

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie

Prof. Dr. Björn Nashan

Korrelation des hepatischen Reperfusionsschadens mit Thrombozytenaktivierung und Tissue Factor Expression auf Monozyten nach orthotoper Lebertransplantation

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Gesine Steinig, geb. Röder
aus Grevesmühlen

Hamburg 2012

Tag der Disputation: 24.02.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. L. Fischer

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Reuter

3. Gutachter: PD. Dr. D. Benten

Inhaltsverzeichnis

1.	Arbeitshypothese und Fragestellung	6
1. a)	Arbeitshypothese	6
1. b)	Fragestellung	6
1. c)	Ziele.....	6
2.	Einleitung	7
2.1	Hintergrund	7
2.2	Frühe Komplikationen nach orthotoper LTX	8
2.2.1	Akute Abstoßung.....	8
2.2.2	Der Ischämie- Reperfusionsschaden (IRS).....	9
2.3	Die Rolle der Thrombozyten für den IRS	12
2.3.1	Thrombozyten- und Leukozytenmerkmale.....	13
2.3.1.1	CD 31	13
2.3.1.2	CD62p.....	13
2.3.1.3	CD 40L.....	14
2.3.1.4	Tissue Faktor	14
2.3.1.5	Tissue Faktor Pathway Inhibitor	15
2.3.1.6	GPIIb/IIIa	16
2.4	Die Rolle der Monozyten für den IRS	16
2.4.1	Monozytenmerkmale	17
2.4.1.1	CD 14.....	17
2.4.1.2	CD42a.....	17
2.4.2	Monozytenanbindung.....	18
2.4.2.1	Fibrinogen	18
2.4.2.2	Thrombospondin	18
3.	Material und Methoden	19
3.1	Übersicht	19
3.2	Patientenkollektiv	19
3.3	Labordiagnostik	20
3.3.1	Quick.....	20
3.3.2	Bilirubin	21
3.3.3	GOT	21

3.3.4	Gamma GT	21
3.4	Geräte	22
3.5	Durchflusszytometrie (Facs-Analyse)	22
3.6	Chemikalien	24
3.7	Untersuchung an Thrombozyten	25
3.7.1	Vorbereitung für Untersuchung an Thrombozyten	25
3.7.2	Thrombozyten ex-vivo Aktivierungszustand.....	26
3.8	Untersuchung im Vollblut.....	27
3.8.1	Probenvorbereitung für Untersuchungen im Vollblut.....	27
3.8.2	Expression von TF, TFPI und CD 11b	27
3.8.3	Bindungsfähigkeit von Fibrinogen, Thrombospondin und Faktor VIIa an Monozyten.....	28
3.9	Statistik.....	29
4.	Ergebnisse	30
4.1	Patientencharakteristika	30
4.2	Spendercharakteristika.....	31
4.3	Laborparameter.....	32
4.3.1	GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase).....	32
4.3.2	GLDH (Glutamatdehydrogenase)	34
4.3.3	Gamma GT (γ -GT, Gamma-Glutamyl-Transferase).....	35
4.3.4	CRP (C-reaktives Protein)	36
4.3.5	Quick im Serum.....	38
4.3.6	Gesamtbilirubin im Serum	40
4.3.7	Thrombozytenzahlen	42
4.4	Proteinexpression auf Thrombozyten	44
4.4.1	CD 62 p FITC	44
4.4.2	Thrombospondin PE.....	46
4.5	Proteinexpression auf Thrombozyten und Monozyten	48
4.5.1	Tissue Factor auf Thrombozyten	48
4.5.2	Tissue Factor auf Monozyten	50
4.6.2	TFPI auf Thrombozyten.....	52
4.6	Anbindung von Thrombospondin (FITC- markiert).....	55
4.6.1	Thrombozyten	55
4.6.2	Monozyten Thrombospondin	58

5.	Diskussion	60
6.	Zusammenfassung	65
7.	Publikationen	66
8.	Literaturverzeichnis	66
9.	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	78
10.	Danksagung.....	80
11.	Lebenslauf	81
12.	Eidesstattliche Erklärung.....	83

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

1. a) Arbeitshypothese

Ischämie- und Reperfusionsschaden sowie akute Transplantatabstoßung sind häufige Komplikationen nach Lebertransplantationen. Der Aktivierungszustand von Thrombozyten und zellständige Gerinnungssysteme auf Monozyten spielen potenziell eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Transplantatdysfunktion nach elektiv orthotoper Lebertransplantation (OLT_X).

1. b) Fragestellung

Korrelieren der Aktivierungszustand von Thrombozyten und des TF/TFPI-Systems auf Monozyten mit dem Ausmaß des Ischämie/Reperfusionsschadens und der akuten Abstoßung nach oLT_X?

1. c) Ziele

Hauptziele dieser Studie waren die durchflusszytometrische Untersuchung der Expression des gerinnungsauslösenden Tissue factor (TF) und seines Gegenspielers Tissuefactorinhibitor (TFPI) auf Monozyten und Thrombozyten vor und im frühen Verlauf nach orthotoper Lebertransplantation bei 23 Patienten. Ferner wurden die Bindungsfähigkeit von Thrombospondin 1 (Tsp), Fibrinogen und Faktor VII an Monozyten als Marker des Ausmaßes der Aktivierung evaluiert. Schließlich wurde der Aktivierungszustand der Thrombozyten anhand der Expressionsmuster von P-Selectin (CD62p), CD40L und PECAM (CD 31) untersucht. Die Bestimmung der hepatozellulären Schädigung ermittelt anhand von Gamma GT, GOT und GLDH. wurden mit dem Lebermetabolismus (Bilirubin) und Syntheseleistung der Leber (Quick) korreliert.

2. Einleitung

2.1 Hintergrund

Die Etablierung der Transplantation der Leber als Standardverfahren war ein entscheidender Schritt bei der Therapie des terminalen Leberversagens. Aufgrund der zunehmenden Diskrepanz zwischen Organbedarf und –angebot besteht jedoch eine Sterberate auf der Warteliste auf ein Organ von 10-20% (Neuhaus 2005, Everhart 1997).

Da sich die Anzahl der Spender nur begrenzt steigern lässt, müssen andere Lösungsansätze gefunden werden. Hier besteht z.B. die Option der Xenotransplantation (Tiere als Organspender) oder der Leberlebendspende (Entnahme eines Teiles der Leber aus einem gesunden lebenden Spender) als alternative Organquellen, sowie extrakorporale Leberunterstützungssysteme im Sinne einer Leberdialyse (Detoxikation). Diese Ansätze können jedoch nur zum Teil eine Lösung des Problems der Organknappheit bedeuten, da man z.B. bei letzterem ein Erholungspotential der Leber voraussetzt. Bei den Xenotransplantationen trifft man noch immer auf immunologische und funktionelle Hürden und Inkompatibilitäten der einzelnen Spezies. Somit beinhaltet die bessere Ausnutzung der bestehenden Organressourcen einen wesentlichen Lösungsansatz. Die Teilung des Spenderorgans („splitting“) und Verteilung auf zwei Empfänger (Kim 2004, Broering 2004) ist eine Option. Das frühe Erkennen sowie die schnelleinsetzende Therapie, bzw. das Vermeiden früher postoperativer Komplikationen eine Weitere. Letztgenanntes verbessert das Überleben des Transplantates, so dass eine eventuelle, den Organpool belastende Retransplantation vermieden werden kann. Zu Maßnahmen, die Auswirkungen auf den Transplantationserfolg haben, gehören unter anderem die Reduktion der kalten und warmen Ischämiezeiten, der geeignet modulierte Immunstatus des Empfängers sowie chirurgische Expertise bei der Ex- und Implantation des Organes (Schemmer 2004).

2.2 Frühe Komplikationen nach orthotoper LTX

Zwei der wesentlichsten frühen Transplantatfunktionsstörungen sind die akute Organabstoßungsreaktion und der Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden).

2.2.1 Akute Abstoßung

Bei der Abstoßungsreaktion handelt es sich um eine zellulär immunologische Reaktion auf Fremdgewebe, die eine Destruktion des Transplantates zur Folge haben kann. Die akute Abstoßungsreaktion nach LTX (Inzidenz 30 – 50 %), ist durch einen Wiederanstieg der Transaminasen nach ca. einer Woche oder später nach Transplantation gekennzeichnet. Eine akute Abstoßung jenseits von 3 Monaten ist selten, dann meistens bedingt durch inadäquate Immunsuppression (z.B. durch Noncompliance, reduzierte Absorption (Diarrhöen), Medikamenten-Interaktion). Unabhängig von der Immunsuppression gibt es individuelle Aspekte, welche die Inzidenz der Abstoßung beeinflussen. Zu diesen könnte der Aktivierungszustand von Thrombozyten- und Monozyten gehören (SOP Leitfaden LTX UKE 2.3.2. Anlage 02).

T-Zellen und T-Helferzellen starten und koordinieren die Abstoßungsreaktion. Das von den T-Helferzellen ausgeschüttete Lymphokin Interleukin 2 (IL2) vermittelt die Reaktion der zytotoxischen T-Zellen.

Eine Blockade der IL2 Rezeptoren (CD 25) auf aktivierten T-Zellen verhindert diese körpereigene Immunreaktion auf das Transplantat. Immunsuppressiva wie Tacrolimus, Cyclosporin A (Calcineurininhibitoren) und Corticoide gehören zur Standardmedikation der Prävention von Immunreaktionen gegenüber hepatischen Transplantaten. Die Serumspiegel müssen wegen der therapeutischen Breite und der Nephrotoxizität engmaschig kontrolliert werden.

Einen Hinweis auf eine mögliche Abstoßung liefert der Anstieg der Leberenzyme wie die Transaminasen, die Gamma GT, das Bilirubin. Zur Sicherung der Diagnose der Abstoßung erfolgt die Biopsie und Histologie der Leber. Trotz der Invasivität dieser Methode bleibt es das einzig sichere diagnostische Verfahren. Die Einteilung der histologischen Befunde erfolgt nach den Banff-Kriterien. Diese teilen speziell Antikörper-vermittelte Veränderungen in Transplantaten in verschiedene Kategorien ein. (Solez K 2008)

Im Falle eines histologischen Nachweises einer Abstoßungsreaktion wird die Einleitung einer Therapie mit Applikation von Steroidbolusgaben (500-1000 mg Prednisolon i.v. für 3 - 5 Tage) notwendig, gleichzeitig wird die Basisimmunsuppression erhöht, ggf. erfolgt eine Umstellung der Immunsuppression (SOP LTX Hamburg 2.3.2. Anlage 02).

Prognostisch ist die akute Abstoßungsreaktion reversibel. 95% der betroffenen Patienten weisen eine komplette Ausheilung der Abstoßung auf, lediglich 5% münden in eine chronische Abstoßung und als Rarität wäre eine fulminante Abstoßung zu erwarten (SOP LTX Hamburg 2.3.2. Anlage 02).

2.2.2 Der Ischämie- Reperfusionsschaden (IRS)

Der Ischämie- Reperfusionsschaden entsteht in den Geweben, die für eine bestimmte Zeit von der Blutversorgung abgeschnitten und dann durch Reperfusion wieder durchblutet sind. Mechanismen, die zu diesen Zellschäden führen sind sehr komplex und noch nicht vollständig erforscht. Freigesetzte Sauerstoffradikale und Entzündungsmediatoren durch aktivierte Kupffer-Zellen, sowie Störungen der hepatischen Mikrozirkulation durch vasokonstriktische Mechanismen in den Sinusoiden adhärerender Zellen scheinen eine Rolle zu spielen (Jaeschke 2003).

Es werden unter anderem Konservierungsschäden, die durch die Behandlung der Leber zwischen der Entnahme des Organs aus dem

Körper des Spenders und dem Einsetzen in den Empfänger entstehen, verantwortlich gemacht. In dieser sogenannten kalten Ischämiephase (Cold ischaemic time = CIT) ist die hypotherme Konservierung mit einer speziellen Konservierungsflüssigkeit, der UW-Lösung (University of Wisconsin Solution) oder HTK-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat) notwendig, um die metabolischen Prozesse in der Leber zu verlangsamen (Brettschneider 1980, Erhard 1995). Die kalte Ischämie wird durch die Anastomosierung der Gefäße des noch nicht durchblutenden Organs in eine warme Ischämie (warm ischaemic time = WIT) überführt. Dabei spielt der Zeitfaktor dieses Prozesses eine wichtige Rolle. So konnte nachgewiesen werden, dass der Transplantationserfolg von den Konservierungsschäden abhängig ist und deutlich mit der Konservierungszeit korreliert (Cywes 1993). Dieses bewies auch eine Studie von Totsuka und Mitarbeitern, in der gezeigt wurde, dass es zu signifikant größeren Zellschäden und häufigeren Transplantversagen mit deutlich erhöhten Transaminasewerten bei prolongierten CIT und WIT kommt (Totsuka 2004). Ähnliches wurde bei Ratten beobachtet. Es zeigte sich, dass bei Rattenlebern nach OLT mit einer warmen Ischämiezeit unter 30 Minuten keine bleibenden Schäden auftraten. Im Gegensatz dazu kam es bei Ratten bei denen die Ischämiezeit 60 Minuten betrug zur Einschränkung der Funktion und irreversiblen Veränderungen der histologischen Struktur des transplantierten Organs (He XS 2004). Es wurde durch eine multizentrische Studie von Porte et al 1998 bestätigt, dass die CIT möglichst unter 16h bleiben sollte, um ein langfristiges Überleben des Transplantates zu gewährleisten (Porte RJ 1998).

Die Akute Phase (<2 h) nach Reperfusion ist gekennzeichnet durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese Aktivierung führt zur Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Leber. Diese Neutrophilen schädigen die Leber direkt durch Freisetzung von Oxidantien, Proteasen und hydrolytischen Enzymen zytotoxisch (Lentsch 2000) und führen zu Mikrozirkulationsstörungen aufgrund der Verlegung der Sinusoide durch die Leukozytenaggregate bzw.

polymorphkernige Leukozyten/ Thrombozyten-Koaggregate (PMNL/TZ). Durch diese Minderdurchblutung und nachfolgende Reoxygenierung kommt es zur Schädigung der Endothelzellen, mit der Konsequenz des programmierten Zelltodes, der Apoptose (Gao et al 1998). Studien bewiesen, dass durch eine Zellverringering von Leukozyten und Thrombozyten im Perfusionsmodell einer Leberparenchymschädigung nach Ischämie /Reperfusion vorgebeugt werden konnte (Cywes 1993a) In der späteren Phase wird durch Ischämie und Reperfusion eine inflammatorische Reaktion induziert, welche die Ausschüttung von Mediatoren, den so genannten Cytokinen zur Folge hat. Ein wichtiger Faktor ist hier der Tumornekrosefaktor alpha (TNFalpha). Durch ihn wird die Expression von Adhäsionsmolekülen, den Selektinen, an hepatischen Endothelzellen gesteigert. Diese Up-Regulation der Selektine führt zur vermehrten Adhäsion von Thrombozyten und Neutrophilen Granulozyten an den Endothelzellen der Sinusoide in der Leber. Diese Thrombozytenanbindung hat die Transmigration von Chemokinen aus den Leukozyten in das Leberparenchym und somit die Apoptose der Zellen und daraus resultierender Dysfunktion der Leber zur Folge.

Ein weiterer TNF –abhängiger Mechanismus führt zur direkten Schädigung der Hepatozyten. Es wird die Expression von „neutrophil-attracting“ Chemokinen (CXC) gefördert. Dadurch treten die angelockten aktivierten Granulozyten und Leberzellen in direkten Zellkontakt via CD11/CD18 und dem interzellulären Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Lentsch 2000).

Zur Diagnostik der Reperfusionsschäden stehen, wie auch bei der Abstoßungsreaktion, neben der klinischen Untersuchung die Bestimmung von Laborparametern wie den Transaminasen (GOT, GPT), Bilirubin und Gerinnungsfaktoren zur Verfügung. Diese können jedoch oft nur unspezifische pathologische Veränderungen des Transplantates anzeigen. Dem hingegen sind durch Doppler-Sonografie und die Feinnadelbiopsie sensitivere Aussagen möglich. Die Nachteile bestehen in dem instrumentellen Aufwand und dem möglichen Auftreten von Komplikationen wie Blutungen, Infektionen etc.

D'Álessandro und Mitarbeiter zeigten 1991 jedoch, dass sich auch bei Patienten ohne pathologische Histologiebefunde nach LTX ein primäres Transplantatversagen (PNF) entwickeln kann.

Spezifische laborchemische Marker zur frühzeitigen Erkennung von Organdysfunktionen stehen derzeit nur begrenzt zur Verfügung. Eine Gewichtung liegt hier in der Bestimmung der Quick und Bilirubinwerte im Serum.

Prävention durch Beseitigung möglicher Ursachen stellt das wesentliche Ziel in der Behandlung des Reperfusionsschadens dar. Ist das Organ irreversibel geschädigt, ist die Retransplantation derzeit das einzige therapeutische Verfahren.

2.3 Die Rolle der Thrombozyten für den IRS

Die anukleären Thrombozyten haben einen Durchmesser von 2,5 bis 5 µm und weisen einen sehr komplexen Aufbau mit einem kanalikulären System auf, welches ihnen die Ausbildung von Pseudopodien ermöglicht und Beweglichkeit verleiht. Auf ihrer Zelloberfläche exprimieren sie zahlreiche Glykoproteine (GP), die als Rezeptoren fungieren und die Adhäsion an die verletzte Gefäßwand vermitteln. Im Zellinneren finden sich Mitochondrien und 2 Arten von Speichergranula. In den alpha-Glykogradula liegen u.a. von-Willebrand- Faktor (vWF), Thrombospondin, Fibrinogen und P-Selektin in gespeicherter Form vor. Die dichten beta- Granula enthalten ADP, ATP, Serotonin.

Die Adhäsion an die subendotheliale Matrix erfolgt über vWF und Kollagen. Es folgt eine Signalkaskade mit Sekretion der Granula und Thromboxansynthese, die als positive Verstärkermechanismen für weitere Aktivierungssignale fungieren. Es resultiert ein hochaffiner Zustand der Fibrinogenrezeptoren GP IIb/IIIa für Fibrinogen der benachbarten Thrombozyten und somit die Grundlage für die Aggregation.

