIOvLeberTx2016042122.pdf](http://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/RL/RiliOrgaWIOvLeberTx2016042122.pdf); Zugriff: 18.4.2017.
- 49 *Kirsch J.* Hepatobiliäres System. In: Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzinger LJ, Zilch HG, Hrsg. *Anatomie. 1. Aufl.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2007; 725–754.
- 50 *Racanelli V, Rehermann B.* The liver as an immunological organ. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1): S54-S62.
- 51 *Okechukwu CN, Lopes AA, Stack AG, Feng S, Wolfe RA, Port FK.* Impact of years of dialysis therapy on mortality risk and the characteristics of longer term dialysis survivors. *Am. J. Kidney Dis.* 2002; 39(3): 533–538.
- 52 *Stange J, Mitzner SR, Risler T, Erley CM, Lauchart W, Goehl H, Klammt S, Peszynski P, Freytag J, Hickstein H, Loehr M, Liebe S, Schareck W, Hopt UT, Schmidt R.* Molecular adsorbent recycling system (MARS): clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. *Artif. Organs* 1999; 23(4): 319–330.
- 53 *Rifai K, Manns MP.* Review article: clinical experience with Prometheus. *Ther. Apher. Dial.* 2006; 10(2): 132–137.
- 54 *Perera MT, Mirza DF, Elias E.* Liver transplantation: Issues for the next 20 years. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2009; 24 Suppl 3: S124-S131.
- 55 *Chen GY, Nuñez G.* Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(12): 826–837.
- 56 *Hoth M, Wischmeyer E.* Blut. In: Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E, Hrsg. *Physiologie. 1. Aufl.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2010; 164–189.

- 57 *Hoth M, Wischmeyer E.* Immunsystem. In: Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E, Hrsg. Physiologie. 1. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2010; 192–222.
- 58 *Broere F, Apasov SG, Sitkovsky MV, van Eden W.* T cell subsets and T cell-mediated immunity. In: Nijkamp FP, Parnham MJ, Hrsg. Principles of immunopharmacology. 3. Aufl. Basel, Schweiz: Springer Basel AG 2011; 15–27.
- 59 *Stolarczyk E, Lord GM, Howard JK.* The immune cell transcription factor T-bet: A novel metabolic regulator. *Adipocyte* 2014; 3(1): 58–62.
- 60 *Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK.* IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2009; 27: 485–517.
- 61 *Emoto M, Kaufmann SH.* Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol.* 2003; 24(7): 364–369.
- 62 *Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW.* Liver ischemia and reperfusion injury: New insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *Am. J. Transplant.* 2011; 11(8): 1563–1569.
- 63 *Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA.* Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver Transpl.* 2007; 13(3): 382–390.
- 64 *Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, Buechler M, Schemmer P, Mueller M.* Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology. *HPB Surg.* 2012; 2012: 176723.
- 65 *Kanwar S, Tepperman BL, Payne D, Sutherland LR, Kubes P.* Time course of nitric oxide production and epithelial dysfunction during ischemia/reperfusion of the feline small intestine. *Circ. Shock* 1994; 42(3): 135–140.
- 66 *Ohmori H, Dhar DK, Nakashima Y, Hashimoto M, Masumura S, Nagasue N.* Beneficial effects of FK409, a novel nitric oxide donor, on reperfusion injury of rat liver. *Transplantation* 1998; 66(5): 579–585.
- 67 *Carden DL, Granger DN.* Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathol.* 2000; 190(3): 255–266.
- 68 *Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A.* Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks – a review. *Liver Transpl.* 2010; 16(9): 1016–1032.
- 69 *Jiang N, Zhang ZM, Liu L, Zhang C, Zhang YL, Zhang ZC.* Effects of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on store-operated Ca<sup>2+</sup> channel currents of Kupffer cells after hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(29): 4694–4698.
- 70 *López-Neblina F, Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J.* Ryanodine receptor antagonism protects the ischemic liver and modulates TNF- $\alpha$  and IL-10. *J. Surg. Res.* 2007; 140(1): 121–128.

- 71 *Janicki PK, Wise PE, Belous AE, Pinson CW.* Interspecies differences in hepatic Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and the effect of cold preservation on porcine liver Ca<sup>2+</sup>-ATPase function. *Liver Transpl.* 2001; 7(2): 132–139.
- 72 *Anderson CD, Pierce J, Nicoud I, Belous A, Knox CD, Chari RS.* Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2005; 11(6): 663–668.
- 73 *Belous AE, Jones CM, Wakata A, Knox CD, Nicoud IB, Pierce J, Chari RS.* Mitochondrial calcium transport is regulated by P2Y<sub>1</sub>- and P2Y<sub>2</sub>-like mitochondrial receptors. *J. Cell. Biochem.* 2006; 99(4): 1165–1174.
- 74 *Anderson CD, Belous A, Pierce J, Nicoud IB, Knox C, Wakata A, Pinson CW, Chari RS.* Mitochondrial calcium uptake regulates cold preservation-induced Bax translocation and early reperfusion apoptosis. *Am. J. Transplant.* 2004; 4(3): 352–362.
- 75 *Crompton M.* The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 1999; 341(Pt 2): 233–249.
- 76 *Hausenloy DJ, Yellon DM.* The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003; 35(4): 339–341.
- 77 *Wang D, Dou K, Song Z, Liu Z.* The Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor: a new therapeutic approach for hepatic ischemia injury in rats. *Transplant. Proc.* 2003; 35(8): 3134–3135.
- 78 *Jaeschke H, Lemasters JJ.* Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology* 2003; 125(4): 1246–1257.
- 79 *DeLeve LD.* Glutathione defense in non-parenchymal cells. *Semin. Liver Dis.* 1998; 18(4): 403–413.
- 80 *Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, Bilodeau M.* Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 2004; 39(4): 1110–1119.
- 81 *Upadhyaya GA, Strasberg SM.* Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions. *Hepatology* 2000; 31(5): 1115–1122.
- 82 *Ikeda T, Yanaga K, Kishikawa K, Kakizoe S, Shimada M, Sugimachi K.* Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats. *Hepatology* 1992; 16(2): 454–461.
- 83 *Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ.* Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2000; 32(2): 169–173.
- 84 *Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ.* Superoxide generation by Kupffer cells and priming of neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *Free Radic. Res. Commun.* 1991; 15(5): 277–284.

- 85 *Liu P, McGuire GM, Fisher MA, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H.* Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia. *Shock* 1995; 3(1): 56–62.
- 86 *Hines IN, Hoffman JM, Scheerens H, Day BJ, Harada H, Pavlick KP, Bharwani S, Wolf R, Gao B, Flores S, McCord JM, Grisham MB.* Regulation of postischemic liver injury following different durations of ischemia. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2003; 284(3): G536-G545.
- 87 *Fan C, Zwacka RM, Engelhardt JF.* Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver. *J. Mol. Med. (Berl.)* 1999; 77(8): 577–592.
- 88 *Jaeschke H.* Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006; 290(6): G1083-G1088.
- 89 *Farhood A, McGuire GM, Manning AM, Miyasaka M, Smith CW, Jaeschke H.* Inter-cellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J. Leukoc. Biol.* 1995; 57(3): 368–374.
- 90 *Jaeschke H.* Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J. Invest. Surg.* 2003; 16(3): 127–140.
- 91 *Tsung A, Sahai R, Tanaka H, Nakao A, Fink MP, Lotze MT, Yang H, Li J, Tracey KJ, Geller DA, Billiar TR.* The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. *J. Exp. Med.* 2005; 201(7): 1135–1143.
- 92 *Pardo M, Budick-Harmelin N, Tirosh B, Tirosh O.* Antioxidant defense in hepatic ischemia-reperfusion injury is regulated by damage-associated molecular pattern signal molecules. *Free Radic. Biol. Med.* 2008; 45(8): 1073–1083.
- 93 *Bamboat ZM, Balachandran VP, Ocuin LM, Obaid H, Plitas G, DeMatteo RP.* Toll-like receptor 9 inhibition confers protection from liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2010; 51(2): 621–632.
- 94 *Zhang J, Wang H, Xiao Q, Liang H, Li Z, Jiang C, Wu H, Zheng Q.* Hyaluronic acid fragments evoke Kupffer cells via TLR4 signaling pathway. *Sci. China C Life Sci.* 2009; 52(2): 147–154.
- 95 *Pelinka LE, Harada N, Szalay L, Jafarmadar M, Redl H, Bahrami S.* Release of S100B differs during ischemia and reperfusion of the liver, the gut, and the kidney in rats. *Shock* 2004; 21(1): 72–76.
- 96 *Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, Critchlow ND, Nakao A, Chan MH, Lotze MT, Geller DA, Billiar TR.* Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells. *J. Immunol.* 2005; 175(11): 7661–7668.
- 97 *Tsung A, Zheng N, Jeyabalan G, Izuishi K, Klune JR, Geller DA, Lotze MT, Lu L, Billiar TR.* Increasing numbers of hepatic dendritic cells promote HMGB1-mediated ischemia-reperfusion injury. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81(1): 119–128.
- 98 *Akira S, Takeda K.* Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(7): 499–511.

- 99 Wang H, Li ZY, Wu HS, Wang Y, Jiang CF, Zheng QC, Zhang JX. Endogenous danger signals trigger hepatic ischemia/reperfusion injury through toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2007; 120(6): 509–514.
- 100 Zwacka RM, Zhou W, Zhang Y, Darby CJ, Dudus L, Halldorson J, Oberley L, Engelhardt JF. Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF- $\kappa$ B activation. *Nat. Med.* 1998; 4(6): 698–704.
- 101 Tsuchihashi S, Zhai Y, Bo Q, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 mediated cytoprotection against liver ischemia and reperfusion injury: inhibition of type-1 interferon signaling. *Transplantation* 2007; 83(12): 1628–1634.
- 102 West XZ, Malinin NL, Merkulova AA, Tischenko M, Kerr BA, Borden EC, Podrez EA, Salomon RG, Byzova TV. Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands. *Nature* 2010; 467(7318): 972–976.
- 103 Zeng S, Feirt N, Goldstein M, Guarrera J, Ippagunta N, Ekong U, Dun H, Lu Y, Qu W, Schmidt AM, Emond JC. Blockade of receptor for advanced glycation end product (RAGE) attenuates ischemia and reperfusion injury to the liver in mice. *Hepatology* 2004; 39(2): 422–432.
- 104 Zeng S, Dun H, Ippagunta N, Rosario R, Zhang QY, Lefkowitz J, Yan SF, Schmidt AM, Emond JC. Receptor for advanced glycation end product (RAGE)-dependent modulation of early growth response-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *J. Hepatol.* 2009; 50(5): 929–936.
- 105 Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, Warner RL, Cheadle WG, Ward PA, Edwards MJ. Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology* 1999; 30(6): 1448–1453.
- 106 Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Guice KS, Oldham KT, Campbell DA Jr. The production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 1990; 49(2): 268–272.
- 107 Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J. Clin. Invest.* 1990; 85(6): 1936–1943.
- 108 Suzuki S, Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 1994; 57(2): 253–258.
- 109 Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- $\alpha$ -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006; 290(4): G583–G589.
- 110 Kono H, Fujii H, Ogiku M, Hosomura N, Amemiya H, Tsuchiya M, Hara M. Role of IL-17A in neutrophil recruitment and hepatic injury after warm ischemia-reperfusion mice. *J. Immunol.* 2011; 187(9): 4818–4825.
- 111 Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(2): 279–289.