2.3.1 Thrombozyten- und Leukozytenmerkmale

Es gibt viele Faktoren auf der Oberfläche von Thrombo- und Leukozyten, aber auch lösliche Proteine, die eine wichtige Rolle für die Interaktion miteinander und mit dem Endothel spielen. Hierzu zählen u.a. Selektine, Integrine, sowie Faktoren, die an spezielle Rezeptoren gebunden sind, wie Fibrinogen, von Willebrand Faktor, aktivierter Faktor VIIa und Thrombospondin.

Über die Rolle dieser Merkmale beim I/R-Schaden nach Lebertransplantationen ist bisher wenig bekannt. Meist lassen sich nur Hypothesen aus den allgemeinen Erkenntnissen der Interaktion der einzelnen Faktoren für deren Beteiligung am I/R-Schaden der Leber stellen.

2.3.1.1 CD 31

CD 31 oder Pecam-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) ist ein 130-140 kDa großes Oberflächenmolekül bzw. Rezeptor vieler Blutzellen, einschließlich der Thrombozyten, aber auch an gefäßständigen Endothelzellen. Durch die Bindung an Pecam-1 wird die Aggregation von Thrombozyten verhindert.

Falati und Mitarbeiter zeigten in ihren Untersuchungen, dass Pecam-1 defiziente Mäuse im Gegensatz zur Kontrollgruppe mit intakter CD 31-Expression eine bis zu 75% schnellere Gefäßocclusion vorweisen (Falati 2005).

2.3.1.2 CD62p

CD62p oder P-Selektin ist ein 120 kDa großes Membranprotein. Es ist in den alpha-Granula von Thrombozyten sowie in den Weibel-Palade-Körperchen in unstimulierten Endothelzellen lokalisiert. P-Selektin stellt einen gebräuchlichen Aktivierungsmarker für Plättchen in experimentellen Untersuchungen dar, da er nach Stimulierung durch Exozytose auf der Zelloberfläche exprimiert wird (Weyrich 1996).

Er vermittelt das Anbinden und Rollen von Leukozyten und auch von Thrombozyten an der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen (Khandoga, 2002a; 2002b).

Über das Glykoprotein P-Selektin können Plättchen direkt mit Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten interagieren. Als primärer Leukozytenrezeptor fungiert der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), der z.B auf Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten (PMNL) aktivierungsabhängig exprimiert wird (Evangelista 1999). Funktionell induzieren aktivierte Plättchen P-Selektinvermittelt die Produktion von Tissue-Faktor in Monozyten sowie Superoxidanionen bei PMNL und Monozyten (Nagata 1993). Thrombozyten können über P-Selektin die Expression von Zytokinen und Chemokinen wie IL-1b, IL-8 in Monozyten und PMNL und Monozytenchemotaktisches Protein-1 (MCP-1) in Monozyten induzieren (Weyrich 1995).

2.3.1.3 CD 40L

CD 40 Ligand (CD 40L, CD 154, TRAP-1) weist eine Größe von 33 kDa auf und bindet an seinen Rezeptor CD 40. Sein Vorkommen wurde für Endothelzellen (EC), Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten, Monozyten/Makrophagen und aktivierte Thrombozyten nachgewiesen (Henn 1998).

Durch die CD 40L/CD 40 Interaktionen wird das B-Zellwachstum induziert und außerdem der Antikörperswitch IgM/IgG vermittelt.

Als weitere wichtige Funktion gilt die Freisetzung von Zytokinen, wie TNF alpha und den Interleukinen IL-1, -6 und -8 aus peripheren Monozyten nach Ligation von CD 40L/ CD 40 (Kiener 1995; Monaco 2002).

2.3.1.4 Tissue Faktor

Tissue factor (TF), Thromboplastin, Faktor III oder CD 142 ist ein 45-47 kDa großes Protein, welches auf Endothel- und Epithelzellen expremiert wird. Laut Drake kommt TF in Grenzflächen um Organe und in den Gefäßwänden als ein so genannten „Haemostatic envelope“

(hämostatischer Mantel) vor, um den Körper im Fall einer Gefäßverletzung vor Blutverlusten zu schützen (Drake 1989). Er stellt den Rezeptor/ Kofaktor für den Blutgerinnungsfaktor VII oder den im Blut bereits aktiviert vorliegenden Faktor VIIa dar. Durch eine Komplexbildung mit diesem wirkt TF als Hauptinitiator der extrinsischen Gerinnungskaskade im Blut. Über diesen Komplex können mehrere Faktoren (VII, IX und X) nun gleichzeitig aktiviert werden. Somit wird die Gerinnung über einen positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt. Es sind nur geringe Mengen an TF notwendig, um ein Gefäß thrombotisch zu verschließen (Pötzsch 2010). Neben der Initiation der physiologischen Blutgerinnung ist Tissue Faktor auch an der disseminierten intravaskulären Gerinnung (DIC) bei Sepsis (Rivers 1992), sowie bei postoperativen Thrombosen und in der Artherosklerose beteiligt (Landers 1994). In den letzten Jahren wurden weitere Funktionen des Tissue Faktors in der Angiogenese, der Tumorangio-genese (Forster 2004) und für die Migration bzw. Transmigration von monozytären Zellen durch Endothelzellen beobachtet (Mackman 2004).

Während der Tissue Faktor in Zellen der Gefäßwand konstitutiv exprimiert wird, ist seit einigen Jahren bekannt, dass die Expression des Tissue Faktors in anderen Zellen des Gefäßsystems (Monozyten und Endothelzellen) durch eine Stimulation mit Entzündungsmediatoren oder Wachstumsfaktoren induziert werden kann (Zhou 2004).

2.3.1.5 Tissue Faktor Pathway Inhibitor

Tissue factor pathway inhibitor ist einer der wichtigsten Inhibitoren der physiologischen Blutgerinnung, da er bereits kurz nach der Initiierung der Gerinnung den Tissue Faktor/Faktor VIIa Komplex im aktiven Zentrum inhibiert. TFPI wird hauptsächlich von Endothelzellen, aber auch in stimulierten Monozyten synthetisiert (Van der Logt 1994). In einer Untersuchung unterschiedlicher Gewebe mit Hilfe von Northern Blots fand man außerdem eine Expression von TFPI in der Mikrovaskulatur von Lunge, Leber, Niere, Herz, Skelettmuskel und Gehirn (Bajaj 1999). Der Hauptanteil von TFPI ist an der Oberfläche

des Endothels lokalisiert. Der TFPI des Endothels besitzt seine volle Länge (45 kDa) und ist daher maximal inhibitorisch wirksam. Das Molekulargewicht des plasmaassoziierten TFPIs ist unterschiedlich (34-45 kDa). Der Plasma-TFPI besitzt daher nur eine schwache inhibitorische Wirkung. Ca. 8% an TFPI im Vollblut ist außerdem in Plättchen lokalisiert (45-47 kDa) und wird nach Stimulation mit Plättchenagonisten (Thrombin, Kollagen) freigesetzt und ist dann maximal inhibitorisch wirksam (Butenas 2002).

2.3.1.6 GPIIb/IIIa

Auf der Oberfläche von Thrombozyten fungiert der GPIIb/IIIa-Komplex als Hauptrezeptor für das Fibrinogen. Er ist aktivierungsabhängig, d.h. auf ruhenden Thrombozyten befindet sich nur eine geringe Zahl an Rezeptoren. Kommt es jedoch zu einer Aktivierung durch z.B. ADP, Thrombin oder Kollagen, nehmen die Anzahl der Liganden und damit die Bindungsfähigkeit für Fibrinogen enorm zu. Die Anbindung erfolgt mit den alpha- und Gamma-Ketten des Fibrinogenmakromoleküls. Nach Verschmelzung der beiden Proteine läuft eine Konformationsänderung im GPIIb/IIIa Rezeptor ab, so dass die beiden verborgenen Ketten IIb und IIIa mittels Antikörpern nachgewiesen werden können (Gawaz 1996).

2.4 Die Rolle der Monozyten für den IRS

Wie auch Thrombozyten spielen Monozyten in der Entstehung des I/R Schadens eine zentrale Rolle. Monozyten sind die Vorgänger von Gewebsmakrophagen, besitzen verschiedene Rezeptoren auf ihrer Oberfläche und sind zusätzlich Quelle verschiedenster Zytokine und Chemokine, die den inflammatorischen Prozess unterhalten.

Letztere sind verantwortlich für die gerichtete Bewegung von Monozyten und Lymphozyten und der Transmigration inflammatorischer Zellen (Boring 1997).

2.4.1 Monozytenmerkmale

2.4.1.1 CD 14

CD14 ist ein 55 kDa schweres Glukoprotein, das mit einem Teil außen an der Zellmembran verankert ist.

Zunächst wurde es als Monozyten-spezifischer Marker angesehen, inzwischen ist bekannt, dass es auch auf Granulozyten, Makrophagen (Ziegler-Heitbrock 1993) und auf B-Lymphozyten exprimiert wird (Labeta 1991). Der Ligand von CD14 ist unter anderem das bakterielle Endotoxin LPS. Die Affinität von CD14 zu LPS wird deutlich erhöht, wenn LPS zuvor mit dem Lipopolysaccharid Bindenden Protein (LBP), einem von Hepatozyten synthetisiertes Akut Phase Protein, einen Komplex bildet (Landmann 1996). Eine Stimulation der Leukozyten mit LPS führt in weniger als einer Stunde zu einer erhöhten Expression von CD14 (Kusunoki 1996). Aber auch Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane, als Zellwandbestandteile grampositiver Bakterien, können CD14 binden und zu einer Zellstimulation führen (Gupta 1996). Der wichtige Zusammenhang, dass eine Abhängigkeit zwischen CD14 und dem Komplementrezeptor CD11b besteht, wurde von Beller und Mitarbeitern herausgefunden (Beller 1982).

2.4.1.2 CD42a

CD42a oder GP IX ist ein relativ kleines Molekül, von 17-22 kDa, welches auf Plättchen und Megakaryozyten vorkommt. Dieses einkettige integrale Membranprotein bildet eine Verbindung mit CD 42a-d. Der CD 42 a, b, c, d- Komplex (insbesondere CD 42 b oder GP Ib alpha) dient als Rezeptor für vWF und Thrombin. Damit liegt auch die Funktion dieses Proteins in der Adhäsion von Thrombozyten an die subendotheliale Matrix und amplifiziert die Thrombozytenreaktion auf die thrombinabhängige Plättchenaktivierung (Fox 1988).

2.4.2 Monozytenanbindung

2.4.2.1 Fibrinogen

Fibrinogen stellt in der Gerinnungskaskade die Vorstufe des Fibrins dar. Durch die Bindung von Thrombin an die zentrale Domäne des bivalenten Fibrinogenmoleküls wird die Abspaltung der Fibrinopeptide A und B und somit die Bildung von Fibrin katalysiert. Die Vernetzung der Fibrinmonomere untereinander führt dann zur Stabilisierung des Thrombus (Jurk 2005).

Zirkulierendes Fibrinogen vermittelt nach Anbindung an den Liganden GPIIb/IIIa auf Thrombozyten die Aggregation untereinander als auch die Bildung von Koaggregaten mit z.B. PMNL.

2.4.2.2 Thrombospondin

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein in den α -Granula der Plättchen lokalisiertes Protein. Es wird nach Aktivierung aus den α -Granula der Plättchen mittels Exozytose ausgeschüttet, wobei es 25% des sezernierten Gesamtproteins ausmacht. Ein Teil davon wird an spezifischen TSP-1-Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche zurückgebunden (Kehrel 1996). Thrombospondin stellt wie CD62p einen Aktivierungsmarker auf Plättchen dar (Gawaz 1996).

TSP-1 kann von vielen Zellen, z.B. von Blutplättchen, Leukozyten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Keratinozyten oder Fibroblasten synthetisiert werden. Ein Kontakt von Plättchen mit Monozyten und die Differenzierung zu Makrophagen führt zu einer gesteigerten TSP-1-Synthese (Schwartz 1989). Sezerniertes Thrombospondin wird über spezifische Rezeptoren an Zellen zurückgebunden und kann auch in die extrazelluläre Matrix eingebunden werden (Dreyfus 1992). Thrombospondin ist somit als multifunktionelles Molekül nicht nur ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix, sondern es ist auch als Adhäsionsvermittler an einer Vielzahl interzellulärer Wechselwirkungen beteiligt. TSP-1 ist als Brückenmolekül bei der Plättchenaggregation während der Blutgerinnung beteiligt. Bei arteriosklerotischen Läsionen kann es aber auch die Monozyten- Plättchenadhäsion an das Subendothel vermitteln (Narizhneva 2005). Außerdem bewirkt es die

Plättchenadhäsion an Monozyten und PMNL, wodurch die Produktion von Superoxidanionen, Hapto- und Chemotaxis, Phagozytose- und Migrationsprozesse gefördert werden. Diese Leukozytenfunktionen spielen bei entzündlich-arteriosklerotischen Prozessen eine essentielle Rolle (Kehrel 1996).

3. Material und Methoden

3.1 Übersicht

Bei den Patienten wurden unmittelbar vor (entspricht Tag 0) der Lebertransplantation und 2, 4, 6 Tage nach der LTX jeweils 15 ml Citratblut peripher oder zentral venös abgenommen. Hiervon wurden 5 ml zur Plasmagewinnung für die Multimäranalyse verwendet und 10 ml für die FACS- Analyse verarbeitet.

3.2 Patientenkollektiv

In unserer Studie wurden insgesamt 23 Patienten nach elektiver orthotoper Lebertransplantation (OLT) untersucht. Das Patientenkollektiv bestand aus 7 Frauen und 16 Männern. Die Erkrankungen, die zur Op- Indikation führten, waren unterschiedlicher Genese.

Tabelle 1: Übersicht über die Indikationen zur Op

Indikation	I/R-Schaden	Abstoßung	Kontrolle
Virale Hepatitis	1	2	4
Metabolisch/toxisch	1	0	7
biliär	2	0	0
Autoimmun	0	1	1
Primär sklerosierend	0	1	2
kryptogen	0	0	1
Total	4	4	15

Alle Patienten wurden über die Studie aufgeklärt und erteilten schriftlich ihre Zustimmung zur Teilnahme.

Der Untersuchungszeitraum umfasste einen Zeitpunkt unmittelbar vor der OP und 2, 4, 6 Tage nach der OP (POD).

Retrospektiv konnten wir unsere Patienten in 3 Gruppen unterteilen:

1.) Patienten mit einem Serummaximum der GOT > 1500 U/l an POD 1 und/oder 2 bilden die Gruppe der Ischämie/Reperfusionsschaden („IRI“) (n=4) - Gruppe

2.) Patienten mit begrenztem Schaden in der 1. Woche (GOT < 1500 U/l) ohne Anhalt für eine Abstoßungsreaktion dienten als Kontrollgruppe (n=15).

3.) Patienten, bei denen innerhalb der 1. Wochen nach LTX eine akute Abstoßungsreaktion diagnostiziert wurde, bildeten die 3. Gruppe („Abstoßung“) (n=4)

3.3 Labordiagnostik

3.3.1 Quick

Für die Bestimmung des Quickwertes wurde das Innovin® Reagenz mit dem entsprechenden Analysegerät von Dade Behring benutzt. Dieses Reagenz besteht aus einer Mischung von rekombinatem Gewebefaktor und synthetischen Thromboplastin, Calcium Puffer und Stabilisatoren. Es ist zugelassen unter anderem für die Bestimmung der exogenen Gerinnungsfaktoren [Hirsh 1991] und zeigt eine hohe Sensitivität.

Mit Hilfe des ISI-Wertes (International Sensitivity Index) können die Patientenwerte als International Normalized Ratio (INR) angegeben werden. [Hawkins 1991]

3.3.2 Bilirubin

Der in vitro Test zur quantitativen Bestimmung von Gesamtbilirubin in Serum und Plasma mit dem Analyseautomaten von Roche entspricht der Wahlefeld et al Methode [Wahlefeld 1972]. Hierbei wird das Diazo-Reagenz (2,5-Dichlorphenyldiazoniumtetrafluorborat) bei pH 1-2 an Bilirubin gekoppelt und es entsteht Azobilirubin, welches photometrisch gemessen werden kann.

3.3.3 GOT

Wie schon die vorhergehenden Parameter wurde auch dieser im Labor der Klinischen Chemie im UK Eppendorf gemessen. Verwendet wurde der in vitro Test zur quantitativen Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (AST) bzw. Glutamat-Oxalacetat- Transaminase (GOT) im Serum mit dem Analyseautomaten von Roche. Dieser Nachweis basiert auf den Empfehlungen der International Federation of Clinical Chemistry (Schumann 2002) und wurde nachträglich noch optimiert. Über die Bildung von Oxalacetat wird das Enzym indirekt photometrisch gemessen.

3.3.4 Gamma GT

Bei diesem enzymatischen Farbttest zum Nachweis der Gamma-Glutamyltransferase im Humanserum und- plasma wird das Substrat L-γ-Glutamyl-3-carboxy-4-nitranilid mit dem Akzeptor Glycylglycin versehen. Dabei wird 5-Amino-2-nitrobenzoat freigesetzt und durch das Analysegerät von Roche photometrisch detektiert. Dieser Nachweis bezieht sich auf Untersuchungen von Szasz aus dem Jahr 1969. Eine verbesserte Methode wurde 1976 durch einen Substratwechsel durch Persijn und van der Slik erreicht. Auf dieser basiert die heutige Untersuchung.

3.4 Geräte

Durchflusszytometrie

- Durchflusszytometer: FACScan [Becton Dickinson, Heidelberg]
- Computersystem: HP9000 [Hewlett Packard, Böblingen]
- Computersystem: PowerMacC4 [Apple, U.S.A.]
- Steuer- /Auswerteprogramme: FACScan [BD, Heidelberg], CellQuest
- Drucker: Phaser 750 [Tectronix, USA]

Zentrifuge: 5810 R [Eppendorf, Hamburg]

Schüttler: KS 501 digital [IKA, Staufen]

Chemikalienwaage: Adventurer AR 2140 [Ohaus, Giessen]

ph-Meter: MP 220 [Mettler-Toledo, CH-Schwarzenbach]

Mikroskop: CX 41 [Olympus, Hamburg]

3.5 Durchflusszytometrie (Facs-Analyse)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, mit der man optische Eigenschaften einzelner Zellen durch Anregung mittels Laserlicht messen und analysieren kann. Es entsteht dabei Streulicht, wodurch man auf die relative Zellgröße, Granularität der Zellen, sowie auf Fluoreszenzintensitäten markierter Zellen schließen kann.