- 112 *Ming WJ, Bersani L, Mantovani A.* Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 1987; 138(5): 1469–1474.
- 113 *Kato A, Gabay C, Okaya T, Lentsch AB.* Specific role of interleukin-1 in hepatic neutrophil recruitment after ischemia/reperfusion. *Am. J. Pathol.* 2002; 161(5): 1797–1803.
- 114 *Riedemann NC, Ward PA.* Complement in ischemia reperfusion injury. *Am. J. Pathol.* 2003; 162(2): 363–367.
- 115 *Serizawa A, Nakamura S, Suzuki S, Baba S, Nakano M.* Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996; 23(6): 1656–1663.
- 116 *Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM.* Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J. Clin. Invest.* 1995; 95(1): 134–141.
- 117 *Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL.* Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1989; 84(4): 1045–1049.
- 118 *Zhang P, Xie M, Zagorski J, Spitzer JA.* Attenuation of hepatic neutrophil sequestration by anti-CINC antibody in endotoxic rats. *Shock* 1995; 4(4): 262–268.
- 119 *Uchida Y, Freitas MC, Zhao D, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW.* The protective function of neutrophil elastase inhibitor in liver ischemia/reperfusion injury. *Transplantation* 2010; 89(9): 1050–1056.
- 120 *Colletti LM, Cortis A, Lukacs N, Kunkel SL, Green M, Strieter RM.* Tumor necrosis factor up-regulates intercellular adhesion molecule 1, which is important in the neutrophil-dependent lung and liver injury associated with hepatic ischemia and reperfusion in the rat. *Shock* 1998; 10(3): 182–191.
- 121 *Burke J, Zibari GB, Brown MF, Granger N, Kelly R, Singh I, McDonald JC.* Hepatic ischemia-reperfusion injury causes E-selectin upregulation. *Transplant. Proc.* 1998; 30(5): 2321–2323.
- 122 *Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA.* L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am. J. Physiol.* 1998; 275(6 Pt 1): G1341-G1352.
- 123 *Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW.* Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology* 1993; 17(5): 915–923.
- 124 *Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA.* Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology* 2000; 118(1): 183–191.
- 125 *Jaeschke H, Smith CW.* Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J. Leukoc. Biol.* 1997; 61(6): 647–653.

- 126 *Nagendra AR, Mickelson JK, Smith CW.* CD18 integrin and CD54-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated human hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 1997; 272(3 Pt 1): G408-G416.
- 127 *Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Busuttil RW, Cheng G, Kupiec-Weglinski JW.* Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Transplant.* 2005; 5(8): 1793–1800.
- 128 *Maines MD.* The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997; 37: 517–554.
- 129 *Akhtar MZ, Henderson T, Sutherland A, Vogel T, Friend PJ.* Novel approaches to preventing ischemia-reperfusion injury during liver transplantation. *Transplant. Proc.* 2013; 45(6): 2083–2092.
- 130 *Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW.* Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am. J. Transplant.* 2001; 1(2): 121–128.
- 131 *Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L.* NKT cells: what's in a name? *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4(3): 231–237.
- 132 *Van Kaer L.* NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr. Opin. Immunol.* 2007; 19(3): 354–364.
- 133 *Arrenberg P, Maricic I, Kumar V.* Sulfatide-mediated activation of type II natural killer T cells prevents hepatic ischemic reperfusion injury in mice. *Gastroenterology* 2011; 140(2): 646–655.
- 134 *Uchida Y, Ke B, Freitas MC, Ji H, Zhao D, Benjamin ER, Najafian N, Yagita H, Akiba H, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW.* The emerging role of T cell immunoglobulin mucin-1 in the mechanism of liver ischemia and reperfusion injury in the mouse. *Hepatology* 2010; 51(4): 1363–1372.
- 135 *Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, Lentsch AB.* Divergent functions of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005; 289(5): G969-G976.
- 136 *Shen X, Wang Y, Gao F, Ren F, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Zhai Y.* CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without de novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2009; 50(5): 1537–1546.
- 137 *Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Anselmo D, Lassman CR, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW.* Stat4 and Stat6 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: HO-1 dependence of Stat4 disruption-mediated cytoprotection. *Hepatology* 2003; 37(2): 296–303.
- 138 *Umetsu SE, Lee WL, McIntire JJ, Downey L, Sanjanwala B, Akbari O, Berry GJ, Nagumo H, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH.* TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* 2005; 6(5): 447–454.

- 139 *Uchida Y, Ke B, Freitas MC, Yagita H, Akiba H, Busuttil RW, Najafian N, Kupiec-Weglinski JW.* T-cell immunoglobulin mucin-3 determines severity of liver ischemia/reperfusion injury in mice in a TLR4-dependent manner. *Gastroenterology* 2010; 139(6): 2195–2206.
- 140 *Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441(7090): 235–238.
- 141 *Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT.* Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the Th17 lineage. *Nature* 2006; 441(7090): 231–234.
- 142 *Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 2006; 126(6): 1121–1133.
- 143 *Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C.* STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(13): 9358–9363.
- 144 *Liao YH, Xia N, Zhou SF, Tang TT, Yan XX, Lv BJ, Nie SF, Wang J, Iwakura Y, Xiao H, Yuan J, Jevallée H, Wei F, Shi GP, Cheng X.* Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 59(4): 420–429.
- 145 *Ley K, Smith E, Stark MA.* IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. *Immunol. Res.* 2006; 34(3): 229–242.
- 146 *Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH.* Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from  $\gamma\delta$  T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009; 31(2): 331–341.
- 147 *Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, Odeh-Ramadan R, Kinkhabwala M, Goldstein MJ, Ratner LE, Renz JF, Lee HT, Brown RS Jr, Emond JC.* Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am. J. Transplant.* 2010; 10(2): 372–381.
- 148 *Vogel T, Brockmann JG, Friend PJ.* Ex-vivo normothermic liver perfusion: an update. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2010; 15(2): 167–172.
- 149 *Fondevila C, Hessheimer AJ, Ruiz A, Calatayud D, Ferrer J, Charco R, Fuster J, Navasa M, Rimola A, Taurá P, Ginés P, Manyalich M, García-Valdecasas JC.* Liver transplant using donors after unexpected cardiac death: novel preservation protocol and acceptance criteria. *Am. J. Transplant.* 2007; 7(7): 1849–1855.
- 150 *García-Valdecasas JC, Fondevila C.* In-vivo normothermic recirculation: an update. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 2010; 15(2): 173–176.
- 151 *Amador A, Grande L, Martí J, Deulofeu R, Miquel R, Solá A, Rodríguez-Laiz G, Ferrer J, Fondevila C, Charco R, Fuster J, Hotter G, García-Valdecasas JC.* Ischemic pre-conditioning in deceased donor liver transplantation: a prospective randomized clinical trial. *Am. J. Transplant.* 2007; 7(9): 2180–2189.

- 152 *Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, Abu Amara M, Seifalian AM, Davidson BR.* Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury – a review. *J. Surg. Res.* 2008; 150(2): 304–330.
- 153 *Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpí E, Bulbena O, Roselló-Catafau J.* Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25(4): 934–937.
- 154 *Zhong Z, Ramshesh VK, Rehman H, Currin RT, Sridharan V, Theruvath TP, Kim I, Wright GL, Lemasters JJ.* Activation of the oxygen-sensing signal cascade prevents mitochondrial injury after mouse liver ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008; 295(4): G823-G832.
- 155 *Harada N, Okajima K, Uchiba M.* Dalteparin, a low molecular weight heparin, attenuates inflammatory responses and reduces ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats. *Crit. Care Med.* 2006; 34(7): 1883–1891.
- 156 *Harada N, Okajima K, Kushimoto S, Isobe H, Tanaka K.* Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. *Blood* 1999; 93(1): 157–164.
- 157 *Yamauchi JI, Richter S, Vollmar B, Menger MD, Minor T.* Warm preflush with streptokinase improves microvascular procurement and tissue integrity in liver graft retrieval from non-heart-beating donors. *Transplantation* 2000; 69(9): 1780–1784.
- 158 *Fukunaga K, Takada Y, Taniguchi H, Mei G, Seino KI, Yuzawa K, Otsuka M, Todoroki T, Goto K, Fukao K.* Endothelin antagonist treatment for successful liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1999; 67(2): 328–332.
- 159 *Lang R, He Q, Jin ZK, Han DD, Chen DZ.* Urokinase perfusion prevents intrahepatic ischemic-type biliary lesion in donor livers. *World J. Gastroenterol.* 2009; 15(28): 3538–3541.
- 160 *Hashimoto K, Eghtesad B, Gunasekaran G, Fujiki M, Uso TD, Quintini C, Aucejo FN, Kelly DM, Winans CG, Vogt DP, Parker BM, Irefin SA, Miller CM, Fung JJ.* Use of tissue plasminogen activator in liver transplantation from donation after cardiac death donors. *Am. J. Transplant.* 2010; 10(12): 2665–2672.
- 161 *Erdoğan O, Yildiz S, Başaran A, Demirbaş A, Yeşilkaya A.* Effect of intraportal verapamil infusion on hepatic ischemia-reperfusion injury. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53(2): 137–141.
- 162 *Chávez-Cartaya RE, Pino DeSola G, Ramirez-Romero P, Calne RY, Jamieson NV.* Ischemia and reperfusion injury of the rat liver: the role of nimodipine. *J. Surg. Res.* 1996; 60(1): 199–206.
- 163 *Ikeda A, Ueki S, Nakao A, Tomiyama K, Ross MA, Stolz DB, Geller DA, Murase N.* Liver graft exposure to carbon monoxide during cold storage protects sinusoidal endothelial cells and ameliorates reperfusion injury in rats. *Liver Transpl.* 2009; 15(11): 1458–1468.

- 164 *Baskin-Bey ES, Washburn K, Feng S, Oltersdorf T, Shapiro D, Huyghe M, Burgart L, Garrity-Park M, van Vilsteren FG, Oliver LK, Rosen CB, Gores GJ.* Clinical trial of the pan-caspase inhibitor, IDN-6556, in human liver preservation injury. *Am. J. Transplant.* 2007; 7(1): 218–225.
- 165 *Arora AS, Nichols JC, DeBernardi M, Steers JL, Krom RA, Gores GJ.* Glycine rinse protects against liver injury during transplantation. *Transplant. Proc.* 1999; 31(1-2): 505–506.
- 166 *Jaeschke H.* Reactive oxygen and ischemia/reperfusion injury of the liver. *Chem. Biol. Interact.* 1991; 79(2): 115–136.
- 167 *Fujita T, Furitsu H, Nishikawa M, Takakura Y, Sezaki H, Hashida M.* Therapeutic effects of superoxide dismutase derivatives modified with mono- or polysaccharides on hepatic injury induced by ischemia/reperfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 189(1): 191–196.
- 168 *Land W, Schneeberger H, Schleibner S, Illner WD, Abendroth D, Rutili G, Arfors KE, Messmer K.* The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation* 1994; 57(2): 211–217.
- 169 *Pollak R, Andrisevic JH, Maddux MS, Gruber SA, Paller MS.* A randomized double-blind trial of the use of human recombinant superoxide dismutase in renal transplantation. *Transplantation* 1993; 55(1): 57–60.
- 170 *Bedirli N, Ofluoglu E, Kerem M, Utebey G, Alper M, Yilmazer D, Bedirli A, Ozlu O, Pasaoglu H.* Hepatic energy metabolism and the differential protective effects of sevoflurane and isoflurane anesthesia in a rat hepatic ischemia-reperfusion injury model. *Anesth. Analg.* 2008; 106(3): 830-837.
- 171 *Beck-Schimmer B, Breitenstein S, Urech S, De Conno E, Wittlinger M, Puhan M, Jochum W, Spahn DR, Graf R, Clavien PA.* A randomized controlled trial on pharmacological preconditioning in liver surgery using a volatile anesthetic. *Ann. Surg.* 2008; 248(6): 909–918.
- 172 *Bartels M, Biesalski HK, Engelhart K, Sendlhofer G, Rehak P, Nagel E.* Pilot study on the effect of parenteral vitamin E on ischemia and reperfusion induced liver injury: a double blind, randomized, placebo-controlled trial. *Clin. Nutr.* 2004; 23(6): 1360–1370.
- 173 *Argaud L, Gomez L, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Loufouat J, Robert D, Ovize M.* Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005; 39(6): 893–899.
- 174 *Settaf A, Zaim N, Bellouch M, Tillement JP, Morin D.* [Trimetazidine prevents ischemia-reperfusion injury in hepatic surgery under vascular clamping.] *Thérapie* 2001; 56(5): 569–574. Französisch.
- 175 *Regueira FM, Cienfuegos JA, Pardo F, Hernández JL, Díez-Caballero A, Sierra A, Nwose E, Espí A, Baixaulí J, Rotellar F.* Improvement in early function of the hepatic graft after treatment of the donor with N-acetylcysteine: clinical study. *Transplant. Proc.* 1997; 29(8): 3350–3352.

- 176 *Hilmi IA, Peng Z, Planinsic RM, Damian D, Dai F, Tyurina YY, Kagan VE, Kellum JA.* N-acetylcysteine does not prevent hepatorenal ischaemia-reperfusion injury in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2010; 25(7): 2328–2333.
- 177 *Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute for Laboratory Animal Research, Division on Earth and Life Studies, National Research Council of the National Academies.* Guide for the care and use of laboratory animals. 8. Aufl. Washington D.C., USA: National Academies Press 2011; 246S.
- 178 *Abe Y, Hines IN, Zibari G, Pavlick K, Gray L, Kitagawa Y, Grisham MB.* Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 2009; 46(1): 1–7.
- 179 *Wolfensohn S, Lloyd M.* Schedule 1 methods. In: *Handbook of laboratory animal management and welfare.* 3. Aufl. Oxford, England: Blackwell Publishing Ltd. 2003; 77–80.
- 180 *Miltenyi Biotec GmbH.* Protokoll: Preparation of single-cell suspensions from mouse liver, 140-002-292.04. Bergisch Gladbach: Miltenyi Biotec GmbH 2010; 2S.
- 181 *Arora SK.* Analysis of intracellular cytokines using flowcytometry. In: *Sobti RC, Krishan A, Hrsg. Advanced flow cytometry: Applications in biological research.* 1. Aufl. Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers 2003; 37–40.
- 182 *Wrba F, Dolznig H, Mannhalter C.* Untersuchung von RNA. In: *Genetik verstehen. Grundlagen der molekularen Biologie.* 1. Aufl. Wien, Österreich: Facultas Verlags- und Buchhandels AG 2007; 156–166.
- 183 *Shiple GL.* An introduction to real-time PCR. In: *Dorak MT, Hrsg. Real-time PCR.* New York City, New York, USA; Abingdon, England: Taylor & Francis Group 2006; 1–38.
- 184 *Miltenyi Biotec GmbH.* Protokoll: qMACS™ mRNA Isolation Kit, 140-000-254.02. Bergisch Gladbach: Miltenyi Biotec GmbH; 31S.
- 185 *Miltenyi Biotec GmbH.* Protokoll: qMACS™ One-step cDNA Kit, 140-001-291.01. Bergisch Gladbach: Miltenyi Biotec GmbH; 27S.
- 186 *Netzker R.* Genexpression. In: *Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, Hrsg. Biochemie.* 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2008; 443–480.
- 187 *Hamada H, Arakawa T, Shiraki K.* Effect of additives on protein aggregation. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2009; 10(4): 400–407.
- 188 *van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP.* The polymerase chain reaction. In: *Technical aspects and principles of PCR amplification.* Dordrecht, Niederlande: Springer Science+Business Media B.V. 2008; 1–7.
- 189 *QIAGEN GmbH.* Handbuch: QuantiFast® SYBR® Green PCR Handbook, 1064929. Hilden: QIAGEN GmbH 2010; 44S.

- 190 *Felkin LE, Taegtmeier AB, Barton PJ*. Real-time quantitative polymerase chain reaction in cardiac transplant research. In: Hornick P, Rose M, Hrsg. Transplantation immunology. Methods and protocols. 1. Aufl. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc. 2006; 305–330.
- 191 *Mackay IM, Mackay JF, Nissen MD, Sloots TP*. Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: Mackay IM, Hrsg. Real-time PCR in microbiology. From diagnosis to characterization. 1. Aufl. Norfolk, England: Caister Academic Press 2007; 1–39.
- 192 *Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences*. Datenblatt: Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA Set, 555268. Heidelberg: Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences 2003; 2S.
- 193 *R&D Systems GmbH*. Datenblatt: Mouse IL-17 DuoSet® ELISA, DY421. Wiesbaden-Nordenstadt: R&D Systems GmbH 2011; 2S.
- 194 *Clark DP, Pazdernik NJ*. Immune technology. In: Biotechnology. Applying the genetic revolution. 1. Aufl. San Diego, Kalifornien, USA; London, England: Academic Press, Elsevier Inc. 2009; 173–204.
- 195 *DiGiuseppe JA*. Flow cytometry. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, Hrsg. Molecular diagnostics. For the clinical laboratorian. 2. Aufl. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press, Springer Science+Business Media LLC 2010; 163–172.
- 196 *Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences*. Datenblatt: BD FACSCanto II Flow Cytometer, Technical specifications, 23-10918-00. Heidelberg: Becton Dickinson GmbH, BD Biosciences 2009; 4S.
- 197 *Goettlinger C, Mechtold B, Radbruch A*. Operation of a flow cytometer. In: Radbruch A, Hrsg. Flow cytometry and cell sorting. 2. Aufl. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag GmbH 2010; 3–26.
- 198 *QIAGEN GmbH*. Handbuch: RNAlater® Handbook, 1037188. Hilden: QIAGEN GmbH 2006; 20S.
- 199 *Eggenhofer E, Rovira J, Sabet-Baktach M, Groell A, Scherer MN, Dahlke MH, Farkas SA, Loss M, Koehl GE, Lang SA, Melter M, Schlitt HJ, Geissler EK, Kroemer A*. Unconventional ROR $\gamma$ <sup>+</sup> T cells drive hepatic ischemia reperfusion injury. *J. Immunol.* 2013; 191(1): 480–487.
- 200 *Demetris AJ, Crawford JM, Minervini MI, Nalesnik MA, Ochoa E, Randhawa P, Sasatomi E, Wu T*. Transplantation pathology of the liver. In: Odze RD, Goldblum JR, Hrsg. Surgical pathology of the GI tract, liver, biliary tract, and pancreas. 2. Aufl. Philadelphia, Pennsylvania, USA: Saunders, Elsevier Inc. 2009; 1169–1229.
- 201 *Briceño J, Marchal T, Padillo J, Solórzano G, Pera C*. Influence of marginal donors on liver preservation injury. *Transplantation* 2002; 74(4): 522–526.
- 202 *Hallbach J*. Klinische Chemie und Hämatologie für den Einstieg. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 2006; 495S.

- 203 Ziser A, Forstrom LA, Plevak DJ, Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Wiesner RH, Batts KP, Krom RA. Granulocyte accumulation in the transplanted liver does not correlate with clinical and histologic evidence of dysfunction. *Invest. Radiol.* 1996; 31(3): 132–137.
- 204 Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 2008; 29(1): 44–56.
- 205 Kuboki S, Sakai N, Tschoep J, Edwards MJ, Lentsch AB, Caldwell CC. Distinct contributions of CD4<sup>+</sup> T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009; 296(5): G1054–G1059.
- 206 Li L, Huang L, Vergis AL, Ye H, Bajwa A, Narayan V, Strieter RM, Rosin DL, Okusa MD. IL-17 produced by neutrophils regulates IFN- $\gamma$ -mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 2010; 120(1): 331–342.
- 207 Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(7): 479–489.
- 208 Ribot JC, deBarros A, Pang DJ, Neves JF, Peperzak V, Roberts SJ, Girardi M, Borst J, Hayday AC, Pennington DJ, Silva-Santos B. CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- $\gamma$ - and interleukin 17-producing  $\gamma\delta$  T cell subsets. *Nat. Immunol.* 2009; 10(4): 427–436.
- 209 Cowley SC, Meierovics AI, Frelinger JA, Iwakura Y, Elkins KL. Lung CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T cells are prominent producers of IL-17A and IFN- $\gamma$  during primary respiratory murine infection with *Francisella tularensis* live vaccine strain. *J. Immunol.* 2010; 184(10): 5791–5801.
- 210 Crispín JC, Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol.* 2008; 181(12): 8761–8766.
- 211 Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, Iwaki T, Okada Y, Iida M, Cua DJ, Iwakura Y, Yoshimura A. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing  $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* 2009; 15(8): 946–950.
- 212 Cornelissen F, Mus AM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Tocker J, Lubberts E. Interleukin-23 is critical for full-blown expression of a non-autoimmune destructive arthritis and regulates interleukin-17A and ROR $\gamma$ t in  $\gamma\delta$  T cells. *Arthritis Res. Ther.* 2009; 11(6): R194.
- 213 Loi P, Yuan Q, Torres D, Delbauve S, Laute MA, Lalmand MC, Péteín M, Goriely S, Goldman M, Flamand V. Interferon regulatory factor 3 deficiency leads to interleukin-17-mediated liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 2013; 57(1): 351–361.
- 214 Huh JR, Leung MW, Huang P, Ryan DA, Krout MR, Malapaka RR, Chow J, Manel N, Ciofani M, Kim SV, Cuesta A, Santori FR, Lafaille JJ, Xu HE, Gin DY, Rastinejad F, Littman DR. Digoxin and its derivatives suppress Th17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$ t activity. *Nature* 2011; 472(7344): 486–490.

- 215 Gaffey MJ, Boyd JC, Traweek ST, Ali MA, Rezeig M, Caldwell SH, Iezzoni JC, McCullough C, Stevenson WC, Khuroo S, Nezamuddin N, Ishitani MB, Pruett TL. Predictive value of intraoperative biopsies and liver function tests for preservation injury in orthotopic liver transplantation. *Hepatology* 1997; 25(1): 184–189.
- 216 Kakizoe S, Yanaga K, Starzl TE, Demetris AJ. Evaluation of protocol before transplantation and after reperfusion biopsies from human orthotopic liver allografts: considerations of preservation and early immunological injury. *Hepatology* 1990; 11(6): 932–941.
- 217 Ray RA, Lewin KJ, Colonna J, Goldstein LI, Busuttill RW. The role of liver biopsy in evaluating acute allograft dysfunction following liver transplantation: a clinical histologic correlation of 34 liver transplants. *Hum. Pathol.* 1988; 19(7): 835–848.
- 218 Neil DA, Hubscher SG. Are parenchymal changes in early post-transplant biopsies related to preservation-reperfusion injury or rejection? *Transplantation* 2001; 71(11): 1566–1572.
- 219 Marino IR, Doyle HR, Aldrighetti L, Doria C, McMichael J, Gayowski T, Fung JJ, Tzakis AG, Starzl TE. Effect of donor age and sex on the outcome of liver transplantation. *Hepatology* 1995; 22(6): 1754–1762.
- 220 Manaka D, Okamoto R, Yokoyama T, Yamamoto Y, Washida M, Ino K, Yamaoka Y, Kumada K, Ozawa K. Maintenance of liver graft viability in the state of brain death. Synergistic effects of vasopressin and epinephrine on hepatic energy metabolism in brain-dead dogs. *Transplantation* 1992; 53(3): 545–550.
- 221 Schnuelle P, Berger S, de Boer J, Persijn G, van der Woude FJ. Effects of catecholamine application to brain-dead donors on graft survival in solid organ transplantation. *Transplantation* 2001; 72(3): 455–463.
- 222 Ignatowski TA, Spengler RN. Regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor production by modification of adrenergic receptor sensitivity. *J. Neuroimmunol.* 1995; 61(1): 61–70.
- 223 Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, Self C, Sinigaglia F.  $\beta_2$ -Agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J. Clin. Invest.* 1997; 100(6): 1513–1519.
- 224 Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P, Hoffman S, Francuski M, Kunert C, Kuecuk O, Schumacher G, Wesslau C, Lun A, Kohler S, Weiss S, Tullius SG, Neuhaus P, Pratschke J. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. *Ann. Surg.* 2008; 248(6): 1042–1050.
- 225 Silberhumer GR, Rahmel A, Karam V, Gonen M, Gyoeri G, Kern B, Adam R, Muehlbacher F, Rogiers X, Burroughs AK, Berlakovich GA. The difficulty in defining extended donor criteria for liver grafts: the Eurotransplant experience. *Transpl. Int.* 2013; 26(10): 990–998.
- 226 Ruttmann E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H; Vorarlberg Health Monitoring and Promotion Program Study Group.  $\gamma$ -Glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation* 2005; 112(14): 2130–2137.