Für die Analyse werden die in Suspension befindlichen Zellen durch eine Stahlkapillare mittels Überdruck in die Messkammer transportiert. Hier werden die Zellen von der zugeführten Trägersubstanz erfasst und beschleunigt. Durch die Verengung der Kammer und durch die Auftrennung durch die Trägersubstanz passieren nun die Zellen einzeln nach einander aufgereiht den Analysenpunkt (Laserstrahl). Das von uns verwendete FACS-Gerät FACScan der Firma Becton- Dickinson arbeitet mit einem Argonlaser. Passiert eine Zelle den Laserstrahl, ändert sich die Richtung des anregenden Lichtes, es entsteht ein Streulicht. Wird dieses in Richtung des einfallenden Strahles gestreut, spricht man von Vorwärtsstreuung (forward light scatter, FSC). Dieses

Signal gibt Informationen über die Zellgröße. Eine Streuung des Lichtes in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl bezeichnet man als Seitwärtsscatter (sidescatter, SSC) und dieses charakterisiert die Morphologie, also Granularität und Membraneigenschaften. Zellantigene können mit unterschiedlichen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert werden. Trifft der Laserstrahl nun auf solche, führt dieses zu einer Anregung der Fluoreszenzen und Emission von Fluoreszenzlicht in jeweils charakteristischen Wellenlängen. In unserer Arbeit verwendeten wir 3 Fluorochrome: Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-Protein (PerCP). Zur Detektion der unterschiedlichen Fluoreszenzen wird das Licht durch verschiedene Filter geleitet, logarithmisch verstärkt und in elektronische Signale umgewandelt. Die registrierten Signale werden durch einen Analog-/Digitalwandler digitalisiert und einer bestimmten Kanalzahl (hier 1024) zugeordnet. Durch ein Datenverarbeitungsprogramm können die Messdaten nun per Computer zur Auswertung gebracht werden. Man kann die Einparameterdarstellung, in Form eines Histogramms (Zellzahl gegen Zahl der Kanäle) oder die Zweiparameterdarstellung als Dot plot (Punktehistogramm) wählen. Beim Dot plot ist es durch Darstellung von FSC und SSC möglich, einzelne Zellpopulationen von einander zu unterscheiden. Außerdem besteht hierbei die Möglichkeit durch Einrahmen („Gaten“) einzelner Populationen, diese zu markieren, um sie z.B. unabhängig in die Messung bzw. in die Zählung einzubeziehen (Raffael 1988).

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit verwendet, um die aktivierungsabhängige Anbindung von Antikörpern oder Adhäsionsproteinen an Thrombozyten, Monozyten und Leukozyten zu erfassen und um quantitativ die Assoziate dieser Zelltypen zu bestimmen.

Um eine Vergleichbarkeit von an verschiedenen Tagen gemessenen Proben zu gewährleisten, wurde die Durchflusszytometereinheit regelmäßig mit dem Eichkit 3 von BD geeicht.

3.6 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

Name des Antikörpers	Fluoreszenz	Bezugsquelle
Anti TF	FITC	Loxo, Dossenheim
Anti TFPI	FITC	Loxo, Dossenheim
CD62p	FITC	Immunotech, Hamburg
CD42a	FITC	Immunotech, Hamburg
CD31	FITC	Immunotech, Hamburg
CD11b	FITC	BD, Heidelberg
CD14	FITC	Immunotech, Hamburg
GPIIb/IIIa	FITC	BD, Heidelberg
Anti-vWF	FITC	Serotec, Düsseldorf
CD42a	PerCP	BD, Heidelberg
CD40L	PE	BD, Heidelberg
CD14	PE	BD, Heidelberg

Tabelle 3: Andere Chemikalien

Trypanblau 0,4%	Sigma, Deisenhofen
Lysepuffer	BD, Heidelberg
Formaldehyd(0,4%;1%)	Sigma, Deisenhofen
PBS-Puffer(7,4;)	Sigma, Deisenhofen
Tyrodepuffer	Sigma, Deisenhofen

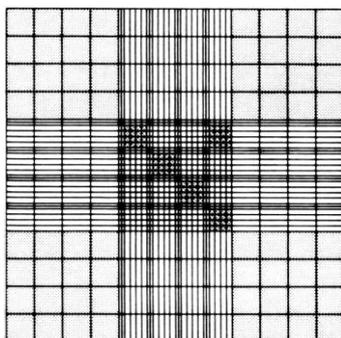
Faktor II, Thrombospondin und Fibrinogen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. B. Kehrel, Klinische und

experimentelle Hämostasiologie, Klinik für Anästhesiologie; Universität Münster.

3.7 Untersuchung an Thrombozyten

3.7.1 Vorbereitung für Untersuchung an Thrombozyten

Voraussetzung für die Untersuchung ist die Herstellung von Plättchenreichem Plasma (PRP). Um die Thrombozyten von den anderen Blutbestandteilen zu trennen, zentrifugierten wir das Blut 10 Minuten bei 900 rpm (150g), ohne Bremse bei Raumtemperatur. Nach dem Zentrifugieren wurde der jetzt plättchenreiche Plasmaüberstand mit einer Kunststoffpipette abgenommen und in ein Reagenzröhrchen gefüllt. Für die Thrombozytenzählung wurde das Plasma vorbereitet. Dazu wurde eine 1:20 Verdünnung des Plasmas mit Trypanblau (0,4 %) hergestellt. Von dieser Menge wurden 10 µl abgenommen und in eine Neubauerzählkammer gefüllt. Anschließend wurde die Zählkammer zur Sedimentation in eine feuchte Kammer gegeben. Nach 10 Minuten konnten die Zellen gezählt werden. Es wurden 5 Felder gezählt, die zur Berechnung der Thrombozytenzahl pro µl mit 1000 multipliziert wurden. Das PRP wurde auf 50000 Zellen/µl eingestellt.



Neubauer Zählkammer

3.7.2 Thrombozyten ex-vivo Aktivierungszustand

Der qualitative und quantitative Nachweis der Thrombozytenaktivierung ist mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich. Dabei werden Veränderungen an Membranproteinen direkt oder indirekt detektiert. Je nach Zielparameter wird eine Abnahme oder ein Zuwachs von Proteinen oder Antikörpern auf der Plättchenoberfläche bestimmt.

Für diese Untersuchung wurde das eingestellte PRP 30 Minuten in einem Verhältnis von 1:1 mit 1%em Formalin bei RT fixiert. Damit es hier zu keiner Verfälschung der Werte durch eventuelle Aktivierung kommt, durften die Röhrchen während dieser Zeit nicht bewegt werden. Im Anschluss erfolgte der Waschvorgang, in dem wir dem fixierten PRP in einem Verhältnis von 1:1 PBS-Puffer zufügten und bei 2100 rpm 10 min. zentrifugierten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet resuspendiert. 10 µl des jeweiligen Antikörpers wurde in ein Facs-Röhrchen vorgelegt und dann 100µl des fixierten PRP dazugegeben. Es erfolgte dann die 45 Minuten dauernde Inkubation im verdeckten Karton und unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation wurde 1000 µl PBS zugegeben und 10 Minuten mit 2100 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Probe auf ein Volumen von 1000µl mit PBS aufgefüllt. Jetzt erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der jeweiligen Faktoren.

PBS-Puffer:	pH 7,4
NaCl	137 mM
KCl	2,6 mM
Na ₂ HPO ₄	8,0 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM

3.8 Untersuchung im Vollblut

3.8.1 Probenvorbereitung für Untersuchungen im Vollblut

Für die Bestimmung von Expression von CD 11b, Tissue Factor und Tissue Factor Pathway Inhibitor auf Monozyten und der Bindungsfähigkeit von Fibrinogen, Thrombospondin und Faktor VII an Monozyten wurde Citrat- Vollblut von Patienten innerhalb einer Stunde nach Blutentnahme verarbeitet.

Es wurde eine schonende Behandlung der Zelltypen zur Vorbereitung zur durchflusszytometrischen Analyse gewährleistet, in dem eine nahezu zellunschädliche Fixierung gewählt wurde. Als Fixierflüssigkeit verwendeten wir deshalb 0,4 %es Formalin. Eine spezielle Lyse der Erythrozyten (Lysepuffer von Becton Dickinson) sollte präparativ bedingte Zellartefakte minimieren. Die Lyse durfte erst nach der Fixierung und Markierung der Zellen erfolgen, da es sonst durch die Aktivierung der Thrombozyten durch freigesetztes ADP zu einer Verfälschung der Messungen gekommen wäre.

3.8.2 Expression von TF, TFPI und CD 11b

Monozyten exprimieren nach Aktivierung auf ihrer Oberfläche Faktoren, wie z.B. CD11b Tissue Factor (TF) und dessen Gegenspieler Tissue Factor Inhibitor (TFPI),.

Anfänglich wurde die entsprechende Menge Vollblut mit 0,4 % Formalin in einem Verhältnis von 1:1 für 30 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden 1000µl Tyrodepuffer zugesetzt und bei 1600rpm (450 g) 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet resuspendiert. Für den Nachweis von CD11b benutzten wir folgende Antikörper: CD14 FITC, CD 42a PerCP und CD 11b PE. Um TF und TFPI auf den Monozyten nachzuweisen, benutzten wir CD14 PE, CD42a PerCP und TF FITC. Wir legten diese Antikörper vor, fügten dann 100 µl fixiertes Vollblut dazu und inkubierten dann die Probe 45 Minuten bei RT unter Lichtabschluss und bei leichtem Schütteln. Nach

dem Waschvorgang mit Tyrodepuffer führten wir die Lyse der Erythrozyten mit dem Lysereagenz durch.

Bei der Lyseragenz handelte es sich um eine 10-fach konzentrierte Mischung aus Ammoniumchlorid, Potassium Bicarbonat und EDTA.

Das Lysereagenz verdünnten wir in einem Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser. Es wurde sofort kräftig geschüttelt und unter Sicht lysiert, bis die Flüssigkeit klar wurde, maximal 10 Minuten. Dann wurde der Vorgang mit Tyrodepuffer in einem Verhältnis von 1:1 abgestoppt und anschließend zentrifugiert.

Abschließend wurde noch einmal mit Tyrodepuffer gewaschen und für die Analyse mittels Durchflusszytometer auf 600 µl aufgefüllt.

3.8.3 Bindungsfähigkeit von Fibrinogen, Thrombospondin und Faktor VIIa an Monozyten

In dieser Experimentreihe erfolgte die Ermittlung der Quantität an gebundenen Fibrinogen, Thrombospondin sowie Faktor VII an aktivierten Monozyten.

Für diese Analyse wurde eine Menge an Protein, abhängig von der jeweiligen Ausgangskonzentration, mit dem unbehandelten Vollblut vermischt, so dass sich ein Gesamtvolumen von 200µl ergab.

Diesem Ansatz wurde nun zur Fixierung in einem Verhältnis 1:1 0,4%es Formalin zugegeben. Nach 30 Minuten erfolgte der Waschvorgang unter Zugabe von Tyrodepuffer und Zentrifugation bei 450g für 10 Minuten bei RT. Anschließend erfolgte das Absaugen des Überstandes. Nach Vorlage von 10µl Antikörper (CD 14PE) inkubierte die Probe unter leichtem Schütteln bei RT für 45 Minuten. Darauf erfolgten der Waschvorgang und die Lyse wie unter Expression von TF, TFPI und CD 11b beschrieben.

- Tyrode-Hepes-Puffer:	NaCl	140 mM
	KCl	2,7 mM
	NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
	NaHCO ₃	12,0 mM
	D(+)-Glucose	5,5 mM
	Hepes	5,0 mM
	MgCl	21,0 mM

3.9 Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse durch den Vergleich der Mittelwerte wurde der studentische t-Test für ungepaarte Daten verwendet.

Der z-Test wurde zum Vergleich von Verhältnissen durchgeführt und außerdem verwendeten wir den Anova-Test für Vergleich zeitlicher Verläufe.

Eine statistische Signifikanz wurde für Werte (*) $p < 0,05$ angenommen, wobei ein Wert (***) $p < 0,001$ als hochsignifikant angesehen wurde.

Die Auswertungen erfolgten mittels der Software Sigmastat 3, SPSS, Deutschland.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Tabelle 4: Patientencharakteristika

Gruppe	Patienten-nummer	UNOS_ Status	Transplantat	Blutgruppe	Geschlecht	Ätiologie der Leberzirrhose	Calcineurin- Inhibitor
Kontrolle	1	2	Vollorgan	A	m	Virushepatitis	Cyclosporin A
	2	4	Vollorgan	A	m	biliär	FK 506
	3	3	Vollorgan	B	m	ethyltoxisch	Cyclosporin A
	7	2	Vollorgan	A	m	ethyltoxisch	Cyclosporin A
	9	4	Splitleber	B	m	autoimmun	FK 506
	10	3	Vollorgan	0	m	Virushepatitis	Cyclosporin A
	11	3	Vollorgan	B	m	ethyltoxisch	Cyclosporin A
	12	3	Splitleber	A	m	ethyltoxisch	Cyclosporin A
	14	4	Splitleber	A	m	ethyltoxisch	Cyclosporin A
	15	2	Vollorgan	0	w	ethyltoxisch	Cyclosporin A
	16	2	Vollorgan	A	m	biliär	FK 506
	18	2	Vollorgan	B	w	andere	FK 506
	20	4	Splitleber	A	m	biliär	FK 506
	22	2	Vollorgan	0	m	ethyltoxisch	Cyclosporin A
23	3	Vollorgan	0	w	andere	Cyclosporin A	
IRI	4	3	Vollorgan	0	m	biliär	FK 506
	6	3	Vollorgan	AB	w	Virushepatitis	Cyclosporin A
	17	2	Vollorgan	A	w	biliär	Cyclosporin A
	21	3	Vollorgan	0	m	ethyltoxisch	Cyclosporin A
Abstoßung	5	3	Splitleber	0	w	autoimmun	FK 506
	8	2	Vollorgan	0	m	Virushepatitis	Cyclosporin A
	13	3	Vollorgan	A	w	Virushepatitis	Cyclosporin A
	19	4	Vollorgan	A	m	biliär	FK 506
p_Value		0,531	0,391	0,539	0,184	0,755	1

Die Vergleichsgruppen (Kontrolle, Ischämie- und Reperfusionsschaden (IRI) und Abstoßung) wurden hinsichtlich verschiedenster Charakteristika auf Unterschiede wie UNOS-Kriterien (United Network for Organ Sharing severity of illness scoring system), Geschlecht, Blutgruppe untersucht, wobei sich keine signifikanten Unterschiede erkennen ließen.

4.2 Spendercharakteristika

Tabelle 5: Spendercharakteristika

		N	Mean	StdAbweich.	Minimum	Maximum	p-Value
Kalte Ischämie- zeit (min)	Kontrolle	15	623,53	180,5	288	897	0,556
	IRI	4	545,75	160,22	350	742	
	Abstoßung	4	681,25	165,91	476	818	
	Gesamt	23	620,04	172,28	288	897	
warme Ischämie- zeit (min)	Kontrolle	15	31,6	10,89	20	57	0,706
	IRI	4	35,25	14,5	20	50	
	Abstoßung	4	37	17,3	17	57	
	Gesamt	23	33,17	12,25	17	57	
Erythrozyten- konzentrate (n)	Kontrolle	15	18,13	13,29	0	45	0,895
	IRI	4	19,5	10,97	7	31	
	Abstoßung	4	22	22,14	3	54	
	Gesamt	23	19,04	14,07	0	54	
FFP (n)	Kontrolle	15	43,4	23,78	12	91	0,714
	IRI	4	41,25	24,62	17	68	
	Abstoßung	4	55,75	46,54	24	123	
	Gesamt	23	45,17	27,63	12	123	
Thrombo- zytenkon- zentrate (n)	Kontrolle	15	6,53	5,26	0	19	0,325
	IRI	4	9,25	5,68	5	17	
	Abstoßung	4	11	6,63	2	18	
	Gesamt	23	7,7826	5,6	0	19	
Empfänger Alter (Jahre)	Kontrolle	15	49,93	9,66	31	66	0,517
	IRI	4	46,25	14,27	30	61	
	Abstoßung	4	43,5	9,33	35	53	
	Gesamt	23	48,17	10,28	30	66	
Spender Alter (Jahre)	Kontrolle	15	36,6	13,04	18	60	0,089
	IRI	4	51,5	9,04	41	60	
	Abstoßung	4	44,25	7,72	35	52	
	Gesamt	23	40,25	12,74	18	60	
Spender Leukozyten (x100/µl)	Kontrolle	14	23,84	33,91	9	141	0,881
	IRI	4	15,8	3,57	11,3	19,5	
	Abstoßung	4	20,6	12,68	8	37,8	
	Gesamt	22	21,79	27,32	8	141	
Spender Thrombo- zyten (x100/µl)	Kontrolle	14	225	133,24	104	628	0,52
	IRI	4	146	13,78	130	163	
	Abstoßung	4	222	129,66	77	371	
	Gesamt	22	210,09	119,9	77	628	
Spender Natrium (mmol/l)	Kontrolle	15	146,6	6,21	138	157	0,388
	IRI	4	142	6,68	133	148	
	Abstoßung	4	146,5	2,89	143	150	
	Gesamt	23	145,78	5,91	133	157	
Spender Bilirubin (mg/dl)	Kontrolle	15	0,85	0,46	0,4	1,9	0,143
	IRI	3	0,8	0,56	0,3	1,4	
	Abstoßung	4	0,34	0,13	0,2	0,5	

		N	Mean	StdAbweich.	Minimum	Maximum	p-Value
	Gesamt	22	0,75	0,46	0,2	1,9	
Spender GOT (IU/l)	Kontrolle	14	39,49	30,35	5	95	0,819
	IRI	4	29,75	22,37	11	62	
	Abstoßung	4	35,5	17,71	13	54	
	Gesamt	22	36,99	26,48	5	95	
Spender Quick (%)	Kontrolle	13	84,77	25,05	45	131	0,773
	IRI	4	84,25	14,45	73	105	
	Abstoßung	4	73	48,35	15	129	
	Gesamt	21	82,43	27,94	15	131	
Spender Blutzucker (mg/dl)	Kontrolle	13	188,69	125,7	76	462	0,812
	IRI	3	196,33	130,48	120	347	
	Abstoßung	4	148,25	52,16	104	218	
	Gesamt	20	181,75	111,82	76	462	
Spender Kreatinin (mg/dl)	Kontrolle	15	0,93	0,3	0,6	1,6	0,693
	IRI	4	0,88	0,38	0,6	1,4	
	Abstoßung	4	0,78	0,38	0,5	1,3	
	Gesamt	23	0,89	0,32	0,5	1,6	

Die Spendercharakteristika wie Leberenzyme, Natrium, Blutbild, Gabe von Blutprodukten usw. waren nicht signifikant unterschiedlich (einfaktorielle ANOVA (analysis of varianz)).

Lediglich im Alter der Spender (einfaktorielle ANOVA, $p=0,08$) gab es einen Trend zu erkennen. So waren die Patienten in der Kontrollgruppe im Mittel mit 36,6 Jahren ($\pm 13,04$) jünger als die IRI- Gruppe mit 51,5 Jahren ($\pm 9,04$) und die Abstoßungsgruppe mit 44,25 Jahren ($\pm 7,72$). Ein post-hoc LSD Test ($p=0,037$) erhärtete diesen statistischen Trend zwischen der Kontrollgruppe und den IRI- Patienten.

4.3 Laborparameter

4.3.1 GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase)

Die GOT ist in den Hepatozyten hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert, liegt aber auch zu 20% im Zytoplasma vor. Sonstiges Vorkommen: in Leber, Herz- und Skelettmuskulatur, (Hagemann O, Laborlexikon, e-journal, ISSN 1860-966X)

Die Normbereiche liegen bei Frauen bei 10-35 U/l und bei Männern bei 10-35U/l.

Zur Bestimmung der Leberenzyme nutzten wir das Labor für Klinische Chemie an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf.

Eine Erhöhung der jeweiligen Leberenzyme lässt aufgrund der Lokalisation in der Leberzelle auf den Schweregrade der hepatischen Schädigung schließen.

So kommt es bei leichten Leberschäden zum Anstieg der membrangebundenen Gamma GT. Schwerere Leberschäden führen zum Anstieg der GOT und der zytoplasmatischen GPT. Bei schweren Leberschäden steigen die mitochondriale GLDH und GOT an.

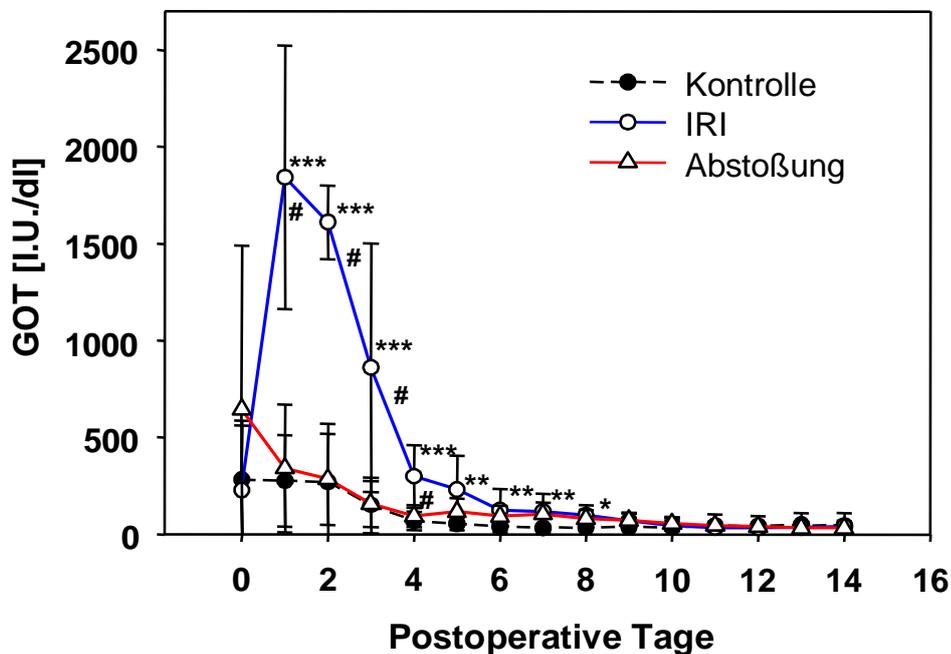


Abbildung 1: Serum GOT im postoperativem Verlauf der IRI- Gruppe und der Abstoßungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

Bei der IRI-Gruppe zeigt sich postoperativ sogleich ein stark signifikanter Anstieg dieses Leberenzym. Am 1. postoperativem Tag (POD) ($p = <0,001$) erreicht die IRI- Gruppe ihr Maximum mit einem Wert von 1842,5 U/dl \pm 680,4 U/dl. Ab dem 2. POD sinken die Werte, liegen bis zum 8. POD signifikant über den Werten der Abstoßungsgruppe und der Kontrolle.

Die Abstoßungsgruppe hat im Vergleich zur IRI- Gruppe und zur Kontrolle einen höheren Ausgangswert, ab dem 1. POD zeigen sich nahezu vergleichbare Werte zwischen Patienten der Abstoßungsgruppe und der Kontrollgruppe und damit sehr ähnliche Kurvenverläufe ohne signifikante Unterschiede.

Es zeigt sich hier sehr deutlich, dass es bei IRS-Gruppe im frühen postoperativen Verlauf zu einer Leberzellschädigung kommt, Dieses zeigt sich durch erhöhte GOT Werte mit einem Maximum am 1. POD, wohingegen die GOT der Abstoßungs- und Kontrollgruppe fast normwertig war.

4.3.2 GLDH (Glutamatdehydrogenase)

Die GLDH ist in den Hepatozyten hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert und weitgehend leberspezifisch und dient somit als Indikator für die Abschätzung des Leberzelluntergangs und damit des Leberschadens. (Hagemann O, Laborlexikon, e-journal, ISSN 1860-966X)

Der Referenzbereich liegt bei Frauen bis 5 U/l und bei Männer bis 7 U/l.

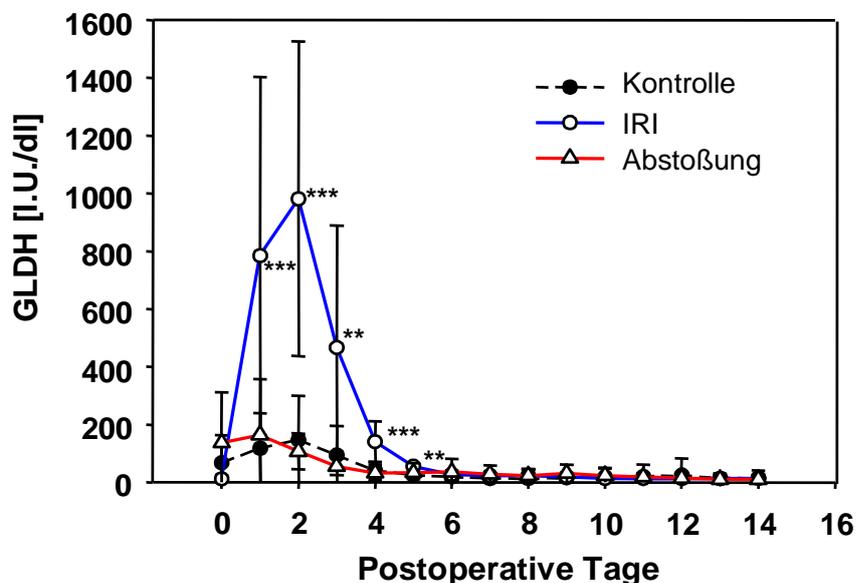


Abbildung 2: Serum GLDH im postoperativem Verlauf der IRI- Patienten und der Abstoßungspatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe

Es zeigt sich ein deutlicher signifikanter Anstieg der postoperativen GLDH Werte der IRI- Gruppe im Vergleich zur Abstoßungs- und Kontrollgruppe. Bereits am 1. POD zeigen sich signifikante Unterschiede ($p < 0,001$), wobei die Werte am 2. POD ihr Maximum (GLDH= 980,4 U/dl +/- 544,6; $p < 0,001$) erreichen. Es kommt zu einem schnellen Absinken der Werte nach dem 2.POD zum 3.POD ($p < 0,01$). Bis zum 5. POD liegen die GLDH Werte (POD 4 $p < 0,001$, POD 5 $p < 0,01$) der IRI-Gruppe signifikant über denen der Abstoßungs- und Kontrollgruppe und nähern sich am 6. POD den anderen Kurvenverläufen an und liegen damit im Normbereich dieses Parameters.

Für das Vorliegen einer schweren Lebergewebsschädigung spricht zusätzlich zur erhöhten GOT die Erhöhung der GLDH wie in Abbildung 2 mit dem Maximum am 2. POD. Die Abstoßungs- und Kontrollgruppe zeigen wie auch schon in der Abbildung 1 kaum einen Anstieg der Leberenzyme.

4.3.3 Gamma GT (γ -GT, Gamma-Glutamyl-Transferase)

Die γ -GT ist, im Gegensatz zu den anderen Leberparametern, membrangebunden und leber- und gallengangsspezifisch und der empfindlichste Indikator bei Störungen des Gallengangssystems und der Leber. Die Höhe des Wertes ist proportional zum Umfang der Leberschädigung. (Hagemann O, Laborlexikon, e-journal, ISSN 1860-966X)

Der Referenzbereich liegt bei Frauen bis 35 U/l und bei Männern bis 66 U/l.

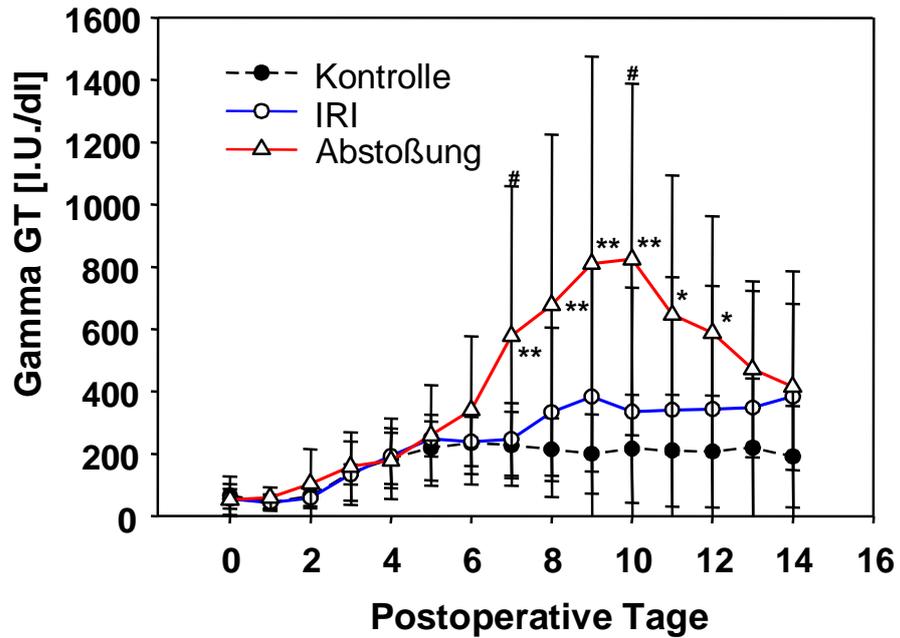


Abbildung 3: Serum Gamma GT im postoperativem Verlauf der IRI-Gruppe und Abstoßungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

Im postoperativen Verlauf verhalten sich die Gamma GT Werte aller 3 Patientenpopulationen mit einem milden Anstieg bis zum 5. POD zunächst ähnlich. Dann ab dem 7. POD kommt es zu einem deutlichen signifikanten Anstieg der Werte der Abstoßungsgruppe mit einem Maximum am 10. POD mit 823,5 U/dl +/- 563,7, ($p=0,002$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (215,9 U/dl +/- 173,0). Die Gamma GT fällt im weiteren Verlauf wieder ab, um sich der IRI- Gruppe anzugleichen. Die IRI-Gruppe zeigt nur einen tendenziellen leichten Anstieg der Werte ab dem 8. POD im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Gegensatz zu den Abbildungen 1 und 2 zeigt sich bei der Gamma GT ein Anstieg der Abstoßungsgruppe im späteren Verlauf des Beobachtungszeitraumes mit einem Maximum am 10. POD als Zeichen einer Transplantatabstoßungsreaktion..

4.3.4 CRP (C-reaktives Protein)

Das CRP wird in der Leber gebildet und steigt ca. 6-12h nach Beginn einer akuten Entzündungsreaktion an.

Es kann Hinweis für postoperative Komplikationen (Infektionen, Nekrosen) geben mit Anstieg über 50-150 mg/l oder ausbleibendem Abfall 3-4 Tage nach Operation. Der Normbereich liegt bei < 6mg/dl. (Hagemann O, Laborlexikon, e-journal, ISSN 1860-966X)

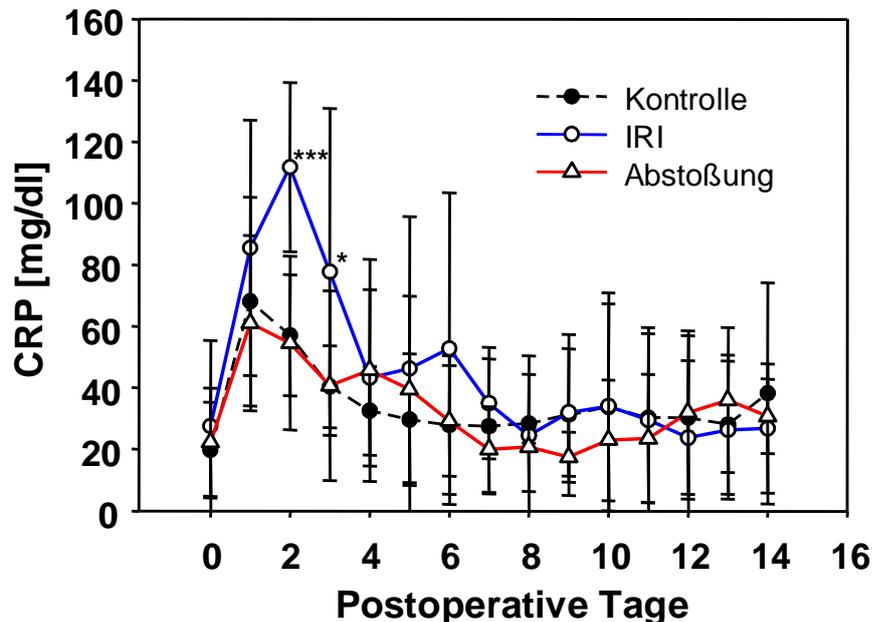


Abbildung 4: Serum CRP im postoperativem Verlauf der IRI- und Abstoßungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe

Postoperativ kommt es zunächst in allen 3 Gruppen zum Anstieg der CRP Werte, wobei nur die IRI Gruppe nach einem steileren Anstieg am 2. POD ihr Maximum (CRP 111,1 mg/dl +/- 27,5) und eine starke Signifikanz ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (57,1 mg/dl +/- 19,7) erreicht.

Die Abstoßungsgruppe als auch die Kontrolle zeigen simultan einen milderem Anstieg am 1. POD. Die Werte der Kontrolle fallen im Verlauf langsam weiter ab, um sich bei ca. 30 mg/dl einzupendeln. Die Abstoßungsgruppe zeigt ebenfalls fallende Werte. Ab dem 5. Tag sinken die Werte unter die Kontrollgruppe und bleiben unter diesem Niveau bis zum 12. POD. Danach steigen sie langsam etwas über die Kontrollgruppe.

Die Werte in der IRI Gruppe fallen ab dem 3. POD ($p < 0,05$). Am 6. POD kommt es noch zu einem kleinen nicht signifikanten Anstieg. Ab dem 7. Tag bleiben die Werte auf ähnlich niedrigem Niveau der

anderen Gruppen. Es zeigen sich im weiteren Verlauf keine weiteren signifikanten Unterschiede.

Ähnlich wie auch in den Abbildungen 1 und 2 zeigt sich bei der IRS Gruppe ein Anstieg des CRP als Ausdruck für eine Organschädigung. Wohingegen das CRP bei der Abstoßungs- und Kontrollgruppe kaum eine Erhöhung zeigt.

4.3.5 Quick im Serum

Unter anderem werden in der Leber die Gerinnungsfaktoren II, V, VII, IX und X, sowie Protein C; S gebildet. Um einen objektiven Eindruck von der Syntheseleistung des Organes zu bekommen, nutzten wir die standardisierte Bestimmung des Quickwertes im Labor für Klinische Chemie an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf. Der Normbereich des Quickwertes liegt bei 80-127%.

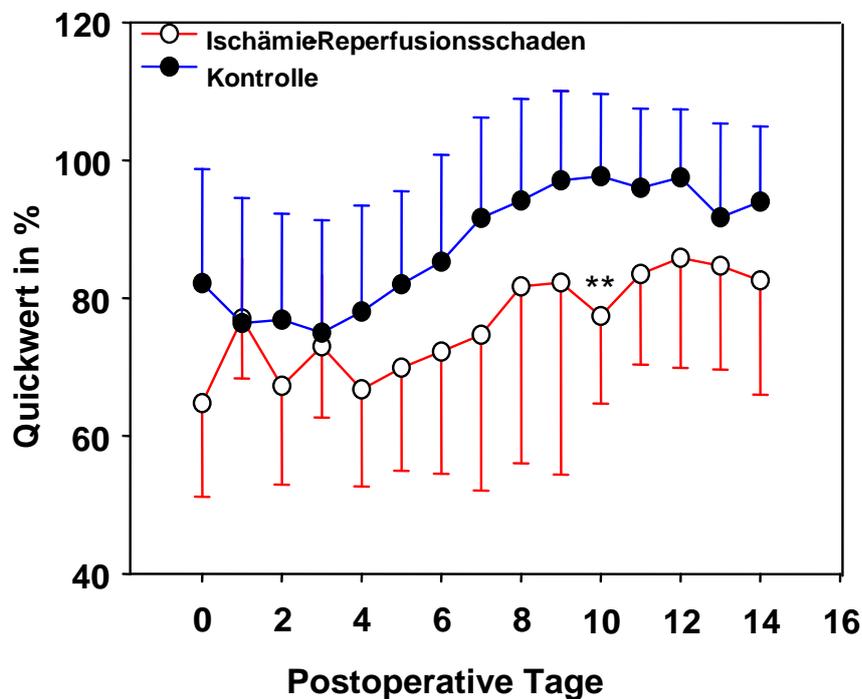


Abbildung 5: Serum Quick der IRI-Gruppe im postoperativem Verlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe nach LTX

Der Ausgangsquickwert der IRI Gruppe ist anfänglich niedriger als der der Kontrollgruppe. Die Werte ähneln sich am 1. und 3. postoperativen

Tag. Wobei die Werte der Kontrollgruppe postoperativ bis zum 3. Tag abfallen. Ab dem 4. POD ist ein Anstieg der Werte beider Gruppen bis zum 13. POD zu erkennen. Wobei die Quickwerte der IRI-Gruppe ab dem 3. POD deutlich unter denen der Kontrollgruppe liegen. An den Tagen 7, 11 und 12 ist ein Trend (7. POD $p=0,087$, 11. $p=0,077$, 12. $p=0,082$) zuerkennen, am 10. POD liegt der Wert signifikant unter der Kontrollgruppe ** ($p=0,008$).