- 227 Meisinger C, Loewel H, Heier M, Schneider A, Thorand B; KORA Study Group. Serum  $\gamma$ -glutamyltransferase and risk of type 2 diabetes mellitus in men and women from the general population. *J. Intern. Med.* 2005; 258(6): 527–535.
- 228 Targher G, Kendrick J, Smits G, Chonchol M. Relationship between serum  $\gamma$ -glutamyltransferase and chronic kidney disease in the United States adult population. Findings from the National Health and Nutrition Examination Survey 2001–2006. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2010; 20(8): 583–590.
- 229 Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, Saunders JB, Helander A, Tabakoff B; WHO/ISBRA Study Group. CDT, GGT, and AST as markers of alcohol use: the WHO/ISBRA collaborative project. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2002; 26(3): 332–339.
- 230 Eurotransplant International Foundation. Chapter 9. The donor. In: Eurotransplant Manual – version 3.5. Leiden, Niederlande: Eurotransplant International Foundation 2014; 50S.
- 231 Selzner M, Kashfi A, Selzner N, McCluskey S, Greig PD, Cattral MS, Levy GA, Lilly L, Renner EL, Therapondos G, Adcock LE, Grant DR, McGilvray ID. Recipient age affects long-term outcome and hepatitis C recurrence in old donor livers following transplantation. *Liver Transpl.* 2009; 15(10): 1288–1295.
- 232 Yersiz H, Shaked A, Olthoff K, Imagawa D, Shackleton C, Martin P, Busutil RW. Correlation between donor age and the pattern of liver graft recovery after transplantation. *Transplantation* 1995; 60(8): 790–794.
- 233 Hoofnagle JH, Lombardero M, Zetterman RK, Lake J, Porayko M, Everhart J, Belle SH, Detre KM. Donor age and outcome of liver transplantation. *Hepatology* 1996; 24(1): 89–96.
- 234 Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, Sasaki T, Sollinger HW, Belzer FO, Kalayoglu M. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation – a multivariate analysis. *Transplantation* 1993; 55(4): 807–813.
- 235 Oosterlee A, Rahmel A; Eurotransplant International Foundation. Annual report 2011. Den Haag, Niederlande: CIP-Gegevens Koninklijke Bibliotheek 2012; 116S.
- 236 Rinella ME, Alonso E, Rao S, Whittington P, Fryer J, Abecassis M, Superina R, Flamm SL, Blei AT. Body mass index as a predictor of hepatic steatosis in living liver donors. *Liver Transpl.* 2001; 7(5): 409–414.
- 237 D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, Pirsch JD, Hafez GR, Lorentzen D, Belzer FO. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 51(1): 157–163.
- 238 Alves RC, Fonseca EA, Mattos CA, Abdalla S, Gonçalves JE, Waisberg J. Predictive factors of early graft loss in living donor liver transplantation. *Arq. Gastroenterol.* 2012; 49(2): 157–161.
- 239 Hakeem AR, Cockbain AJ, Raza SS, Pollard SG, Toogood GJ, Attia MA, Ahmad N, Hidalgo EL, Prasad KR, Menon KV. Increased morbidity in overweight and obese liver transplant recipients: a single-center experience of 1325 patients from the United Kingdom. *Liver Transpl.* 2013; 19(5): 551–562.

- 240 Kelly DM, Shiba H, Nakagawa S, Irefin S, Eghtesad B, Quintini C, Aucejo F, Hashimoto K, Fung JJ, Miller C. Hepatic blood flow plays an important role in ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2011; 17(12): 1448–1456.
- 241 Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, Henin D, Degott C. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl. Surg.* 1997; 3(4): 407–415.
- 242 Pageaux GP, Michel J, Coste V, Perney P, Possoz P, Perrigault PF, Navarro F, Fabre JM, Domergue J, Blanc P, Larrey D. Alcoholic cirrhosis is a good indication for liver transplantation, even for cases of recidivism. *Gut* 1999; 45(3): 421–426.
- 243 Witzke O, Baumann M, Patschan D, Patschan S, Mitchell A, Treichel U, Gerken G, Philipp T, Kribben A. Which patients benefit from hemodialysis therapy in hepatorenal syndrome? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2004; 19(12): 1369–1373.
- 244 Restuccia T, Ortega R, Guevara M, Ginès P, Alessandria C, Ozdogan O, Navasa M, Rimola A, Garcia-Valdecasas JC, Arroyo V, Rodés J. Effects of treatment of hepatorenal syndrome before transplantation on posttransplantation outcome. A case-control study. *J. Hepatol.* 2004; 40(1): 140–146.
- 245 Salvalaggio PR, Felga GE, Afonso RC, Ferraz-Neto BH. Early allograft dysfunction and liver transplant outcomes: a single center retrospective study. *Transplant. Proc.* 2012; 44(8): 2449–2451.
- 246 Marsman WA, Wiesner RH, Rodriguez L, Batts KP, Porayko MK, Hay JE, Gores GJ, Krom RA. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival. *Transplantation* 1996; 62(9): 1246–1251.
- 247 Álamo JM, Barrera L, Marín LM, Bernal C, Suárez G, Serrano J, Gómez MA, Padillo FJ. Results of liver transplantation with donors older than 70 years: a case-control study. *Transplant. Proc.* 2011; 43(6): 2227–2229.
- 248 Dickson RC, Lauwers GY, Rosen CB, Cantwell R, Nelson DR, Lau JY. The utility of noninvasive serologic markers in the management of early allograft rejection in liver transplantation recipients. *Transplantation* 1999; 68(2): 247–253.
- 249 Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. *Transplantation* 2003; 75(12): 2001–2007.
- 250 Dominguez M, Miquel R, Colmenero J, Moreno M, García-Pagán JC, Bosch J, Arroyo V, Ginès P, Caballería J, Bataller R. Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 2009; 136(5): 1639–1650.
- 251 Rowell DL, Eckmann L, Dwinell MB, Carpenter SP, Raucy JL, Yang SK, Kagnoff MF. Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion. *Am. J. Physiol.* 1997; 273(2 Pt 1): G322-G332.
- 252 Qi ZX, Wang LY, Fan YC, Zhang JJ, Li T, Wang K. Increased peripheral ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ t mRNA expression is associated with acute-on-chronic hepatitis B liver failure. *J. Viral Hepat.* 2012; 19(11): 811–822.

- 253 *Wucherpfennig KW, Newcombe J, Li H, Keddy C, Cuzner ML, Hafler DA.*  $\gamma\delta$  T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89(10): 4588–4592.
- 254 *Ang SL, Seidman JG, Peterman GM, Duby AD, Benjamin D, Lee SJ, Hafler DA.* Functional  $\gamma$  chain-associated T cell receptors on cerebrospinal fluid-derived natural killer-like T cell clones. *J. Exp. Med.* 1987; 165(5): 1453–1458.
- 255 *Peng MY, Wang ZH, Yao CY, Jiang LN, Jin QL, Wang J, Li BQ.* Interleukin 17-producing  $\gamma\delta$  T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cell. Mol. Immunol.* 2008; 5(3): 203–208.
- 256 *Yabe M, Yabe H, Hattori K, Hinohara T, Morimoto T, Kato S, Kusunoki A.* Transition of T cell receptor  $\gamma\delta$  expressing double negative (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) lymphocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1994; 14(5): 741–746.
- 257 *Chen M, Hu P, Peng H, Zeng W, Shi X, Lei Y, Hu H, Zhang D, Ren H.* Enhanced peripheral  $\gamma\delta$ T cells cytotoxicity potential in patients with HBV-associated acute-on-chronic liver failure might contribute to the disease progression. *J. Clin. Immunol.* 2012; 32(4): 877–885.
- 258 *Navarro F, Portalès P, Candon S, Pruvot FR, Pageaux G, Fabre JM, Domergue J, Clot J.* Natural killer cell and  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  lymphocyte traffic into the liver graft immediately after liver transplantation. *Transplantation* 2000; 69(4): 633–639.
- 259 *Galéa P, Brezinschek R, Lipsky PE, Oppenheimer-Marks N.* Phenotypic characterization of CD4<sup>+</sup>/ $\alpha\beta$  TCR<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup> T cells with a transendothelial migratory capacity. *J. Immunol.* 1994; 153(2): 529–542.
- 260 *Caccamo N, La Mendola C, Orlando V, Meraviglia S, Todaro M, Stassi G, Sireci G, Fournié JJ, Dieli F.* Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells. *Blood* 2011; 118(1): 129–138.
- 261 *Caccamo N, Todaro M, Sireci G, Meraviglia S, Stassi G, Dieli F.* Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of human  $\gamma\delta$  T cells. *Cell. Mol. Immunol.* 2013; 10(1): 30–34.
- 262 *Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D.* Differentiation of resting human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell. Immunol.* 2001; 212(2): 110–117.
- 263 *Ness-Schwickerath KJ, Jin C, Morita CT.* Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T cells. *J. Immunol.* 2010; 184(12): 7268–7280.
- 264 *Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, Fournié JJ.* Stimulation of human  $\gamma\delta$  T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 1994; 264(5156): 267–270.
- 265 *Jomaa H, Feurle J, Luehs K, Kunzmann V, Tony HP, Herderich M, Wilhelm M.* V $\gamma$ 9/V $\delta$ 2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1999; 25(4): 371–378.

- 266 *Tanaka Y, Morita CT, Tanaka Y, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR.* Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human  $\gamma\delta$  T cells. *Nature* 1995; 375(6527): 155–158.
- 267 *Moens E, Brouwer M, Dimova T, Goldman M, Willems F, Vermijlen D.* IL-23R and TCR signaling drives the generation of neonatal V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells expressing high levels of cytotoxic mediators and producing IFN- $\gamma$  and IL-17. *J. Leukoc. Biol.* 2011; 89(5): 743–752.
- 268 *Fábrega E, López-Hoyos M, San Segundo D, Casafont F, Pons-Romero F.* Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2009; 15(6): 629–633.
- 269 *Helewski KJ, Kowalczyk-Ziomek GI, Czecior E, Swietochowska E, Wielkoszynski T, Czuba ZP, Szliszka E, Krol W.* Administration of low doses of tumor necrosis factor- $\alpha$  protects rat liver from ischaemic damage and reperfusion injury. *J. Physiol. Pharmacol.* 2010; 61(3): 273–278.
- 270 *Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM.* Antibodies to tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am. J. Physiol.* 1992; 263(4 Pt 1): G579-G585.
- 271 *Henson PM.* Platelet-activating factor (PAF) as a mediator of neutrophil-platelet interactions in inflammation. *Agents Actions* 1981; 11(6–7): 545–547.
- 272 *Decker K.* Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur. J. Biochem.* 1990; 192(2): 245–261.
- 273 *Lewis MS, Whatley RE, Cain P, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA.* Hydrogen peroxide stimulates the synthesis of platelet-activating factor by endothelium and induces endothelial cell-dependent neutrophil adhesion. *J. Clin. Invest.* 1988; 82(6): 2045–2055.
- 274 *Takada Y, Boudjema K, Jaeck D, Bel-Haouari M, Doghmi M, Chenard MP, Wolf P, Cinqualbre J.* Effects of platelet-activating factor antagonist on preservation/reperfusion injury of the graft in porcine orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1995; 59(1): 10–16.
- 275 *Greig PD, Woolf GM, Sinclair SB, Abecassis M, Strasberg SM, Taylor BR, Blendis LM, Superina RA, Glynn MF, Langer B, Levy GA.* Treatment of primary liver graft nonfunction with prostaglandin E $_1$ . *Transplantation* 1989; 48(3): 447–453.
- 276 *Henley KS, Lucey MR, Normolle DP, Merion RM, McLaren ID, Crider BA, Mackie DS, Shieck VL, Nostrant TT, Brown KA, Campbell DA Jr, Ham JM, Appelman HD, Turcotte JG.* A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of prostaglandin E $_1$  in liver transplantation. *Hepatology* 1995; 21(2): 366–372.
- 277 *Klein AS, Cofer JB, Pruett TL, Thuluvath PJ, McGory R, Uber L, Stevenson WC, Baliga P, Burdick JF.* Prostaglandin E $_1$  administration following orthotopic liver transplantation: a randomized prospective multicenter trial. *Gastroenterology* 1996; 111(3): 710–715.
- 278 *Klein M, Geoghegan J, Wangemann R, Boeckler D, Schmidt K, Scheele J.* Preconditioning of donor livers with prostaglandin I $_2$  before retrieval decreases hepatocellular ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 1999; 67(8): 1128–1132.

- 279 *Lehmann TG, Koepfel TA, Kirschfink M, Gebhard MM, Herfarth C, Otto G, Post S.* Complement inhibition by soluble complement receptor type 1 improves microcirculation after rat liver transplantation. *Transplantation* 1998; 66(6): 717–722.
- 280 *Niwano M, Arai S, Monden K, Ishiguro S, Nakamura T, Mizumoto M, Takeda Y, Fujioka M, Imamura M.* Amelioration of sinusoidal endothelial cell damage by Kupfer cell blockade during cold preservation of rat liver. *J. Surg. Res.* 1997; 72(1): 36–48.
- 281 *von Frankenberg M, Golling M, Mehrabi A, Nentwich H, Klar E, Kraus TW.* Donor pretreatment with gadolinium chloride improves early graft function and survival after porcine liver transplantation. *Transpl. Int.* 2003; 16(11): 806–813.
- 282 *Cornwell RD, Gollahon KA, Hickstein DD.* Description of the leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1 or CD11a) promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90(9): 4221–4225.
- 283 *Staunton DE, Dustin ML, Springer TA.* Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989; 339(6219): 61–64.
- 284 *el-Wahsh M, Fuller F, Sreekumar NS, Burroughs A, Dhillon P, Rolles K, Davidson BR.* Effect of reperfusion on human allograft ICAM-1 expression and its correlation with histological evidence of reperfusion changes. *Transplant. Proc.* 1997; 29(7): 3000–3001.
- 285 *Takei Y, Nishimura Y, Kawano S, Nagai H, Ohmae A, Fusamoto H, Kamada T.* Expression of ICAM-1 is involved in the mechanism of liver injury during liver transplantation: therapeutic usefulness of the F(ab')<sub>2</sub> fragment of an anti-ICAM-1 monoclonal antibody. *Transplant. Proc.* 1996; 28(2): 1103–1105.
- 286 *Nakano H, Kuzume M, Namatame K, Yamaguchi M, Kumada K.* Efficacy of intra-portal injection of anti-ICAM-1 monoclonal antibody against liver cell injury following warm ischemia in the rat. *Am. J. Surg.* 1995; 170(1): 64–66.
- 287 *Marubayashi S, Oshiro Y, Fukuma A, Okada K, Maeda T, Dohi K.* Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.* 1999; 31(1–2): 1054.
- 288 *Yamashita Y, Shimada M, Hamatsu T, Rikimaru T, Tanaka S, Shirabe K, Sugimachi K.* Effects of preoperative steroid administration on surgical stress in hepatic resection: prospective randomized trial. *Arch. Surg.* 2001; 136(3): 328–333.
- 289 *Kawano K, Bowers JL, Clouse ME.* Protective effect of FK 506 on hepatic injury following cold ischemic preservation and transplantation: influence on hepatic microcirculation. *Transplant. Proc.* 1995; 27(1): 362–363.
- 290 *Dhar DK, Takemoto Y, Nagasue N, Uchida M, Ono T, Nakamura T.* FK506 maintains cellular calcium homeostasis in ischemia-reperfusion injury of the canine liver. *J. Surg. Res.* 1996; 60(1): 142–146.
- 291 *St Peter SD, Post DJ, Rodriguez-Davalos MI, Douglas DD, Moss AA, Mulligan DC.* Tacrolimus as a liver flush solution to ameliorate the effects of ischemia/reperfusion injury following liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003; 9(2): 144–149.

- 292 *Kristo I, Wilflingseder J, Kainz A, Marschalek J, Wekerle T, Muehlbacher F, Oberbauer R, Bodingbauer M.* Effect of intraportal infusion of tacrolimus on ischaemic reperfusion injury in orthotopic liver transplantation: a randomized controlled trial. *Transpl. Int.* 2011; 24(9): 912–919.
- 293 *Pratschke S, Eder M, Heise M, Nadalin S, Pascher A, Schemmer P, Scherer MN, Ulrich F, Wolters H, Jauch KW, Woehling D, Angele MK.* Protocol TOP-Study (tacrolimus organ perfusion): a prospective randomized multicenter trial to reduce ischemia reperfusion injury in transplantation of marginal liver grafts with an ex vivo tacrolimus perfusion. *Transplant. Res.* 2013; 2(1): 3.
- 294 *Pratschke S, Arnold H, Zollner A, Heise M, Pascher A, Schemmer P, Scherer MN, Bauer A, Jauch KW, Werner J, Guba M, Angele MK.* Results of the TOP study: Prospectively randomized multicenter trial of an ex vivo tacrolimus rinse before transplantation in EDC livers. *Transplant. Direct* 2016; 2(6): e76.
- 295 *Wang ME, Tejpal N, Qu X, Yu J, Okamoto M, Stepkowski SM, Kahan BD.* Immunosuppressive effects of FTY720 alone or in combination with cyclosporine and/or sirolimus. *Transplantation* 1998; 65(7): 899–905.
- 296 *Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, Hoshino Y.* FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J. Immunol.* 1998; 160(10): 5037–5044.
- 297 *Anselmo DM, Amersi FF, Shen XD, Gao F, Katori M, Lassman C, Ke B, Coito AJ, Ma J, Brinkmann V, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW, Farmer DG.* FTY720 pre-treatment reduces warm hepatic ischemia reperfusion injury through inhibition of T-lymphocyte infiltration. *Am. J. Transplant.* 2002; 2(9): 843–849.
- 298 *Evenou JP, Wagner J, Zenke G, Brinkmann V, Wagner K, Kovarik J, Welzenbach KA, Weitz-Schmidt G, Guntermann C, Towbin H, Cottens S, Kaminski S, Letschka T, Lutz-Nicoladoni C, Gruber T, Hermann-Kleiter N, Thuille N, Baier G.* The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009; 330(3): 792–801.
- 299 *Kamo N, Shen X, Ke B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW.* Sotrastaurin, a protein kinase C inhibitor, ameliorates ischemia and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2011; 11(11): 2499–2507.
- 300 *Eggenhofer E, Sabet-Rashedi M, Lantow M, Renner P, Rovira J, Koehl GE, Schlitt HJ, Geissler EK, Kroemer A.* ROR $\gamma$ <sup>+</sup> IL-22-producing NKp46<sup>+</sup> cells protect from hepatic ischemia reperfusion injury in mice. *J. Hepatol.* 2016; 64(1): 128–134.



## 9      **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1.</b> HE-gefärbte, humane Leberstanzbiopsie .....	6
<b>Abb. 2.</b> Anatomie der Mausleber .....	30
<b>Abb. 3.</b> Ischämische Anteile der Tierleber zur weiteren Analyse .....	33
<b>Abb. 4.</b> Lobus medialis und Lobus lateralis sinister der Tierleber .....	59
<b>Abb. 5.</b> Parameter der Leberschädigung im Tiermodell.....	60
<b>Abb. 6.</b> Infiltration neutrophiler Granulozyten im Tiermodell .....	61
<b>Abb. 7.</b> Infiltration CD3 <sup>+</sup> -T-Zellen im Tiermodell.....	62
<b>Abb. 8.</b> Das Zytokin TNF- $\alpha$ und das Chemokin CXCL-1 im Tiermodell.....	63
<b>Abb. 9.</b> Das Zytokin IL-17A und der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t im Tiermodell.....	64
<b>Abb. 10.</b> Repräsentative Dichtedarstellung der durchflusszytometrischen Analyse von infiltrierenden Leukozyten in die Tierleber .....	66
<b>Abb. 11.</b> Repräsentative Darstellung der absoluten Zellzahl der durchfluss- zytometrischen Analyse von infiltrierenden Leukozyten in die Tierleber .....	67
<b>Abb. 12.</b> HE-gefärbte Leberstanzbiopsien eines Patienten in Abwesenheit eines IRS in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen.....	70
<b>Abb. 13.</b> HE-gefärbte Leberstanzbiopsien eines Patienten mit IRS in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen .....	71
<b>Abb. 14.</b> Prozentuale Häufigkeiten des IRS des Patientenkollektivs und der Marginalität der Transplantate .....	76
<b>Abb. 15.</b> Grunderkrankungen der Empfänger.....	80
<b>Abb. 16.</b> Kumuliertes Patientenüberleben im Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS.....	83
<b>Abb. 17.</b> Kumuliertes Patientenüberleben im Vergleich der Patienten mit marginalem beziehungsweise nicht marginalem Transplantat .....	84
<b>Abb. 18.</b> Kumuliertes Patientenüberleben im Vergleich der Patienten mit vorhandenem beziehungsweise abwesendem histopathologischem IRS sowie marginalem und nicht marginalem Transplantat .....	85
<b>Abb. 19.</b> Empfänger-GPT präoperativ und am 1.–7. POT .....	88
<b>Abb. 20.</b> Empfänger-GOT präoperativ und am 1.–7. POT.....	90
<b>Abb. 21.</b> Empfänger-GLDH präoperativ und am 1.–7. POT.....	91
<b>Abb. 22.</b> Empfänger-Gesamtbilirubin präoperativ und am 1.–7. POT.....	92

- Abb. 23.** Empfänger-Faktor-V präoperativ und am 1.–7. POT ..... 94
- Abb. 24.** Exemplarische Abbildung immunhistochemisch CD3-gefärbter  
Leberstanzbiopsien eines Patienten mit IRS und marginalem Transplantat  
in unterschiedlichen Vergrößerungsstufen..... 96
- Abb. 25.** Immunhistochemisch  $\gamma\delta$ TCR- und HE-gefärbte Leberstanzbiopsien eines  
Patienten mit marginalem Transplantat in Abwesenheit eines IRS in  
unterschiedlichen Vergrößerungsstufen ..... 99
- Abb. 26.** CXCL-1-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate ..... 104
- Abb. 27.** TCR $\gamma$ -mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate ..... 108

## 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 3-1.</b> Geräte und sonstige Materialien .....	20
<b>Tab. 3-2.</b> Operationsmaterialien.....	21
<b>Tab. 3-3.</b> Verbrauchsmaterialien.....	22
<b>Tab. 3-4.</b> Chemikalien und sonstige Stoffe .....	24
<b>Tab. 3-5.</b> Kits .....	26
<b>Tab. 3-6.</b> Antikörper für die immunhistochemischen Färbungen .....	26
<b>Tab. 3-7.</b> Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen.....	26
<b>Tab. 3-8.</b> Primer.....	27
<b>Tab. 3-9.</b> Puffer und Lösungen .....	27
<b>Tab. 3-10.</b> Computersoftware und Datenbanken .....	28
<b>Tab. 4-1.</b> qMACS™ mRNA Isolation Kit <sup>184</sup> .....	39
<b>Tab. 4-2.</b> qMACS™ One-step cDNA Kit <sup>185</sup> .....	39
<b>Tab. 4-3.</b> Tier- und Humanproben: Programm der Thermocycler-Software .....	41
<b>Tab. 4-4.</b> Tierproben: RT-PCR-Reaktionsansatz für GAPDH, TNF- $\alpha$ , CXCL-1 IL-17A und RORc .....	41
<b>Tab. 4-5.</b> Durchflusszytometrie-Mastermix für die Oberflächenfärbung .....	48
<b>Tab. 4-6.</b> Durchflusszytometrie-Mastermix für die intrazelluläre Färbung .....	50
<b>Tab. 4-7.</b> Humane Blut- und Serumanalysen .....	54
<b>Tab. 4-8.</b> Humanproben: RT-PCR-Reaktionsansatz für GAPDH, CD3, TNF- $\alpha$ CXCL-1, TBX-21 und RORc .....	55
<b>Tab. 4-9.</b> Humanproben: RT-PCR-Reaktionsansatz für TCR $\gamma$ .....	55
<b>Tab. 5-1.</b> Basischarakteristika der Spender .....	73
<b>Tab. 5-2.</b> Vorerkrankungen und Lebensstil der Spender.....	74
<b>Tab. 5-3.</b> Laborchemische Parameter der Spender .....	75
<b>Tab. 5-4.</b> Kategorisch eingeteilte Variablen der Grenzwerte der Marginalitätskriterien laut Eurotransplant <sup>34</sup> bezogen auf den Spender und das Transplantat.....	76
<b>Tab. 5-5.</b> Kontinuierliche Variablen der Marginalitätskriterien laut Eurotransplant <sup>34</sup> und Steatose über 30% bezogen auf den Spender und das Transplantat.....	77