Bei den IRI Patienten zeigt sich eine Syntheseleistungsminderung im Vergleich zur Kontrollgruppe durch erniedrigte Quickwerte im postoperativen Verlauf.

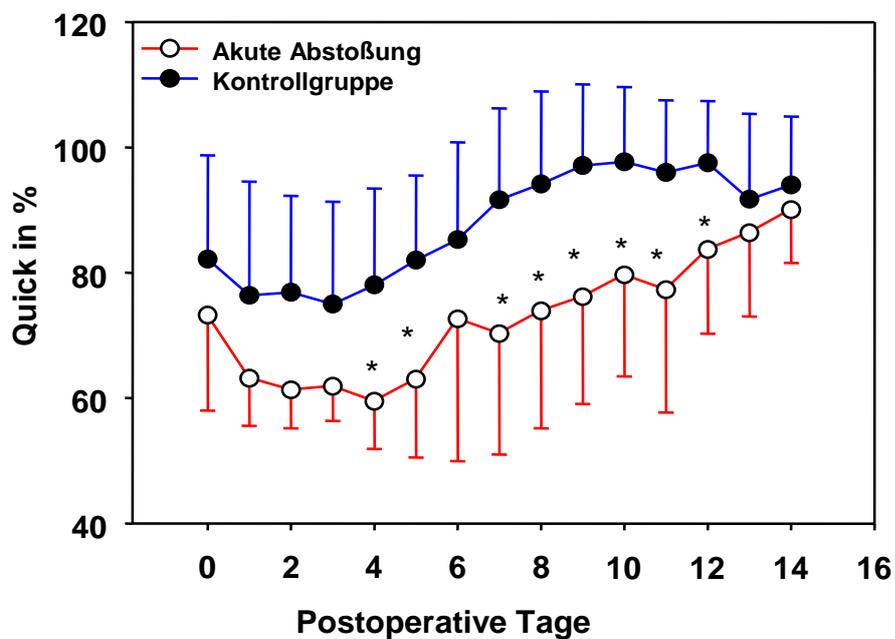


Abbildung 6: Serum Quick der Patienten mit der Abstoßungsreaktion zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Postoperativ fallen die Quickwerte beider Kollektive zunächst ab bis zum 3. POD. Hiernach kommt es zum Anstieg der Quickwerte beider Gruppen, wobei das Niveau des Patientenkollektives deutlich unter dem der Kontrolle liegt. Die Kontrollgruppe zeigt einen stetigen Anstieg der Werte bis zum 10. POD, danach stagnieren die Werte und fallen ab dem 13. POD ab. Die Abstoßungsgruppe zeigt insgesamt einen unregelmäßigeren Kurvenverlauf, wobei die Werte bis zum

Beobachtungsende ansteigen. An den Tagen 4 ($p=0,034$), 5 ($p=0,022$) und 7 ($p=0,028$), 8 ($p=0,033$), 9 ($p=0,015$), 10 ($p=0,023$), 11 ($p=0,023$), 12 ($p=0,033$) liegen die Ergebnisse signifikant unter der Kontrollgruppe. Ähnlich wie auch in Abbildung 5 zeigt sich bei der Abstoßungsgruppe ebenfalls eine Syntheseleistungsminderung in den niedrigeren Quickwerten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

4.3.6 Gesamtbilirubin im Serum

Indirektes Bilirubin, als Hämabbauprodukt wird in der Leber konjugiert und damit wasserlöslich gemacht, so dass es mit der Galle ausgeschieden werden kann. Damit repräsentiert das Bilirubin den Metabolismus der Leber und man kann es als Kontrollparameter nutzen. Der Referenzwert von Bilirubin liegt im Blut unter 2mg/dl.

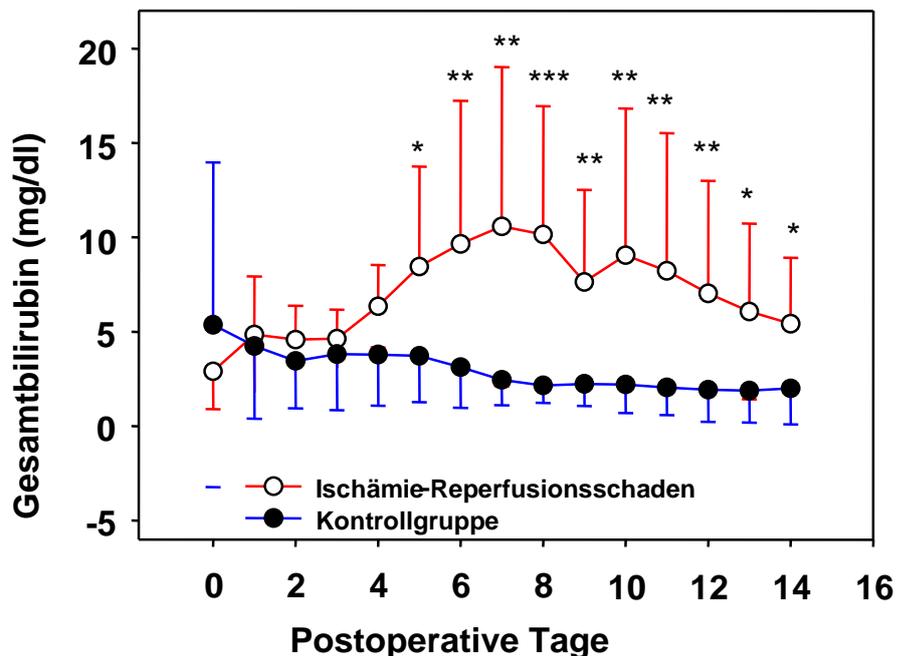


Abbildung 7: Serumbilirubin der IRI Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativen Verlauf

Vom 1. POD bis zum 3. POD verhalten sich die Werte der Patientenkollektive ähnlich. Danach lässt sich deutlich erkennen, dass die Bilirubinwerte der IRI-Gruppe ab dem 5. POD ansteigen und damit signifikant über dem Niveau der Kontrollgruppe und im pathologischen Bereich liegen. Während die Bilirubinwerte der Kontrollgruppe zwischen 1,88 mg/dl- 5,43 mg/dl liegen, steigen die Bilirubinwerte der IRI-Gruppe auf ein Maximum von 10,57 mg/dl am 7. POD an. Im weiteren Verlauf folgen abfallende Werte bis zum 14. POD auf 5,43 mg/dl. Signifikante Unterschiede (*) der beiden Patientenkollektive lassen sich am 5. POD ($p=0,016$), 13. POD ($p=0,019$) 14. POD ($p=0,02$), stärkere Signifikanz (**) 6. POD ($p=0,007$), POD 7 ($p=0,002$), POD 10 ($p=0,003$), POD 11 ($p=0,004$), POD 12 ($p=0,007$) und eine besonders starke Signifikanz (***) am 8. POD ($p=0,0001$) ablesen. Die Werte der Kontrolle zeigen postoperativ eine ständig fallende Tendenz. Die IRS Gruppe zeigt einen deutlichen Anstieg in den Bilirubinwerten, wobei die Kontrollgruppe fast normwertig bleibt.

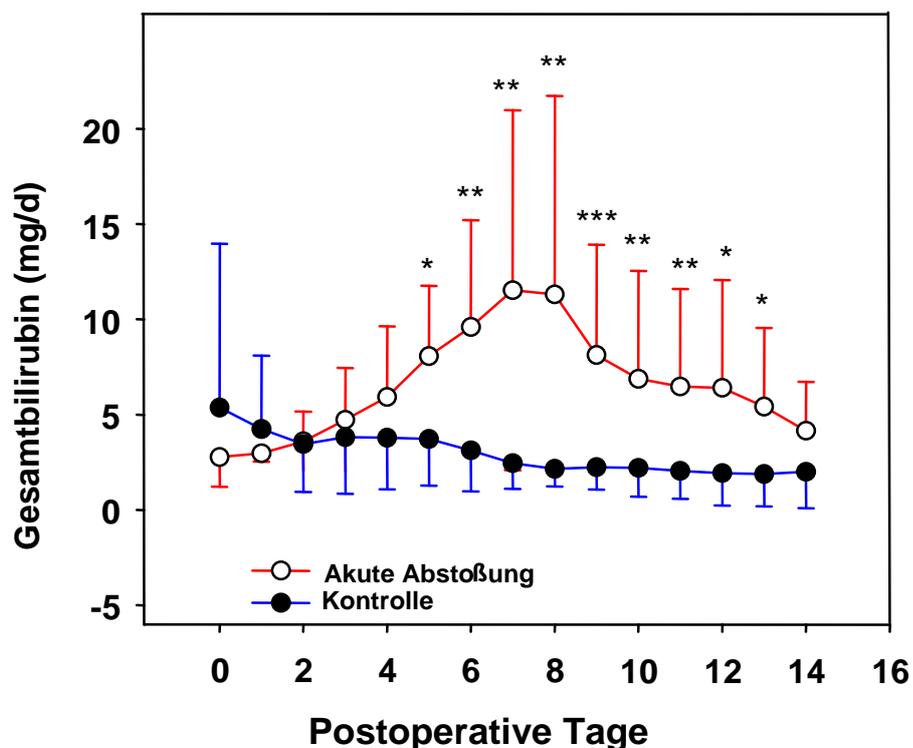


Abbildung 8: Serumbilirubin der Abstoßungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Die Werte des Serumbilirubins in der Gruppe mit der Akuten Abstoßung sind gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die Kontrollgruppe zeigt einen tendenziell sinkenden Verlauf mit einem Spitzenwert von 5,37 mg/dl am POD 0 bis zu einem Normwert von 1,88 mg/dl am POD 13. Ab dem 4. POD kommt es zu steilen Anstieg der Bilirubinwerte der Abstoßungsgruppe. Das Maximum wird am 7. POD mit 11,53 mg/dl erreicht. Signifikante Unterschiede finden sich durchgehend vom 5. POD bis 13. POD.

Im frühen postoperativen Verlauf nach oLTX weisen Patienten mit Abstoßungsreaktion ein im Mittel erhöhtes Serumbilirubin mit einem Maximum am 7. POD auf, während die Kontrollgruppe nahezu normale Werte demonstrierte.

4.3.7 Thrombozytenzahlen

Der Bildungsort der Thrombozyten befindet sich im Knochenmark, Die Funktion der Blutplättchen bei der Blutgerinnung auch als Entzündungszellen wurde weitestgehend in der Einleitung beschrieben. Der Referenzbereich liegt bei 150.000-400.000 / μ l.

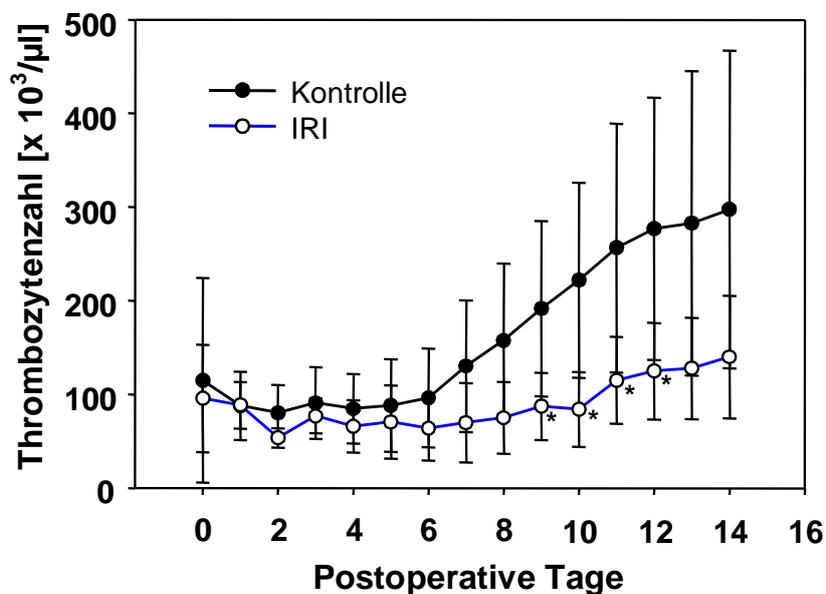


Abbildung 9: Thrombozyten der IRI- Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Die Thrombozytenzahlen der beiden Gruppen sind im ersten Abschnitt bis zum 5. POD mit Werten um die 100000/ μ l sehr ähnlich. Nach dem 6. postoperativen Tag zeigte die Kontrollgruppe eine allmähliche Zunahme der Thrombozytenzahl bis zum 14. POD. Die Werte der IRI Patienten bleiben im Verlauf auf niedrigem Niveau, wobei die Werte vom 9.-12. POD signifikant unter denen der Kontrollgruppe liegen. Die Thrombozytenzahlen der IRI Gruppe steigen im Beobachtungszeitraum kaum über 100000 / μ l an.

Die Patienten mit dem Reperfusionsschaden zeigen im Mittel deutlich niedrigere Thrombozytenzahlen als die Kontrollgruppe.

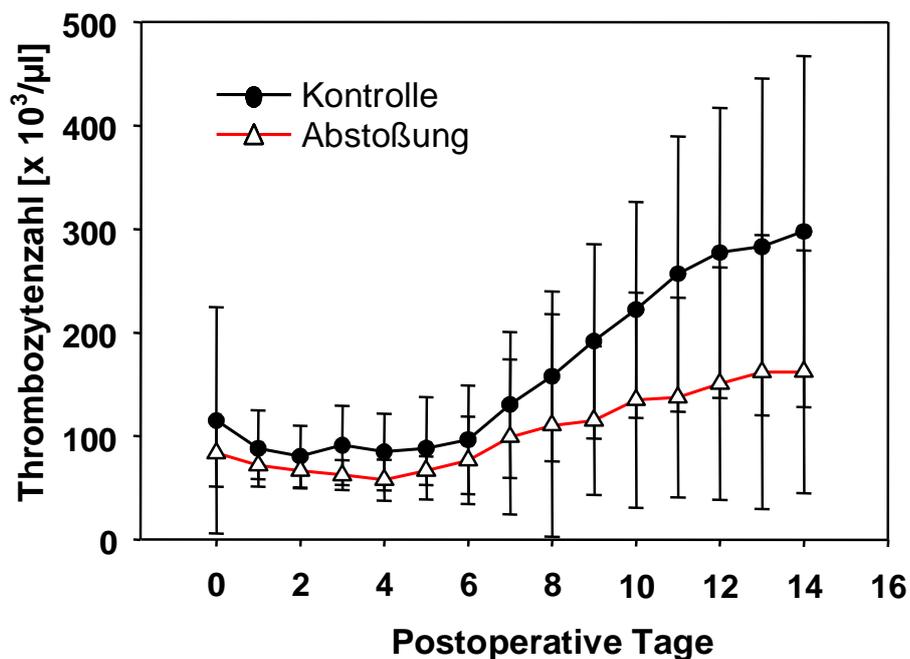


Abbildung 10: Thrombozyten der Abstoßungsgruppe versus Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

In diesem Grafen verlaufen die Kurven der beiden Gruppen zunächst ähnlich niedrig, wobei die Ausgangswerte bis zum 6. POD die höchsten Werte darstellen. Ab dem 7. POD kommt es in beiden Populationen zu einem Anstieg der Thrombozyten. Die Werte der Kontrolle steigen successive an und die Thrombozyten erreichen dabei Werte um 300000/ μ l am 14. POD.

Die Abstoßungspatienten zeigen eine geringere Erholungstendenz von der Thrombozytopenie, die Werte übersteigen dabei kaum 150000/ μ l im

Verlauf. In der Auswertung der Ergebnisse sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven zu erkennen.

4.4 Proteinexpression auf Thrombozyten

Um den Zustand der Aktivierung der Thrombozyten quantifizieren zu können, bestimmten wir die Expression verschiedener Faktoren an der Oberfläche der Thrombozyten (Y-Achse) an festgelegten Zeitpunkten (X-Achse) durchflusszytometrisch.

4.4.1 CD 62 p FITC

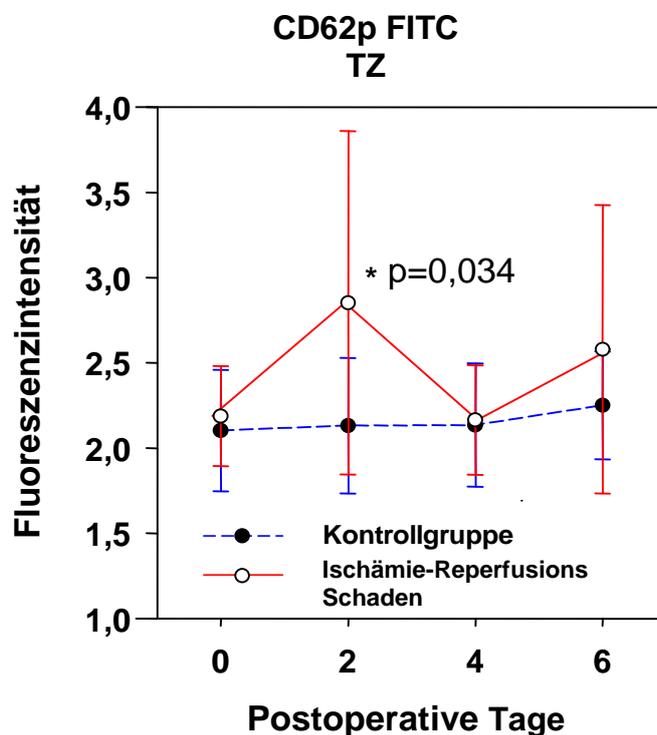


Abbildung 11: Expression von CD 62p auf Thrombozyten der IRI-Gruppe versus Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Bei gleichen Ausgangswerten präoperativ steigt die CD 62p Expression signifikant zum 2. POD ($p=0,034$) im Vergleich zur Kontrollgruppe hin an. Für die anderen Tage konnten keine statistischen Unterschiede

festgestellt werden. Die Kurve der der Kontrollgruppe zeigt nahezu einen geradlinigen Verlauf.