---

<b>Tab. 5-6.</b> Übersicht der 3 Gruppeneinteilungen des Patientenkollektivs anhand des IRS und der Marginalität .....	78
<b>Tab. 5-7.</b> Basischarakteristika der Empfänger .....	79
<b>Tab. 5-8.</b> Grunderkrankung der Empfänger .....	80
<b>Tab. 5-9.</b> Höhe des Lab-MELD, Häufigkeiten von Exceptional-MELD und HU-LTx der Empfänger .....	81
<b>Tab. 5-10.</b> Häufigkeiten zellulärer Abstoßungsreaktion binnen 6 Wochen nach LTx sowie Re-LTx der Empfänger .....	82
<b>Tab. 5-11.</b> Häufigkeit der verstorbenen Patienten, Überlebensdauer und Überlebenswahrscheinlichkeit .....	86
<b>Tab. 5-12.</b> Überlebensraten des Patientenkollektivs .....	86
<b>Tab. 5-13.</b> CD3 <sup>+</sup> -Zellinfiltration in Leberläppchen der humanen Transplantate .....	97
<b>Tab. 5-14.</b> CD3 <sup>+</sup> -Zellinfiltration in Portalfelder der humanen Transplantate .....	98
<b>Tab. 5-15.</b> CD3-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate .....	101
<b>Tab. 5-16.</b> TNF- $\alpha$ -mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate .....	102
<b>Tab. 5-17.</b> CXCL-1-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate.....	103
<b>Tab. 5-18.</b> TBX-21-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate .....	106
<b>Tab. 5-19.</b> RORc-mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate.....	107
<b>Tab. 5-20.</b> TCR $\gamma$ -mRNA-Expressionslevel der humanen Transplantate .....	109

# 11 Anhang

**A1. Empfänger-GPT präoperativ und am 1.–7. POT. Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6) mit zusätzlicher Darstellung ausschließlich der signifikant verschiedenen Gruppen innerhalb der 3. Gruppeneinteilung (C). Mittelwerte mit Standardabweichung. Patientenzahl in runden Klammern.**

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Präop.	263,3 ± 724,3 (44)	263,4 ± 396,2 (16)	263,3 ± 754,0 (28)	0,110	336,6 ± 862,0 (21)	196,4 ± 583,2 (23)	0,664
1. POT	998,7 ± 1.242 (46)	764,4 ± 953,3 (17)	1136 ± 1.381 (29)	0,228	910,9 ± 926,7 (21)	1072 ± 1.471 (25)	0,956
2. POT	884,4 ± 1.216 (46)	524,7 ± 564,4 (17)	1095 ± 1.439 (29)	0,109	772,6 ± 711,3 (21)	978,4 ± 1.527 (25)	0,589
3. POT	626,4 ± 659,5 (46)	413,1 ± 443,2 (17)	751,4 ± 736,8 (29)	0,067	605,0 ± 482,3 (21)	644,4 ± 788,0 (25)	0,460
4. POT	420,8 ± 385,4 (46)	291,4 ± 260,6 (17)	496,6 ± 428,7 (29)	0,119	419,7 ± 282,0 (21)	421,7 ± 460,6 (25)	0,337
5. POT	317,5 ± 303,6 (45)	219,4 ± 201,8 (17)	377,1 ± 341,1 (28)	0,092	316,4 ± 241,2 (21)	318,5 ± 354,7 (24)	0,328
6. POT	263,2 ± 309,0 (44)	174,5 ± 140,3 (17)	319,1 ± 370,7 (27)	0,085	217,5 ± 130,8 (20)	301,3 ± 401,3 (24)	0,637
7. POT	214,2 ± 215,5 (44)	144,1 ± 102,8 (17)	258,4 ± 255,1 (27)	0,051	201,7 ± 128,2 (21)	225,7 ± 274,8 (23)	0,372

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Präop.	136,9 ± 217,6 (9)	426,0 ± 1.041 (7)	486,4 ± 1.122 (12)	96,00 ± 173,6 (16)	0,380
1. POT	1025 ± 1.236 (9)	470,6 ± 380,0 (8)	825,0 ± 656,6 (12)	1356 ± 1.708 (17)	0,389
2. POT	706,9 ± 704,9 (9)	319,8 ± 263,8 (8)	821,8 ± 743,3 (12)	1288 ± 1.774 (17)	0,234
3. POT	570,4 ± 556,2 (9)	236,1 ± 166,7 (8)	630,9 ± 442,9 (12)	836,5 ± 892,6 (17)	0,134
4. POT	393,2 ± 311,9 (9)	176,9 ± 125,4 (8)	439,5 ± 270,0 (12)	536,9 ± 517,0 (17)	0,158
5. POT	295,8 ± 244,8 (9)	133,4 ± 92,86 (8)	331,8 ± 248,2 (12)	411,1 ± 401,8 (16)	0,133
6. POT	228,7 ± 166,6 (9)	113,5 ± 72,23 (8)	208,3 ± 100,4 (11)	395,3 ± 465,1 (16)	0,119
7. POT	183,9 ± 114,5 (9)	99,38 ± 69,44 (8)	215,1 ± 141,1 (12)	293,0 ± 319,8 (15)	0,087

<b>C</b>	Gruppe	vs. Gruppe	p	Gruppe	vs. Gruppe	p	
3. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,013	7. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,011
4. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,010	3. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,048
5. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,025	6. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,037
6. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,037	7. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,042

**A2. Empfänger-GOT präoperativ und am 1.-7. POT.** Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6) mit zusätzlicher Darstellung ausschließlich der signifikant verschiedenen Gruppen innerhalb der 3. Gruppeneinteilung (C). Mittelwerte mit Standardabweichung. Patientenzahl in runden Klammern.

A	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Präop.	389,2 ± 1.027 (43)	570,5 ± 1.568 (15)	292,1 ± 580,9 (28)	0,290	331,0 ± 623,4 (21)	444,8 ± 1.316 (22)	0,894
1. POT	1776 ± 3.401 (46)	1444 ± 2.168 (17)	1971 ± 3.974 (29)	0,419	1351 ± 1.958 (21)	2133 ± 4.266 (25)	0,501
2. POT	991,7 ± 1.895 (46)	476,8 ± 501,2 (17)	1294 ± 2.318 (29)	0,125	633,9 ± 643,4 (21)	1292 ± 2.486 (25)	0,974
3. POT	492,8 ± 791,1 (46)	241,3 ± 231,6 (17)	640,3 ± 956,2 (29)	0,070	332,0 ± 258,7 (21)	627,9 ± 1.037 (25)	0,886
4. POT	235,4 ± 345,1 (46)	120,6 ± 87,91 (17)	302,7 ± 417,5 (29)	0,084	148,4 ± 84,63 (21)	308,4 ± 453,0 (25)	0,808
5. POT	158,6 ± 267,0 (45)	79,41 ± 49,52 (17)	206,7 ± 329,2 (28)	0,228	122,2 ± 154,5 (21)	190,5 ± 336,7 (24)	0,609
6. POT	162,3 ± 534,8 (44)	64,29 ± 46,03 (17)	224,0 ± 679,3 (27)	0,096	70,05 ± 36,12 (20)	239,1 ± 721,1 (24)	0,860
7. POT	81,73 ± 93,98 (44)	56,00 ± 54,96 (17)	97,93 ± 109,7 (27)	0,019	70,52 ± 51,30 (21)	91,96 ± 121,0 (23)	0,851

B	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Präop.	246,9 ± 502,7 (9)	1056 ± 2.451 (6)	394,1 ± 716,1 (12)	215,6 ± 465,6 (16)	0,763
1. POT	1923 ± 2.818 (9)	904,5 ± 1.018 (8)	922,5 ± 852,4 (12)	2712 ± 5.073 (17)	0,192
2. POT	582,7 ± 568,5 (9)	357,6 ± 417,3 (8)	672,3 ± 716,7 (12)	1732 ± 2.925 (17)	0,248
3. POT	332,8 ± 278,1 (9)	149,6 ± 126,9 (8)	339,0 ± 255,5 (12)	853,0 ± 1.200 (17)	0,163
4. POT	154,4 ± 99,60 (9)	82,50 ± 56,54 (8)	143,8 ± 75,86 (12)	414,8 ± 518,5 (17)	0,130
5. POT	101,7 ± 48,85 (9)	54,38 ± 39,04 (8)	137,6 ± 202,6 (12)	258,6 ± 397,9 (16)	0,137
6. POT	75,11 ± 49,19 (9)	52,13 ± 41,93 (8)	65,91 ± 22,38 (11)	332,6 ± 876,7 (16)	0,178
7. POT	69,11 ± 68,00 (9)	41,25 ± 33,93 (8)	71,58 ± 37,66 (12)	119,0 ± 142,1 (15)	0,093

C	Gruppe vs. Gruppe	p	Gruppe vs. Gruppe	p		
5. POT	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	0,045	5. POT Kein IRS + M	IRS + M	0,035
3. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,045	6. POT Kein IRS + M	IRS + M	0,017
7. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,034	7. POT Kein IRS + M	IRS + M	0,014
4. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,027			

**A3. Empfänger-GLDH präoperativ und am 1.–7. POT.** Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6) mit zusätzlicher Darstellung ausschließlich der signifikant verschiedenen Gruppen innerhalb der 3. Gruppeneinteilung (C). Mittelwerte mit Standardabweichung. Patientenzahl in runden Klammern.

A	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Präop.	84,56 ± 158,0 (16)	107,6 ± 187,5 (4)	76,88 ± 155,5 (12)	–	146,2 ± 204,0 (6)	47,59 ± 120,0 (10)	0,083
1. POT	371,1 ± 559,1 (39)	355,3 ± 817,0 (13)	379,1 ± 393,1 (26)	0,108	479,7 ± 793,8 (17)	287,2 ± 262,0 (22)	0,832
2. POT	447,0 ± 864,7 (36)	224,0 ± 286,3 (14)	588,9 ± 1.068 (22)	0,127	352,1 ± 353,2 (17)	531,9 ± 1.152 (19)	0,438
3. POT	360,3 ± 839,7 (42)	208,3 ± 306,6 (15)	444,8 ± 1.020 (27)	0,394	304,1 ± 333,5 (19)	406,7 ± 1.104 (23)	0,120
4. POT	203,6 ± 353,3 (41)	141,7 ± 229,8 (15)	239,4 ± 408,1 (26)	0,223	193,1 ± 232,7 (19)	212,8 ± 437,2 (22)	0,308
5. POT	141,0 ± 228,9 (38)	111,0 ± 191,8 (14)	158,5 ± 250,3 (24)	0,431	170,9 ± 224,0 (17)	116,8 ± 235,5 (21)	0,076
6. POT	130,3 ± 290,7 (28)	118,2 ± 220,2 (9)	136,1 ± 324,3 (19)	0,787	106,9 ± 191,0 (12)	147,9 ± 353,0 (16)	0,889
7. POT	75,84 ± 135,6 (35)	61,16 ± 98,26 (12)	83,51 ± 153,0 (23)	0,728	73,18 ± 97,12 (15)	77,84 ± 161,1 (20)	0,230

B	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Präop.	– (0)	107,6 ± 187,5 (4)	146,2 ± 204,0 (6)	7,582 ± 6,205 (6)	–
1. POT	578,1 ± 1.099 (7)	95,38 ± 54,91 (6)	410,9 ± 550,3 (10)	359,2 ± 273,5 (16)	0,141
2. POT	313,7 ± 353,7 (7)	134,3 ± 183,7 (7)	378,9 ± 369,4 (10)	763,9 ± 1.412 (12)	0,198
3. POT	324,4 ± 386,3 (8)	75,62 ± 82,32 (7)	289,4 ± 308,6 (11)	551,5 ± 1.308 (16)	0,168
4. POT	226,6 ± 295,1 (8)	44,59 ± 31,24 (7)	168,7 ± 187,0 (11)	291,3 ± 515,4 (15)	0,213
5. POT	160,4 ± 228,2 (9)	21,95 ± 9,704 (5)	182,7 ± 234,2 (8)	146,4 ± 264,6 (16)	0,080
6. POT	180,3 ± 292,9 (5)	40,60 ± 19,86 (4)	54,49 ± 44,62 (7)	183,7 ± 405,3 (12)	–
7. POT	88,17 ± 125,1 (7)	23,34 ± 5,100 (5)	60,07 ± 70,97 (8)	96,01 ± 183,8 (15)	0,520

C	Gruppe vs. Gruppe		p	Gruppe vs. Gruppe		p	
3. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,033	1. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,018
4. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,033	2. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,043
5. POT	Kein IRS + M	IRS + NM	0,008	5. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,047

**A4. Empfänger-Gesamtbilirubin präoperativ und am 1.–7. POT.** Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6) mit zusätzlicher Darstellung ausschließlich der signifikant verschiedenen Gruppen innerhalb der 3. Gruppeneinteilung (C). Mittelwerte mit Standardabweichung. Patientenzahl in runden Klammern.

A	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Präop.	11,49 ± 10,16 (46)	11,58 ± 9,027 (17)	11,43 ± 10,92 (29)	0,593	9,800 ± 8,566 (21)	12,91 ± 11,30 (25)	0,544
1. POT	7,211 ± 4,949 (46)	5,224 ± 2,665 (17)	8,376 ± 5,613 (29)	0,014	5,448 ± 3,317 (21)	8,692 ± 5,635 (25)	0,042
2. POT	6,163 ± 4,907 (46)	3,882 ± 2,661 (17)	7,500 ± 5,444 (29)	0,004	4,905 ± 3,583 (21)	7,220 ± 5,647 (25)	0,193
3. POT	6,444 ± 5,415 (46)	4,088 ± 2,963 (17)	7,824 ± 6,063 (29)	0,054	5,162 ± 3,927 (21)	7,520 ± 6,284 (25)	0,186
4. POT	5,967 ± 5,193 (46)	4,024 ± 3,912 (17)	7,107 ± 5,564 (29)	0,057	5,067 ± 4,328 (21)	6,724 ± 5,801 (25)	0,270
5. POT	5,633 ± 4,808 (45)	3,677 ± 3,745 (17)	6,821 ± 5,048 (28)	0,051	4,719 ± 4,289 (21)	6,433 ± 5,176 (24)	0,187
6. POT	5,073 ± 4,474 (44)	3,165 ± 2,116 (17)	6,274 ± 5,144 (27)	0,109	4,200 ± 3,764 (20)	5,800 ± 4,950 (24)	0,191
7. POT	4,809 ± 4,262 (44)	2,971 ± 2,145 (17)	5,967 ± 4,859 (27)	0,129	4,076 ± 3,926 (21)	5,478 ± 4,529 (23)	0,180

B	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Präop.	12,61 ± 8,996 (9)	10,43 ± 9,533 (8)	7,692 ± 7,952 (12)	14,08 ± 12,14 (17)	0,554
1. POT	5,000 ± 2,596 (9)	5,475 ± 2,897 (8)	5,783 ± 3,850 (12)	10,21 ± 6,028 (17)	0,014
2. POT	4,500 ± 3,191 (9)	3,188 ± 1,871 (8)	5,208 ± 3,963 (12)	9,118 ± 5,861 (17)	0,010
3. POT	4,844 ± 3,796 (9)	3,238 ± 1,424 (8)	5,400 ± 4,173 (12)	9,535 ± 6,697 (17)	0,071
4. POT	5,144 ± 5,109 (9)	2,763 ± 1,313 (8)	5,008 ± 3,882 (12)	8,588 ± 6,179 (17)	0,071
5. POT	4,711 ± 4,927 (9)	2,513 ± 1,180 (8)	4,725 ± 3,974 (12)	8,394 ± 5,304 (16)	0,034
6. POT	3,689 ± 2,576 (9)	2,575 ± 1,380 (8)	4,618 ± 4,602 (11)	7,413 ± 5,325 (16)	0,094
7. POT	3,211 ± 2,555 (9)	2,700 ± 1,702 (8)	4,725 ± 4,712 (12)	6,960 ± 4,901 (15)	0,132

C	Gruppe vs. Gruppe	p	Gruppe vs. Gruppe	p			
1. POT	Kein IRS + NM	IRS + M	0,005	4. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,001
2. POT	Kein IRS + NM	IRS + M	0,016	5. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,008
5. POT	Kein IRS + NM	IRS + M	0,047	6. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,003
1. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,048	7. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,028
2. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,001	1. POT	IRS + NM	IRS + M	0,034
3. POT	Kein IRS + M	IRS + M	0,002				

**A5. Empfänger- $\gamma$ -GT präoperativ und am 1.–7. POT.** Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6) mit zusätzlicher Darstellung ausschließlich der signifikant verschiedenen Gruppen innerhalb der 3. Gruppeneinteilung (C). Mittelwerte mit Standardabweichung. Patientenzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Präop.	295,3 ± 494,5 (22)	372,4 ± 673,7 (8)	251,3 ± 380,7 (14)	0,495	494,6 ± 762,0 (8)	181,4 ± 209,8 (14)	0,759
1. POT	113,5 ± 120,3 (39)	130,5 ± 186,0 (13)	105,0 ± 71,99 (26)	0,988	129,6 ± 163,0 (18)	99,67 ± 67,09 (21)	0,855
2. POT	117,0 ± 81,85 (37)	111,9 ± 81,12 (13)	119,8 ± 83,84 (24)	0,787	124,0 ± 86,98 (15)	112,3 ± 79,88 (22)	0,988
3. POT	172,6 ± 167,4 (37)	176,8 ± 160,2 (12)	170,6 ± 173,9 (25)	0,746	169,7 ± 144,0 (16)	174,8 ± 186,7 (21)	0,818
4. POT	179,8 ± 111,1 (35)	188,3 ± 85,02 (12)	175,3 ± 124,2 (23)	0,465	202,2 ± 93,18 (17)	158,6 ± 124,7 (18)	0,058
5. POT	221,6 ± 156,2 (36)	241,0 ± 171,0 (12)	211,8 ± 151,2 (24)	0,502	263,4 ± 159,7 (14)	195,0 ± 151,6 (22)	0,060
6. POT	283,4 ± 241,9 (22)	216,3 ± 98,40 (7)	314,7 ± 283,4 (15)	0,751	265,0 ± 96,52 (9)	296,2 ± 309,4 (13)	0,333
7. POT	249,8 ± 166,3 (20)	306,0 ± 215,8 (7)	219,5 ± 132,9 (13)	0,405	326,7 ± 191,5 (10)	172,9 ± 92,49 (10)	0,064

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Präop.	1.101 ± 1.312 (2)	129,7 ± 92,83 (6)	292,7 ± 522,5 (6)	220,3 ± 267,5 (8)	–
1. POT	176,3 ± 251,6 (7)	77,00 ± 26,24 (6)	99,82 ± 68,41 (11)	108,7 ± 76,65 (15)	0,896
2. POT	144,5 ± 108,1 (6)	84,00 ± 38,07 (7)	110,3 ± 73,55 (9)	125,5 ± 91,46 (15)	0,757
3. POT	231,5 ± 215,8 (6)	122,0 ± 51,84 (6)	132,6 ± 67,81 (10)	195,9 ± 217,2 (15)	0,781
4. POT	200,0 ± 86,49 (6)	176,7 ± 89,98 (6)	203,5 ± 100,7 (11)	149,5 ± 141,7 (12)	0,210
5. POT	292,8 ± 210,0 (6)	189,2 ± 117,4 (6)	241,3 ± 120,5 (8)	197,1 ± 166,1 (16)	0,298
6. POT	227,0 ± 125,0 (3)	208,3 ± 93,51 (4)	284,0 ± 85,76 (6)	335,2 ± 367,1 (9)	–
7. POT	355,5 ± 262,5 (4)	240,0 ± 157,9 (3)	307,5 ± 153,5 (6)	144,1 ± 36,10 (7)	–

<b>C</b>	Gruppe vs. Gruppe	p
7. POT	IRS + NM vs. IRS + M	0,047

**A6. Empfänger-AP präoperativ und am 1.–7. POT.** Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6) mit zusätzlicher Darstellung ausschließlich der signifikant verschiedenen Gruppen innerhalb der 3. Gruppeneinteilung (C). Mittelwerte mit Standardabweichung. Patientenzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
präop.	199,0 ± 192,2 (41)	229,8 ± 216,7 (16)	179,3 ± 176,7 (25)	0,240	175,2 ± 206,5 (19)	219,6 ± 181,3 (22)	0,055
1. POT	126,7 ± 111,7 (46)	139,5 ± 108,8 (17)	119,2 ± 114,6 (29)	0,665	109,8 ± 75,00 (21)	141,0 ± 135,1 (25)	0,242
2. POT	117,7 ± 101,2 (44)	110,9 ± 78,07 (15)	121,3 ± 112,4 (29)	0,552	95,65 ± 44,50 (20)	136,1 ± 129,3 (24)	0,248
3. POT	142,1 ± 101,1 (45)	148,3 ± 100,1 (16)	138,7 ± 103,3 (29)	0,972	126,1 ± 77,41 (21)	156,0 ± 118,0 (24)	0,381
4. POT	152,2 ± 86,88 (46)	161,0 ± 103,0 (17)	147,1 ± 77,42 (29)	0,882	146,8 ± 85,46 (21)	156,8 ± 89,55 (25)	0,620
5. POT	159,2 ± 80,65 (45)	161,5 ± 87,77 (17)	157,9 ± 77,65 (28)	0,888	152,5 ± 76,75 (21)	165,2 ± 85,10 (24)	0,517
6. POT	174,5 ± 82,38 (42)	180,9 ± 88,62 (15)	170,9 ± 80,22 (27)	0,710	164,3 ± 78,84 (18)	182,1 ± 85,80 (24)	0,496
7. POT	178,7 ± 88,77 (42)	180,0 ± 101,9 (15)	178,0 ± 82,63 (27)	0,945	172,8 ± 90,09 (20)	184,1 ± 89,32 (22)	0,686

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Präop.	235,7 ± 289,1 (9)	222,3 ± 76,17 (7)	120,8 ± 63,62 (10)	218,3 ± 216,4 (15)	0,112
1. POT	140,8 ± 102,3 (9)	138,1 ± 123,0 (8)	86,58 ± 35,31 (12)	142,3 ± 144,1 (17)	0,518
2. POT	104,9 ± 57,49 (8)	117,7 ± 101,3 (7)	89,50 ± 34,85 (12)	143,7 ± 141,4 (17)	0,497
3. POT	162,2 ± 104,4 (9)	130,3 ± 99,19 (7)	99,00 ± 33,18 (12)	166,7 ± 126,1 (17)	0,232
4. POT	181,7 ± 116,6 (9)	137,8 ± 86,91 (8)	120,6 ± 40,63 (12)	165,8 ± 91,96 (17)	0,358
5. POT	177,2 ± 98,75 (9)	143,8 ± 76,06 (8)	133,9 ± 52,36 (12)	175,9 ± 89,66 (16)	0,469
6. POT	194,7 ± 101,8 (7)	168,9 ± 80,41 (8)	145,0 ± 57,36 (11)	188,7 ± 90,17 (16)	0,519
7. POT	191,4 ± 116,9 (8)	167,0 ± 89,13 (7)	160,4 ± 70,05 (12)	192,1 ± 91,36 (15)	0,801