Bei der IRI Gruppe zeigt sich ein Anstieg des p-Selektins am 2.POD als Zeichen der Thrombozytenaktivierung im Gegensatz zur Kontrollgruppe.

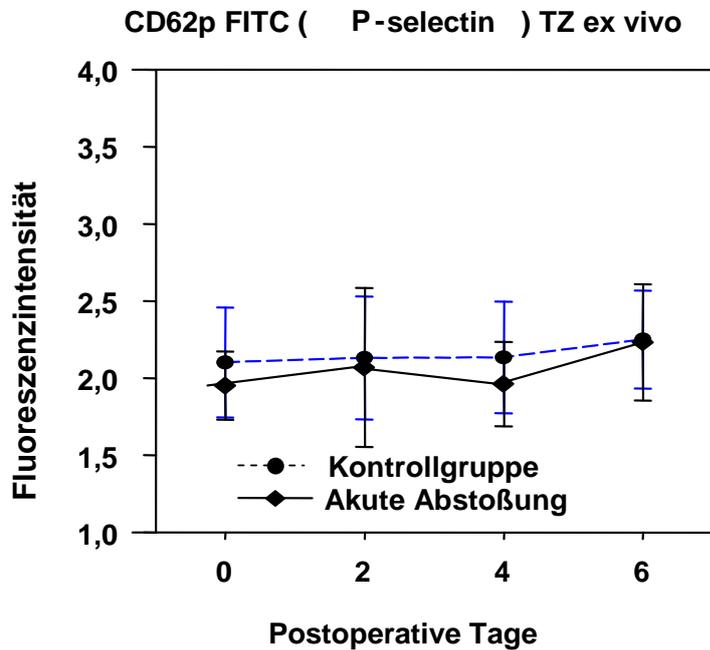


Abbildung 12: CD 62p Expression der Gruppe mit Abstoßungsreaktion vs. der Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Bei der Gruppe der Akuten Abstoßung liegen die Werte der CD 62p Expression mit denen der Kontrollgruppe nahezu auf einem Niveau. Die Werte verhalten sich dabei ähnlich. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Wie auch bei der Kontrollgruppe zeigte sich bei der Abstoßungsgruppe hinsichtlich des P- Selektin Expressionsmusters keine Veränderung des Thrombozytenaktivierungsstatus im Beobachtungszeitraum.

4.4.2 Thrombospondin PE

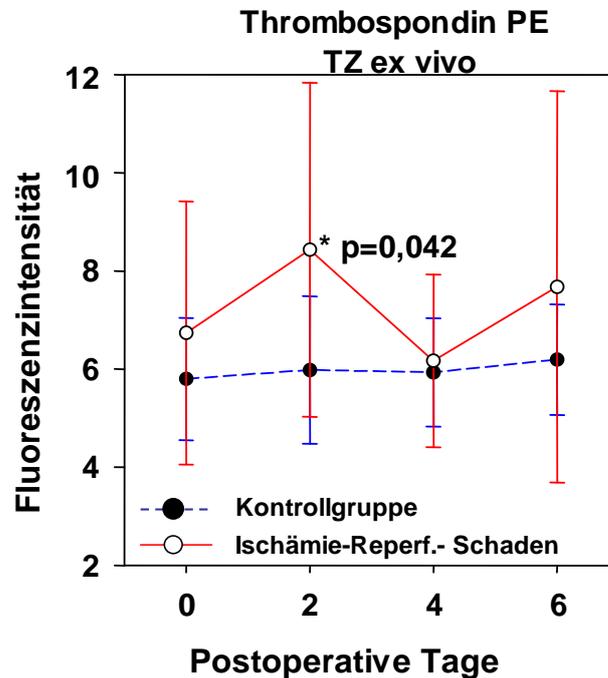


Abbildung 13: Expression von Thrombospondin auf Thrombozyten der IRI Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX.

Im gesamten Verlauf liegen die Werte der IRI- Patientengruppe über denen der Kontrolle. Dabei war der Peak am 2. POD mit ($p= 0,042$) signifikant über dem Level der Kontrolle. Am 6. POD stellt sich im Trend ein Anstieg des IRI Kollektives dar. Das Expressionsmuster der Patientengruppe verläuft nahezu konstant über den gesamten Beobachtungszeitraum.

Ähnlich wie in Abbildung 12 zeigt sich eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung der IRS Gruppe im Vergleich zur Kontrolle am 2.POD.

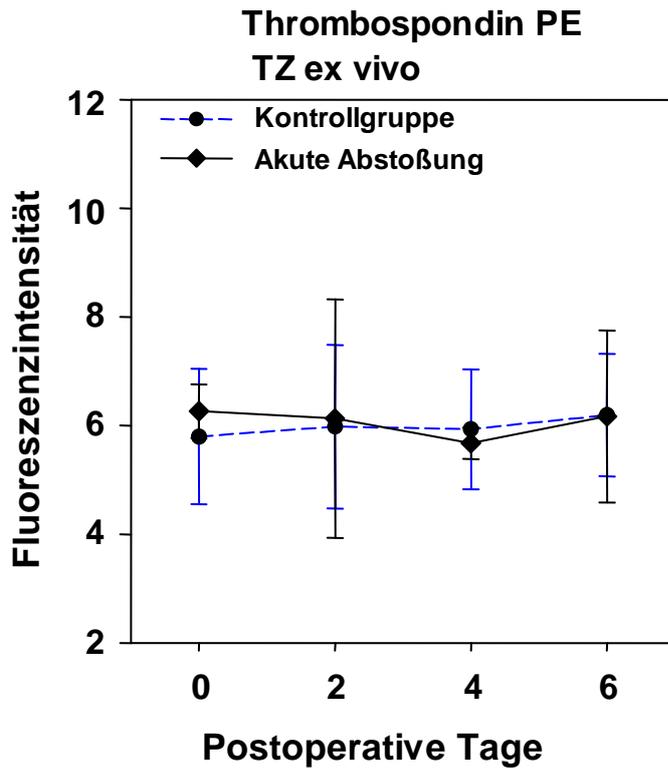


Abbildung 14: Expression von Thrombospondin auf Thrombozyten der Abstoßungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativen Verlauf nach LTX.

Beide Kollektive zeigen ähnliche Expressionsmuster auf gleichbleibendem Niveau über den gesamten Beobachtungszeitraum. Wie auch bei der Kontrollgruppe zeigte sich bei der Abstoßungsgruppe hinsichtlich des Thrombospondinexpressionsmusters keine Veränderung des Thrombozyten-aktivierungsstatus im Beobachtungszeitraum.

4.5 Proteinexpression auf Thrombozyten und Monozyten

4.5.1 Tissue Factor auf Thrombozyten

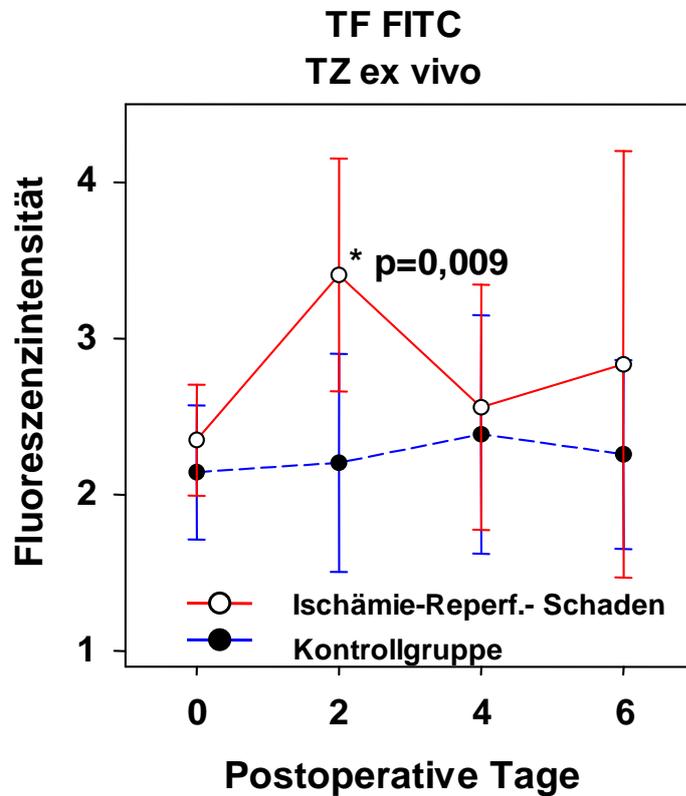


Abbildung 15: TF Expression auf Thrombozyten von IRI-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Es konnte eine deutlich gesteigerte Expression von TF am 2. POD ($p=0,009$) im postoperativen Verlauf der IRI Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden. Die Werte fallen am 4. POD ab und steigen zum 6. POD nochmals, jedoch nicht signifikant, an. Die Expression der Kontrollgruppe bleibt nahezu auf einem Niveau.

Die IRS- Gruppe zeigt im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine deutliche Steigerung der TF Expression und damit Thrombozytenaktivierung am 2. POD.

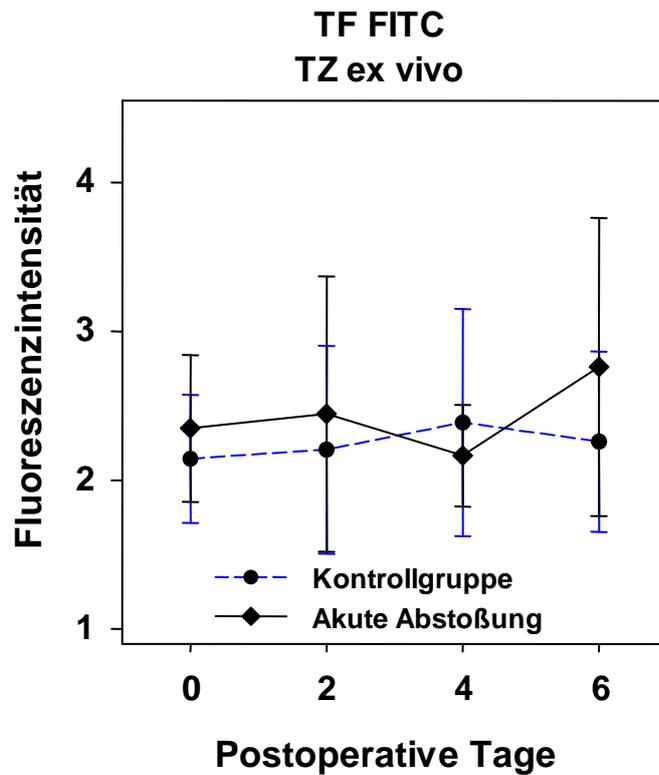


Abbildung 16: TF Expression auf Thrombozyten von Abstoßungspatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Unterschiede in der Expression des TF beider Gruppen konnte nicht festgestellt werden. Wie auch in der Kontrollgruppe zeigte sich hinsichtlich der TF Expression bei dem Patientenkollektiv keine Veränderung des Aktivierungsstatus.

4.5.2 Tissue Factor auf Monozyten

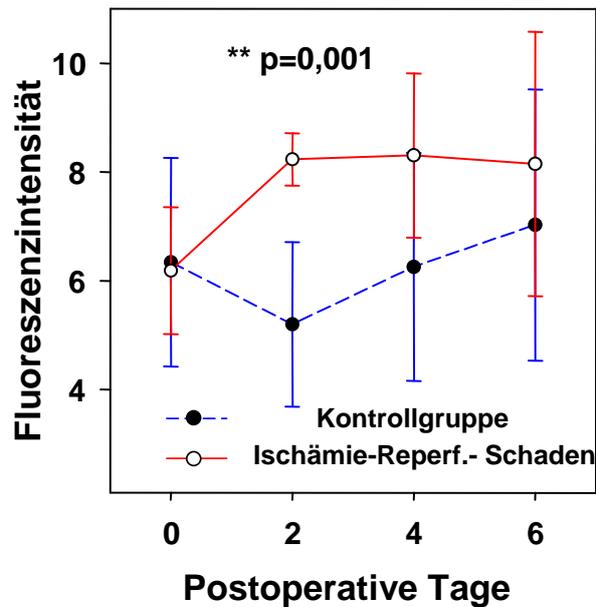


Abbildung 17: TF Expression auf Monozyten bei IRI- Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Es zeigt sich bei anfänglich ähnlichen Ausgangswerten postoperativ am 2.Tag ein steiler Anstieg der IRI- Kurve und erreicht dort das Maximum. Der Wert liegt signifikant ($p=0,001$) über der Kontrolle. Auf hohem Niveau verlaufen die Werte weiter. Im Unterschied dazu steigt die TF Expression der Kontrolle erst im Verlauf nach dem 2. POD an und erreichte am 6.POD seinen höchsten Wert. Im weiteren Verlauf finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Es zeigt sich eine deutliche Steigerung des Aktivierungszustandes der Monozyten im postoperativen Verlauf bei der Patientengruppe im Gegensatz zur Kontrolle.

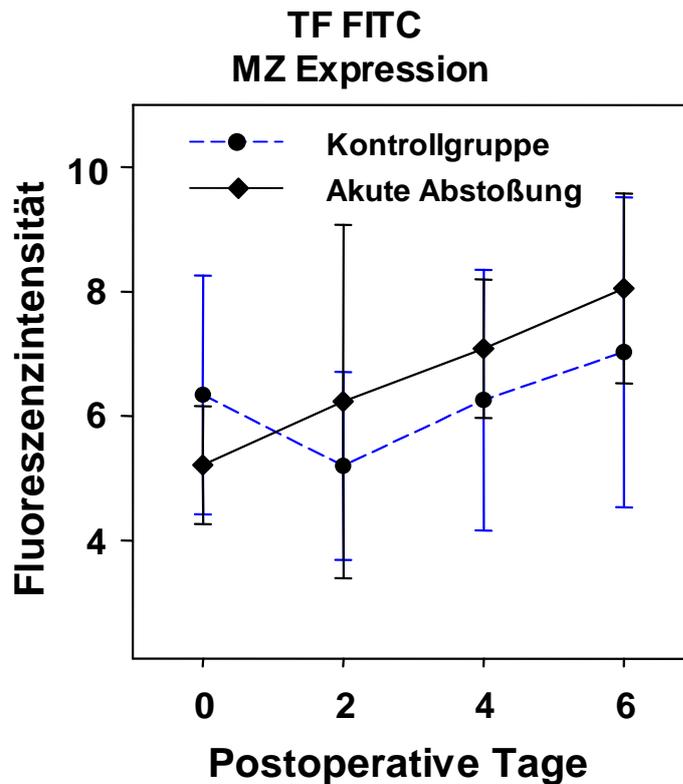


Abbildung 18: TF Expression auf Monozyten bei Patienten der Abstoßungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Im postoperativen Verlauf der Gruppe mit der akuten Abstoßung zeigt sich ein stetiger Anstieg der Werte bis zum 6. POD. Die Kurve der Kontrolle hatte einen tendenziell höheren Ausgangswert, sinkt am 2. POD unter die Abstoßungsgruppe ab, um ab dann ebenfalls anzusteigen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Aktivierungszustand der Monozyten hinsichtlich der TF-Expression zwischen den Kollektiven nachgewiesen werden.

4.6.2 TFPI auf Thrombozyten

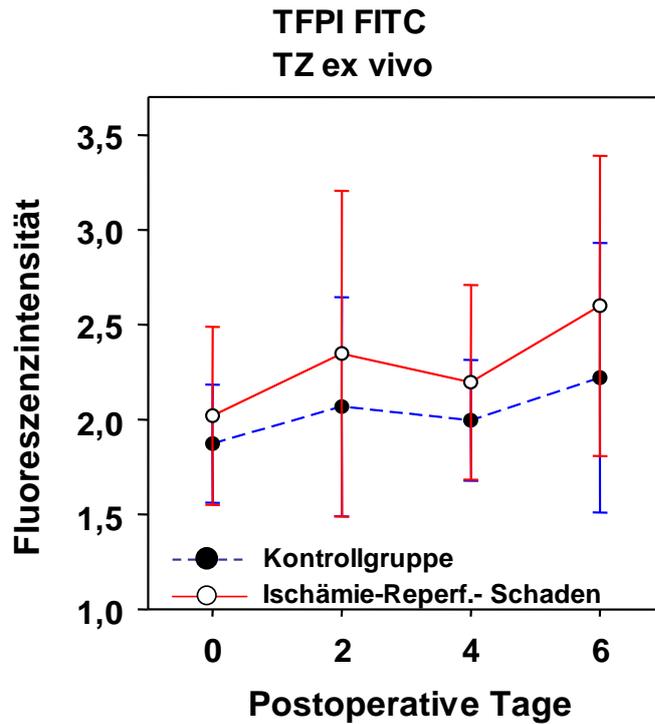


Abbildung 19: TFPI Expression auf Thrombozyten bei IRI Patienten und der Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Bei der IRI Gruppe ist die Expression von TFPI im Gegensatz zur Kontrollgruppe im gesamten Kurvenverlauf tendenziell erhöht, eine Signifikanz lässt sich nicht nachweisen. Hinsichtlich des Aktivierungszustandes der Thrombozyten lässt sich bei den Kollektiven kein Unterschied erkennen.

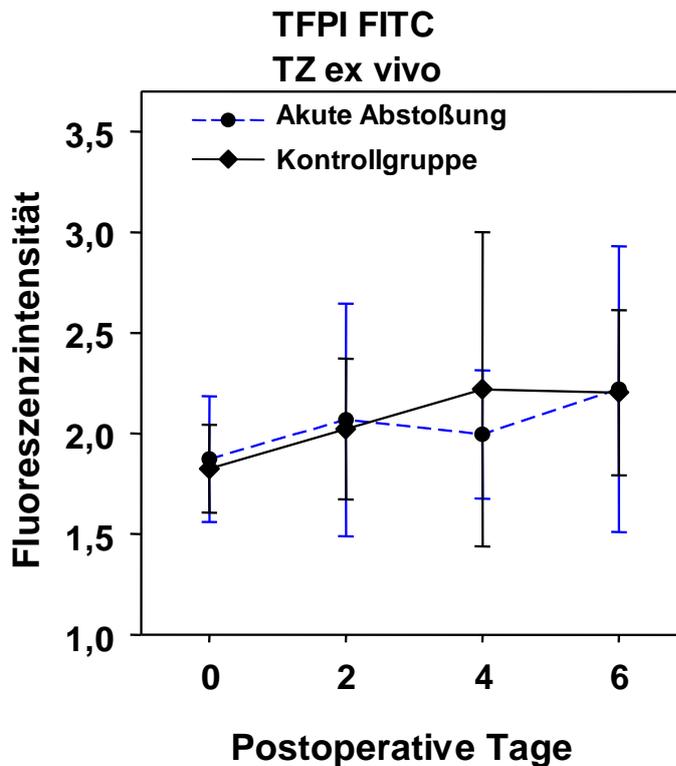


Abbildung 20: TFPI- Expression auf Thrombozyten der Abstoßungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Es lässt sich im Expressionsmuster der beiden Gruppen keine deutliche Unterscheidung machen. Beide Kollektive zeigen am 2. POD leicht ansteigende Werte, die sich jedoch untereinander in keinem Verhältnis befinden.

Ähnlich wie in Abbildung 20 lässt sich auch bei der Abstoßungsgruppe bezüglich der TFPI Expression auf aktivierten Thrombozyten kein Unterschied zur Kontrollgruppe erkennen.

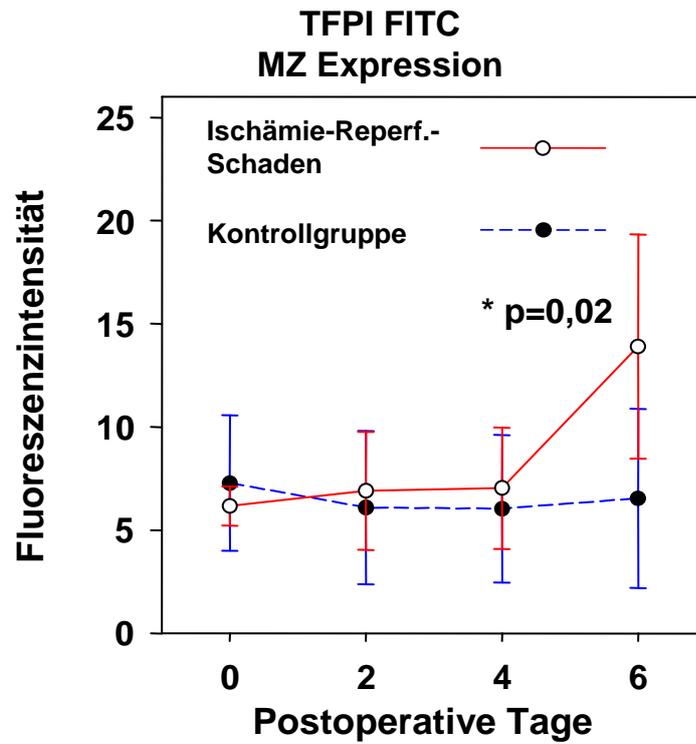


Abbildung 21: TFPI- Expression auf Monozyten der IRI- Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Bei leicht ansteigenden Werten der IRI Gruppe an den ersten postoperativen Tagen kommt es am 6. POD zu einem signifikanten ($p=0,02$) steilen Anstieg mit einem Erreichen des Maximums. Die Kurve der Kontrollgruppe bleibt im Verlauf insgesamt auf präoperativem Niveau.

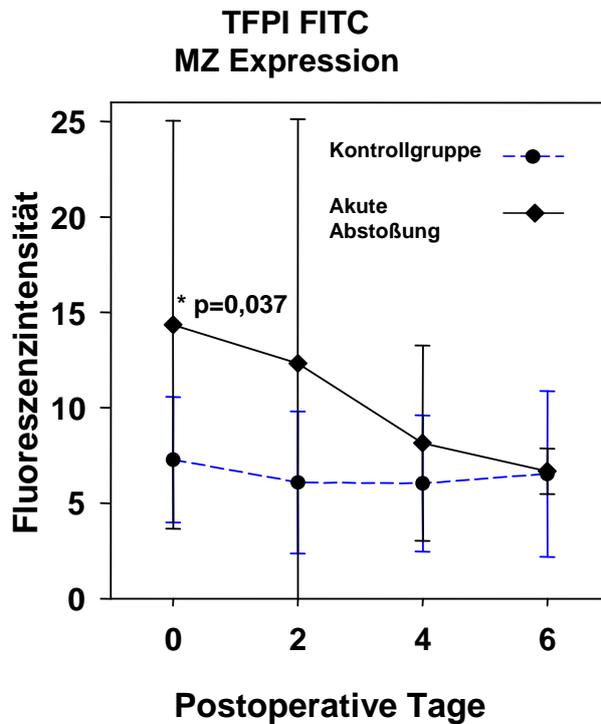


Abbildung 22: TFPI- Expression auf Monozyten der Abstoßungs- Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Der präoperative Wert der Abstoßungsgruppe ist im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht ($p=0,037$). Die Kurve der Abstoßungsgruppe hat eine fallende Tendenz, wobei das Minimum am 6. POD gemessen wird. Die Kontrollgruppe zeigt ein gleichbleibendes Niveau der TFPI Expression bis zum 6. POD.

4.6 Anbindung von Thrombospondin (FITC- markiert)

4.6.1 Thrombozyten

Thrombospondin wird von aktivierten Thrombozyten an der Oberfläche ausgeschüttet und zum Teil an spezifischen Rezeptoren zurückgebunden. Damit gilt auch Thrombospondin als Aktivierungsmarker. Diese Anbindung wiesen wir mittels Durchflusszytometer nach.

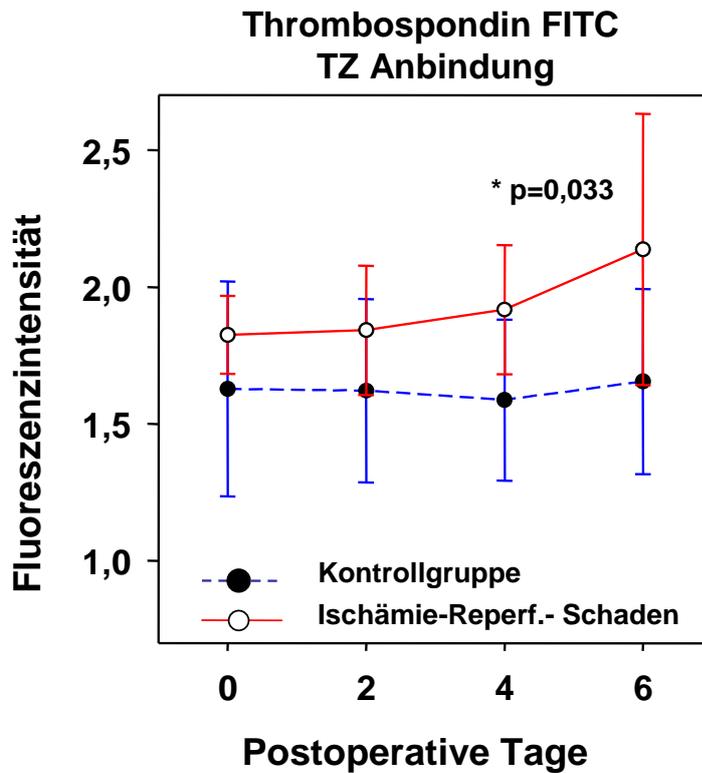


Abbildung 23: Thrombospondinanbindung an Thrombozyten bei IRI-Patienten und Kontrollpatienten im postoperativem Verlauf nach LTX

Im Gegensatz zur nahezu geradlinig verlaufenden Kurve der Kontrolle zeigt sich die Kurve der Thrombospondin- Anbindung bei den Patienten mit IRI bis zum 4. POD leicht ansteigend. Danach nimmt der Anstieg zu. Am 6.POD war die Thrombospondinanbindung ($p=0,033$) signifikant höher als die des Kontrollkollektives. Diese zeigt eine gesteigerte Thrombozytenaktivierung im Gegensatz zur Kontrollgruppe.

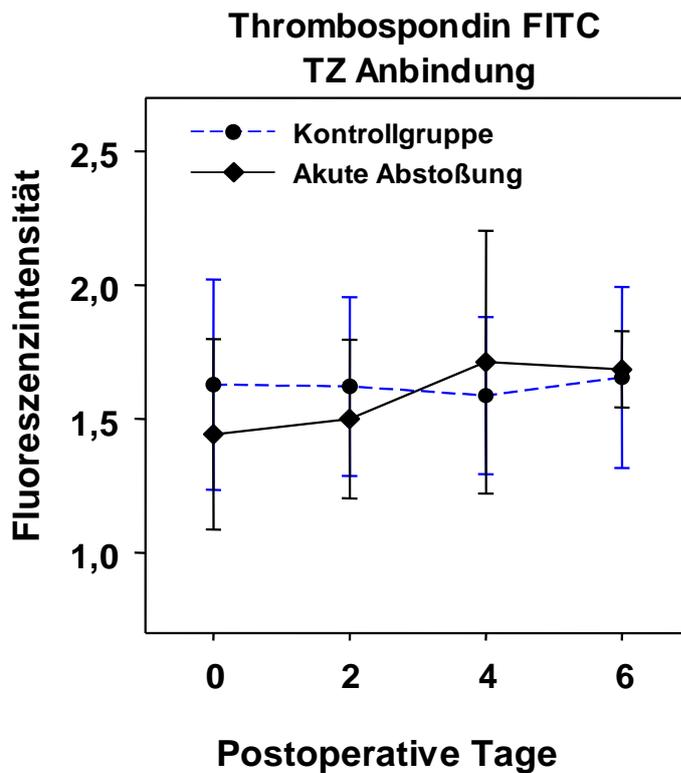


Abbildung 24: Thrombospondinanbindung an Thrombozyten bei IRI-Patienten und Kontrollpatienten im postoperativem Verlauf nach LTX

Die Kurve der Abstoßungsgruppe verläuft vom 0.- 4. leicht ansteigend. Am 6. POD ist ein leichtes Abfallen zu verzeichnen. Die Kontrollgruppe weist im gesamten Verlauf nahezu konstante Werte auf, es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bezüglich der Thrombospondinanbindung konnten somit keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kollektiven dokumentiert werden.

4.6.2 Monozyten Thrombospondin

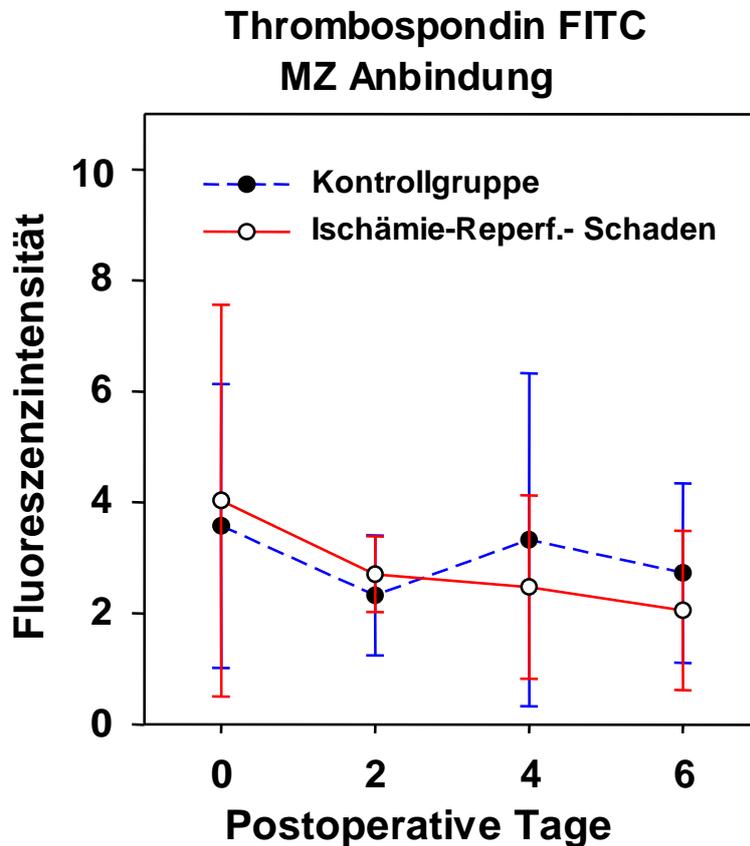


Abbildung 25: Thrombospondinanbindung an Monozyten der IRI- Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

Zuächst sinken die Werte beider Kurven vom präoperativen Ausgangswert zum 2.POD ab. Die Kurve der IRI Gruppe fällt weiter bis zum 6. POD, hier wird auch der geringste gemessene Wert festgestellt. Die Kurve der Kontrollpatienten steigt am 4. POD über das Niveau der IRI Gruppe und bleibt auch am 6. POD erhöht. Es konnte kein statistischer Unterschied zwischen beiden Populationen ermittelt werden. Wie auch in der Kontrollgruppe zeigte in der Thrombospondinanbindung an Monozyten bei IRI Gruppe keine Veränderung des Aktivierungszustandes.

Thrombospondin FITC MZ Anbindung

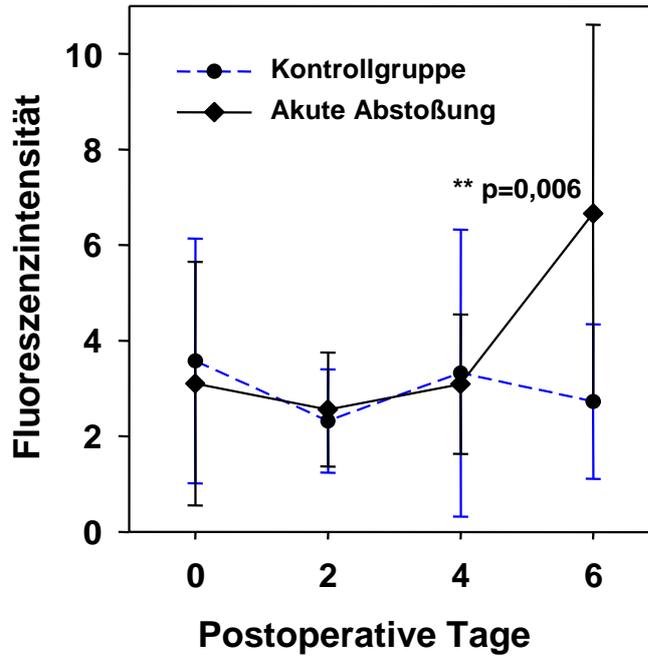


Abbildung 26: Thrombospondinanbindung an Monozyten der Abstoßungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe im postoperativem Verlauf nach LTX

In der ersten postoperativen Phase bis zum 4. POD zeigt sich ein ähnlicher Kurvenverlauf der beiden Patientengruppen. Am 4. POD kommt es zu einer deutlichen Dissektion der beiden Kurven und einer signifikanten Mehranbindung von Thrombospondin der Gruppe der Abstoßung am 6. POD ($p=0,006$) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

5. Diskussion

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass Patienten nach einer Lebertransplantation, die einen Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) als Folge einer kalten Ischämie erlitten, erhöhte Marker einer hepatozellulären Schädigung aufwiesen. Gleichzeitig kam es dabei zu einem Anstieg der Thrombozytenaktivität und einer prokoagulatorischen Verschiebung des Tissuefaktorsystems auf Thrombozyten sowie Monozyten in den ersten 48 Stunden nach Reperfusion. Im Gegensatz dazu konnten bei Patienten mit früher Abstoßungsreaktion oder ohne postoperative Komplikationen keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der prokoagulatorischen bzw. inflammatorischen Eigenschaften der Monozyten oder Thrombozyten nachgewiesen werden.

GOT ist ein standardisierter Marker für Leberzellschäden (Basile, 1999) und somit wichtig als einer der zuverlässigsten nicht invasiven Parameter der Leberreperfusionsschadens. (Mueller, 1996). Ein Anstieg der Transaminasen wie bei unseren IRI Patienten mit einem Peak nach 24 Stunden nach Reperfusion ist typisch für Reperfusionsschäden nach Lebertransplantationen. (Azoulay, 2005). Diesem Anstieg von GOT folgte parallel die Erhöhung des CRP, welches als Akutphaseprotein, mit dem Auftreten von inflammatorischen Abläufen im Rahmen relevanter früher Organdysfunktionen korreliert. (Beberat, 2006). Patienten der Abstoßungsgruppe zeigten hierbei keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daraus ist ersichtlich, dass der akuten Abstoßungsreaktion eher immunologische als inflammatorische Ursachen zu Grunde liegen.

Vor als auch nach der frühen Organabstoßung fanden sich keine signifikanten Unterschiede der GOT und der GLDH im Vergleich zur Kontrollgruppe. Parallel zur histologischen und klinischen Diagnose der frühen Abstoßungsreaktion kam es zum Anstieg der Gamma GT in dem Abstoßungspatientenkollektiv. Die Sensitivität von Gamma GT als nicht invasiver Marker der klinisch signifikanten Abstoßungsreaktion wird mit

bis zu 91% und einem positiv prädiktivem Wert von 70,9% beschrieben (Hickman,1994).

Die klinische Relevanz des Reperfusionsschadens sowie der Abstoßungsreaktion in der frühen postoperativen Phase wurde durch eine verminderte Lebersyntheseleistung bzw. Metabolismus deutlich. So wiesen beide Patientenkollektive signifikant niedrigere Quickwerte und signifikant erhöhte Bilirubinwerte im Serum, im Gegensatz zu den Patienten mit unkompliziertem postoperativem Verlauf, auf.

Verringerte Plättchenproduktion und der erhöhte Verbrauch an Thrombozyten nach einer Transplantation führt zu einer Thrombozytopenie. Persistierende Thrombozytopenien nach Reperfusion, wie sie bei der Patientengruppe der Reperfusionsschäden in unserer Studie beobachtet wurde, stellte sich als ungünstig für die Transplantatfunktion und das Outcome heraus. Dieser Fakt wurde bereits von Mc Caughan et al vorher beschrieben. (McCaughan, 1992) Dabei stellte sich der Thrombozytenabfall nach LTX als unabhängiger Prediktor dar.