<b>C</b>	Gruppe vs. Gruppe		p	Gruppe vs. Gruppe		p	
Präop.	Kein IRS + M	IRS + NM	0,019	3. POT	IRS + NM	IRS + M	0,034

**A7. Empfänger-Faktor-V präoperativ und am 1.–7. POT.** Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6) mit zusätzlicher Darstellung ausschließlich der signifikant verschiedenen Gruppen innerhalb der 3. Gruppeneinteilung (C). Mittelwerte mit Standardabweichung. Patientenzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Präop.	39,80 ± 46,34 (5)	76,00 ± 63,64 (2)	15,67 ± 9,292 (3)	–	17,00 ± 12,73 (2)	55,00 ± 57,86 (3)	–
1. POT	52,27 ± 21,96 (35)	64,82 ± 15,66 (11)	46,52 ± 22,29 (24)	0,016	53,71 ± 17,40 (14)	51,31 ± 24,92 (21)	0,739
2. POT	72,28 ± 32,74 (35)	88,08 ± 20,48 (13)	62,95 ± 35,36 (22)	0,012	76,07 ± 28,74 (14)	69,76 ± 35,62 (21)	0,813
3. POT	87,28 ± 40,60 (32)	100,0 ± 36,62 (12)	79,65 ± 41,82 (20)	0,251	82,79 ± 41,15 (14)	90,78 ± 41,00 (18)	0,589
4. POT	95,56 ± 41,44 (34)	115,1 ± 43,65 (12)	84,91 ± 36,92 (22)	0,040	96,88 ± 39,89 (16)	94,39 ± 43,88 (18)	0,864
5. POT	100,0 ± 38,52 (28)	111,1 ± 42,15 (8)	95,60 ± 37,17 (20)	0,345	97,10 ± 45,11 (10)	101,7 ± 35,67 (18)	0,770
6. POT	120,7 ± 36,69 (15)	112,3 ± 43,40 (6)	126,3 ± 33,02 (9)	0,490	120,6 ± 40,39 (7)	120,9 ± 35,97 (8)	0,988
7. POT	123,4 ± 35,03 (17)	142,2 ± 37,13 (6)	113,2 ± 30,79 (11)	0,104	136,4 ± 36,48 (7)	114,3 ± 32,72 (10)	0,221

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Präop.	– (0)	76,00 ± 63,64 (2)	17,00 ± 12,73 (2)	13,00 (1)	–
1. POT	59,20 ± 16,22 (5)	69,50 ± 14,90 (6)	50,67 ± 18,19 (9)	44,03 ± 24,69 (15)	0,053
2. POT	87,33 ± 28,95 (6)	88,71 ± 11,80 (7)	67,63 ± 27,29 (8)	60,29 ± 39,97 (14)	0,284
3. POT	90,17 ± 44,97 (6)	109,8 ± 26,36 (6)	77,25 ± 40,23 (8)	81,25 ± 44,55 (12)	0,470
4. POT	102,7 ± 51,09 (6)	127,5 ± 34,82 (6)	93,40 ± 34,15 (10)	77,83 ± 39,08 (12)	0,108
5. POT	99,25 ± 51,81 (4)	123,0 ± 32,93 (4)	95,67 ± 45,23 (6)	95,57 ± 35,11 (14)	–
6. POT	108,3 ± 50,31 (4)	120,5 ± 40,31 (2)	137,0 ± 19,70 (3)	121,0 ± 38,56 (6)	–
7. POT	160,0 ± 3,464 (3)	124,3 ± 49,80 (3)	118,8 ± 41,00 (4)	110,0 ± 26,60 (7)	–

<b>C</b>	Gruppe vs. Gruppe	p	Gruppe vs. Gruppe	p
4. POT	Kein IRS + NM	0,048	1. POT Kein IRS + M	0,026
4. POT	Kein IRS + NM	0,016	4. POT Kein IRS + M	0,018

**A8. Empfänger-Laktat präoperativ, vor und nach Reperfusion, sowie am 1.–7. POT.** Vergleich entsprechend der 1., 2. (A) und 3. (B) Gruppeneinteilung (5.2.2.4, Tab. 5-6). Mittelwerte mit Standardabweichung. Patientenanzahl in runden Klammern.

<b>A</b>	Gesamt	Kein IRS	IRS	p	NM	M	p
Präop.	20,44 ± 18,30 (36)	25,21 ± 24,56 (14)	17,41 ± 12,64 (22)	0,380	23,44 ± 23,45 (16)	18,05 ± 13,01 (20)	0,555
Vor R.	43,88 ± 19,86 (41)	44,13 ± 23,11 (16)	43,72 ± 17,98 (25)	0,883	45,56 ± 17,87 (18)	42,57 ± 21,59 (23)	0,311
Nach R.	58,05 ± 18,74 (41)	58,00 ± 20,87 (16)	58,08 ± 17,70 (25)	0,904	63,67 ± 16,84 (18)	53,65 ± 19,33 (23)	0,034
1. POT	21,41 ± 15,18 (46)	20,00 ± 15,10 (17)	22,24 ± 15,43 (29)	0,546	21,81 ± 14,05 (21)	21,08 ± 16,35 (25)	0,589
2. POT	12,87 ± 8,445 (46)	11,47 ± 7,392 (17)	13,69 ± 9,028 (29)	0,361	11,95 ± 7,025 (21)	13,64 ± 9,552 (25)	0,782
3. POT	10,69 ± 7,474 (45)	10,94 ± 7,790 (17)	10,54 ± 7,416 (28)	0,944	10,15 ± 6,746 (20)	11,12 ± 8,121 (25)	0,991
4. POT	11,49 ± 20,55 (45)	8,294 ± 3,687 (17)	13,43 ± 25,88 (28)	0,741	8,400 ± 3,803 (20)	13,96 ± 27,36 (25)	0,791
5. POT	11,52 ± 22,06 (42)	7,000 ± 2,633 (16)	14,31 ± 27,80 (26)	0,136	8,000 ± 4,485 (19)	14,43 ± 29,51 (23)	0,365
6. POT	7,800 ± 3,502 (40)	7,267 ± 3,035 (15)	8,120 ± 3,778 (25)	0,602	8,056 ± 4,094 (18)	7,591 ± 3,018 (22)	0,945
7. POT	9,026 ± 4,283 (39)	9,067 ± 3,575 (15)	9,000 ± 4,746 (24)	0,706	9,111 ± 4,057 (18)	8,952 ± 4,566 (21)	0,777

<b>B</b>	Kein IRS + NM	Kein IRS + M	IRS + NM	IRS + M	p
Präop.	25,88 ± 28,25 (8)	24,33 ± 21,21 (6)	21,00 ± 19,15 (8)	15,36 ± 6,946 (14)	0,783
Vor R.	43,75 ± 20,75 (8)	44,50 ± 26,72 (8)	47,00 ± 16,23 (10)	41,53 ± 19,29 (15)	0,719
Nach R.	61,88 ± 16,45 (8)	54,13 ± 25,07 (8)	65,10 ± 17,89 (10)	53,40 ± 16,50 (15)	0,205
1. POT	24,22 ± 18,60 (9)	15,25 ± 8,763 (8)	20,00 ± 9,945 (12)	23,82 ± 18,50 (17)	0,706
2. POT	10,56 ± 6,267 (9)	12,50 ± 8,816 (8)	13,00 ± 7,640 (12)	14,18 ± 10,09 (17)	0,813
3. POT	12,11 ± 9,387 (9)	9,625 ± 5,854 (8)	8,546 ± 3,110 (11)	11,82 ± 9,071 (17)	0,847
4. POT	8,667 ± 4,301 (9)	7,875 ± 3,091 (8)	8,182 ± 3,545 (11)	16,82 ± 33,03 (17)	0,926
5. POT	6,556 ± 2,877 (9)	7,571 ± 2,370 (7)	9,300 ± 5,376 (10)	17,44 ± 35,26 (16)	0,425
6. POT	8,000 ± 3,665 (8)	6,429 ± 2,070 (7)	8,100 ± 4,606 (10)	8,133 ± 3,292 (15)	0,768
7. POT	10,50 ± 3,464 (8)	7,429 ± 3,155 (7)	8,000 ± 4,320 (10)	9,714 ± 5,060 (14)	0,389

# Veröffentlichungen

## Publikation

*Eggenhofer E, Rovira J, Sabet-Baktach M, Groell A, Scherer MN, Dahlke MH, Farkas SA, Loss M, Koehl GE, Lang SA, Melter M, Schlitt HJ, Geissler EK, Kroemer A.* Unconventional ROR $\gamma$ <sup>+</sup> T cells drive hepatic ischemia reperfusion injury. *J. Immunol.* 2013; 191(1): 480–487.

## Posterpräsentation

*Groell A, Scherer MN, Loss M, Farkas SA, Renner P, Sabet-Baktach M, Ruemmele P, Geissler EK, Schlitt HJ, Kroemer A, Eggenhofer E.* Aufklärung des adaptiven Pathomechanismus der ischämie-reperusionsbedingten Schädigung bei Lebertransplantation im Rahmen einer explorativen Patientenstudie. Frankfurt am Main: 22. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft, 2013.



## Danksagung

Mein Dank gebührt an erster Stelle Herrn Prof. Edward K. Geissler, PhD zum einen für die Anmerkungen und konstruktiven Vorschläge, die zu der Fertigstellung meiner Arbeit wesentlich beitrugen, und zum anderen für die Rolle des Erstgutachters meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Hans J. Schlitt danke ich für die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens in seiner Abteilung für Viszeralchirurgie. Ebenso danke ich in diesem Rahmen dem Einsatz des Transplantationsteams mit Prof. Dr. Marcus Scherer, Priv.-Doz. Dr. Martin Loss, Priv.-Doz. Dr. Stefan A. Farkas, Prof. Dr. Marc-H. Dahlke, PhD, Priv.-Doz. Dr. Sven Lang, Dr. Alexander Kroemer, Dr. Philipp Renner, Dr. Lucia Baier, Dr. Volker Benseler und Dr. Manije Sabet-Baktach. Insbesondere möchte ich meinen Dank auch an Roswitha Hofbauer des Transplantationsbüros für die gute Zusammenarbeit aussprechen.

Einen herzlichen Dank möchte ich hiermit an Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer für die gute Zusammenarbeit, exzellente Betreuung, spannenden Diskussionen und nicht zuletzt für die Ratschläge und Anmerkungen, die zu einem guten Gelingen dieser Dissertationsschrift beigetragen haben, aussprechen.

Ein großer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen des chirurgischen Labors, insbesondere My-Linh Ly, die mich hervorragend im Labor einarbeitete, und Lydia Schneider, Eva Scheiffert, Kathleen Burghardt, Teresa Mark, Azucena Martin Santos sowie Jolanta Tupiec für die exzellente technische Unterstützung.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstaedter und seinem Institut für Pathologie für die Färbung und Befundung der Biopsien danken, sowie Priv.-Doz. Dr. Petra Ruemmele für die Anleitung zum Auswerten der Leberdünnschnitte. Insbesondere geht mein Dank auch an Monika Kerscher für die immunhistochemische Färbung der humanen Biopsien und die gute Zusammenarbeit.

Nicht genug kann ich meinen Eltern Hildegard und Johann, meinen Geschwistern Carola und Daniel sowie meinem Freund Steffen danken, dass sie mich in allen Zeiten unterstützen und immer aufbauende Worte für mich übrig haben.



# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die der Universität Regensburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**»Der Einfluss im Mausmodell identifizierter  
T-Zellsubpopulationen und marginaler Organe  
auf den frühen Ischämie-Reperfusionsschaden  
der humanen Lebertransplantation«**

in dem Lehrstuhl für Chirurgie der Universität Regensburg unter der Betreuung von Prof. Edward K. Geissler, PhD ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- beziehungsweise Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ludwigsburg im Mai 2017

---

Anja Gröll