Wir untersuchten, ob die Thrombozytopenie mit der Aktivierung der zellulären Hämostase zusammenhängt. Dafür bestimmten wir den prokoagulatorischen Aktivierungsstatus von Thrombozyten und Monozyten bei Patienten mit Abstoßung nach OLT. Bei der Abstoßungspatientengruppe waren weder P-Selektin, CD 40L, Tsp-1 und TF-Expression auf Thrombozyten noch die TF-Expression auf Monozyten signifikant erhöht vom 0. bis 6. POD. Dies zeigt, dass prokuagulante Monozyten und Thrombozyten nicht signifikant an der immunologischen Pathogenese der Leberschädigung bis zum 6. POD beteiligt sind. Ob aktivierte Thrombozyten eine Rolle bei der Einleitung der hepatischen Abstoßungsreaktion bei den Patienten ab dem 7. POD spielen bleibt spekulativ, weil unser Untersuchungszeitraum für die Durchflusszytometrie nur 6 postoperative Tage umfasste.

Dass Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Reperfusionsschadens spielen, wurde in einer Studie von Schulte am Esch gezeigt. (Schulte am Esch, 2005) In unserer Studie geht eine ausgeprägte Plättchenaktivierung mit einem Anstieg der P- Selektin

Expression in den ersten 48 h nach der LTX einher. Dieses könnte ein weiterer Beweis für eine aktive Beteiligung von P-Selectin in der Pathogenese des Reperfusionsschadens sein. Wie präklinisch herausgefunden wurde, vermittelt P-Selectin die Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten an die Endothelzellen. (Khandoga, 2002), (Khandoga, 2002). Ein p-selectinvermitteltes Zusammenspiel von Thrombozyten und Leukozyten bei der Apoptose von Endothelzellen in Rattenlebern wurde bereits von Sindram et al. 2001 beschrieben. (Sindram, 2001); (Gao, 1998). Ebenso spielt das thrombozytenassoziierte P-Selektin durch die proinflammatorische Wirkung auf Leukozyten beim postischämischen Nierenversagen eine große Rolle (Singbartl, 2001). Im Anstieg des P-Selektins der Reperfusiongruppe zeigt sich auch in unserer Studie der Unterschied im Vergleich zur Gruppe mit der immunologisch bedingten Leberschädigung.

Die vermehrte Expression von CD 40L auf aktivierten Plättchen kann ebenfalls zu inflammatorischen und prokoagulatorischen Mechanismen im Transplantat führen. Dieses wurde bereits an Tiermodellen nach Hirninfarkten und Reperfusion gezeigt (Ishikawa, 2005). Plättchen sind in der Lage innerhalb von Sekunden nach Aktivierung in vitro bzw. im Geschehen der Thrombogenese in vivo CD40L zu exprimieren. Durch CD 40/CD40L Interaktionen können aus Endothelzellen Chemokine, Cytokine und Adhäsionsmoleküle freigesetzt werden, die ihrerseits Komplikationen im Transplantat hervorrufen (Monaco, 2002).

Thrombospondin ist als multifunktionelles Molekül nicht nur ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix, sondern es ist auch als Adhäsionsvermittler an einer Vielzahl interzellulärer Wechselwirkungen beteiligt. Tsp-1 ist als Brückenmolekül bei der Plättchenaggregation während der Blutgerinnung beteiligt. Eine Studie von Thakar et al. von 2005 wies Thrombospondin eine führende Rolle beim Nierenversagen durch Ischämie/ Reperfusionsschaden im Tierversuch zu (Thakar, 2005). In unserer Studie zeigte sich eine erhöhte Plättchen/Thrombospondin Aktivität in der IRI-Gruppe. Dieses konnte auch in einer erhöhten Thrombospondinbindekazität der IRI-

Patienten bis zum 6. postoperativen Tag nachgewiesen werden und scheint dabei unabhängig vom Tsp-1 Rezeptor CD 36 zu sein. Wie auch P-Selectin und CD 40L ist Tsp-1 ein weiterer wichtiger Modulator der Entzündungsreaktion bei dem Leberreperfusionsschaden.

In dieser Studie war der Tissue factor (TF) –Hauptinitiator der extrinsischen Koagulationskaskade und wichtiger Bestandteil unterschiedlicher Entzündungsprozesse- signifikant auf Thrombozyten und Monozyten in der IRI Gruppe im Gegensatz zur Kontrollgruppe 48h nach Perfusion erhöht. Da TF vermehrt nach inflammatorischen bzw. hypoxischen Zuständen expremiert wird, zeigte sich damit seine klinische Bedeutung für Lebertransplantatversagen nach Reperfusion. Die Rolle von TF auf Monozyten nach Nierentransplantation wurde an präklinischen Studien aufgezeigt. (Ushigome, 2002). P-Selectin und CD 40L sind beides Induktoren der Tissuefactor Expression auf Monozyten (Lindmark, 2000). Beide Marker waren auf Thrombozyten und parallel dazu der Tissue factor auf Monozyten in unserer IRI Gruppe am 2. postoperativen Tag erhöht. Das heißt, sie könnten als Vermittler der TF Expression auf Monoyzten und damit durch Stimulation der Blutgerinnung und Adhäsion der Leukozyten an den Gefäßen einen wichtigen Anteil am Leberreperfusionsschaden innehaben. Ein direkter Transfer von TF von Monozyten auf Thrombozyten gelingt durch Mikropartikel. Mikropartikel sind von der Membran abgetrennte Vesikel, die von Zellen bei Aktivierung oder während der Apoptose freigesetzt werden. Plättchen-Mikropartikel, die P-Selektin exprimieren, können Monozyten zur Hochregulierung der TF- Expression aktivieren (Barry1998). Das Monozyten abgeleitete Mikropartikel nach Stimulation im Vollblut nachgewiesen werden konnten, zeigten Monroe et al (Monroe, 1996). Ebenso sind Thrombozyten in der Lage TF zu synthetisieren und zu expremieren (Panes, 2007). Umgekehrt ist auch ein P-Selektinabhängiger Übergang von TF von Plättchen auf Monozyten beschrieben (Scholz, 2002). Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Entschlüsselung der TF-Aktivität von Monozyten, denn lediglich ein kleiner Teil wird an der Oberfläche expremiert, der andere Anteil liegt verschlüsselt –ohne

prokoagulatorische Aktivität- in der Membran intakter Monozyten vor (Osterud, 2003). Wir konnten desweiteren beobachten, dass gesteigerte TF- Werte auf Monozyten, nicht aber auf Thrombozyten, kompensiert wurden durch ebenfalls gesteigerte Werte an TFPI in der IRI-Gruppe mit einer Verzögerung von 4 Tagen also am 6. postoperativen Tag. Dieser Fakt könnte als negativer Rückkopplungsmechanismus der prokoagulatorischen Aktivität von Monozyten gewertet werden.

Die ermittelten Spenderdaten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Lediglich das Spenderalter in der IRS-Gruppe war im Mittel 15 Jahre älter als das der Kontrolle. Dies ist dahin gehend von Relevanz, als das das Alter als unabhängiger Faktor in multivariaten Analysen für frühe postoperative Komplikationen nach LTX gilt (Ploeg, 1993) und somit zur Prädisposition für einen Perfusionsschaden beigetragen haben kann.

Die Vergleichbarkeit der anderen Baseline-Daten der untersuchten Kollektive gewährleistet die Vergleichbarkeit der Qualität der transplantierten Organe. Transplantatrelevante Faktoren wie z.B. Art des Organs, warme und kalte Ischämiezeit, Patientencharakteristika, sowie Art der Immunsuppression und präoperative Laborwertewaren zwischen beiden Kollektiven vergleichbar.

Therapiekonzepte zielen primär oder sekundär auf das TF/TFPI System ab. So wird zum Beispiel das Einsetzen des GPIIb/IIIa Antagonisten Clopidogrel durch Hemmung der Degranulation und damit zum Senken des zirkulierenden TF genutzt (Stellbaum, 2007). Ein weiterer Therapieansatz könnte auch die Verwendung von Atostatin zur Reduktion von CD 40 L sein (Pignatelli, 2007), welches zur Reduktion der TF Expression führt. Dieses wiederum hätte, durch das Abmildern der thrombotischen Antwort, einen positiven Effekt auf das Transplantat. Kritisch anzumerken ist dabei, dass eine Veränderung der Thrombozytenaktivität genau abgewogen werden muss, einerseits durch ein erhöhtes Risiko für postoperative Blutungen und andererseits wegen der Wichtigkeit der Thrombozyten für die Leberzelleregeneration (Pereboom, 2008).

6. Zusammenfassung

Die Ergebnisse konnten zeigen, dass Thrombozyten nicht nur an der Koagulation beteiligt sind, sondern auch das Potenzial innehaben, sich an der Entzündungsreaktion der Gefäßwände des Transplantates beim Ischämie- und Reperfusionsschaden zu beteiligen. Trotz der nur geringen Anzahl an eingeschlossenen Patienten können wir mit unserer Studie verlässliche Ergebnisse über die prokoagulatorische und inflammatorische Rolle der Monozyten und Thrombozyten und dem zellassoziierten Tissue factor in der Pathogenese des Transplantatversagens nach LTX erbringen.

Wir fanden Korrelationen zwischen dem Anstieg von TF Expression auf Monozyten, Leberschädigung und Entzündungsreaktion am 2. postoperativen Tag und zeigten damit den engen Zusammenhang zwischen Gerinnung und Entzündungsreaktion in der Pathogenese des Leberreperfusionsschadens nach Lebertransplantation.

Unsere Ergebnisse betonen die Wichtigkeit des Zusammenspiels von Immunreaktion und zellulärer Gerinnung im Ischämie- und Reperfusionsschaden. Obwohl aktivierte Thrombozyten und Monozyten in Immunprozesse involviert sind, scheinen sie nicht den Anstoß zur akuten Abstoßungsreaktion zu geben.

Prospektiv sollten Studien mit größerer Patientenzahl zeigen, ob der funktionelle Status der Empfängerthrombozyten und Monozyten Einfluss auf die Frühkomplikationen hat.

Unsere Daten legen nahe, dass Therapiekonzepte, die auf den Aktivierungszustand der Thrombozyten in der frühen Phase des Reperfusionsschaden abzielen, durch Hemmung der Mikrothrombenbildung und Modulation der plättchenbedingten Entzündung, das große Potential tragen, positiv in das Geschehen des IRI einzugreifen.

7. Publikationen

Teile dieser Arbeit konnten bereits veröffentlicht werden:

Platelets. 2010;21(5):348-59.

Platelet activation and increased tissue factor expression on monocytes in reperfusion injury following orthotopic liver transplantation.

Esch JS, Jurk K, Knoefel WT, Roeder G, Voss H, Tustas RY, Schmelzle M, Krieg A, Eisenberger CF, Topp S, Rogiers X, Fischer L, Aken HV, Kehrel BE.

8. Literaturverzeichnis

Azoulay, D. et al, Effects of 10 Minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the grafts preservation and function: the ying and the yang. Ann Surg. 2005. 242(1): p. 133-9

Bajaj MS et al. Transcriptional expression of tissue factor pathway inhibitor, thrombomodulin and von Willebrand factor in normal human tissues. Thromb Haemost. 1999 Sep;82(3):1047-52.

Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. J Clin Invest102:136-1449

Basile, J et al. Correlation between von Willebrandfactor levels and early graft function in clinical liver transplantation. Clin. Transplantation , 1999. 13(1 Pt1): p. 25-31

Beberat, P.O. et al. Differentially expressed genes in postperfusion biopsiespredictearly graft dysfunction after liver transplantation. Transplantation , 2006. 85(5): p. 699-704

Bradley JA, et al, Update in transplantation 2003; Clin Transpl 2003;307-36

Beller, D. I, Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor.Exp Med 156, 1000-9 (1982).

Boring, L., et al., Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice.Clin Invest, 1997. 100(10): p.2552-61.

Brettschneider 1980: Myokardial protection. Thorac Cardiovasc Surg 28: 295-302,

Erhard J Untersuchungen zur Konservierung der Leber 1995. Pabst science Publishers. Lengerich. Berlin

Broering D et al, One hundred thirty-two consecutive pediatric liver transplants without hospital mortality: lessons learned and outlook for the future. Ann Surg. 2004 Dec;240(6):1002-12.

Butenas S Et al, Blood coagulation, Biochemistry (Mosc). 2002 Jan;67(1):3-12.

Carson SD, Brozna JP, The role of tissue factor in the production of thrombin. Blood Coagul Fibrinolysis. 1993 Apr;4(2):281-92.

Callard RE, et al., CD40 ligand and its role in X-linked hyper-IgM syndrome., Immunol Today 14: 559-564, 1993

Cywes R, Mullen JB, Stratis MA, Greig PD, Levy GA, Harvey PR, Strasberg SM (a). Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. Transplantation. 1993 Aug;56(2):316-23

Cywes R, et al, Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat Hepatology. 1993 Sep;18(3):635-47.

D'Alessandro AM, et al, Retransplantation of the liver:a 7-year experience.Transpl.1993;55:1083-7

Dormann, D., K.J. Clemetson, and B.E. Kehrel, The GPIIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. Blood, 2000. 96(7): p. 2469-78.

Drake TA, et al Selective cellular expression of TF in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am J Pathol. 1989; 134:1087-1097

Dreyfus M, Differentiation-controlled synthesis and binding of thrombospondin to granulosa cells; Endocrinology, Vol 130, 2565-2570
Erhard J, Kemnitz J, Eigler FW (Hrsg). Untersuchungen zur Konservierung der Leber 1995. Pabst science Publishers. Lengerich. Berlin

Evangelista V et al, Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule., Blood. 1999 Feb 1;93(3):876-85.

Everhart, J. E.; Lombardero, M.; Detre, K. M.; Zetterman, R. K.; Wiesner, R. H.; Lake, J. R. und Hoofnagle, J. H. (1997): Increased waiting time for liver transplantation results in higher mortality., *Transplantation* (Band 64), Nr. 9,1300-1306.

Falati S et al, Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*. 2005 Sep 15 DOI 10.1182/blood-2005-04-1512

Forde RC, Fitzgerald DJ. Reactive oxygen species and platelet activation in reperfusion injury; *Circulation* 1997; 95:787-789.

Forster Y et al, Tissue factor and tumor: Clinical and laboratory aspects., *Clin Chim Acta*. 2005 Sep 1;

Fox JE et al, Structure of the glycoprotein Ib.IX complex from platelet membranes, *Biol Chem*. 1988 Apr 5;263(10):4882-90.

Furie B, Furie BC., Leukocyte crosstalk at the vascular wall. *Thromb Haemost* 1997; 78:306-309.

Gao W, Bentley RC, Apoptosis of Sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of Preservation injury in rat liver transplantation; *Hepatology* 1998, 27(6)1652-60

Gawaz M, et al, Agglutination of Isolated Platelet Membranes *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1996;16:621-627

Gawaz M, et al, Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998;98:1164-1171

Girelli D et al, Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease, N Engl J Med. 2001; 344: 458-9

Gupta, D. et al, CD14 is a cellactivating receptor for bacterial peptidoglycan, Biol Chem 271, 23310-6 1996

Hagemann O, Laborlexikon, e-journal, ISSN 1860-966X

Hawkins PL and Maynard JR, Standardization of the prothrombin time for monitoring oral anticoagulans therapy: the international normalized ratio, Dade Technical Bulletin #19, 1991

He XS et al, The influence of warm ischemia injury on viability and posttransplantative outcome of liver graft from non-heart-beating donor in rats, Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2003 Jul 25;83(14):1236-40.

Henn V, et al, Inflammatory reaction of endothelial cells. Nature. 1998 Feb 5;391(6667):591-4.

Hickman, P.E. et al. Gamma GT as a marker of liver transplant rejection. Transplantation 1994. 57(8): p. 1278-80

Hickman, P.E. et al. Clinical chemistry and post- liver-transplant-monitoring. Clin. Chem. 1997. 43(8 Pt 2): p.1546-54

Hirsh J, Anticoagulant therapie, Dade Monograph 1985

Ishikawa M et al., CD40/CD40 Ligand Signaling in Mouse Cerebral Microvasculature After Focal Ischemia/Reperfusion, Circulation. 2005;111:1690-1696

Jaeschke, H., Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003. 284(1): p. G15-26

Jurk, K., et al., Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb J*, 2003. 17(11): p. 1490-2

Jurk K, Kehrel B, Platelets and the new comprehension of haemostasis, *Hamostaseologie*. 2005 Feb;25(1):39-49.

Kehrel B et al, Thrombospondin measured in whole blood--an indicator of platelet activation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996 Mar;7(2):202-5.

Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Axmann S, Hutter J, Messmer K, Krombach F (a). Platelet adhesion mediated by fibrinogen- intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation*, 2002. 74(5): p. 681-8];

Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, Hutter J, Messmer K, Krombach F (b). P-Selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock*, 2002 18(6): p. 529-35

Kim JS et al, Split liver transplantation: Past, present and future, *Pediatric Transplantation* 2004 Dec 8(6)644

Kiener PA et al., Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes, *Immunol*. 1995,155: 4917-4925,

Kusunoki, T. & Wright, S. D., Chemical characteristics of *Staphylococcus aureus* molecules that have CD14-dependent cell-stimulating activity. *J, Immunol* 157, 5112-7 (1996).

Labeta, M. O, Human B cells express membrane-bound and soluble forms of the CD14 myeloid antigen. *Mol Immunol* 28, 115-22 (1991).

Landers SC et al, Ultrastructural localization of tissue factor on monocyte-derived macrophages and macrophage foam cells associated with atherosclerotic lesions. *Virchows Arch.* 1994;425(1):49-54.

Landmann, R, Human monocyte CD14 is upregulated by lipopolysaccharide. *Infect Immun* 64, 1762-9 (1996).

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):169-73.

Lefer AM, Cambell B, Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion: role of selectins. *Circulation.* 1998 Sep 29;98(13):1322-8.

Lindmark E, Tenno T et al., Role of platelet P-Selectin and CD40L in the induction of monocytic TF Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2322-2328

Mackman N, Role of TF in Hemostasis, Thrombosis an Vascular Development: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2004;24:1015

Marino IR et al, Efficacy and safety of basiliximab with a tacrolimus-based regimen in liver transplant recipients. *Transplantation.* 2004 Sep 27;78(6):886-91.

Mazurier, C., et al., Molecular genetics of von Willebrand disease. *Annales de Genetique,* 1998. 41(1): p. 34-43.

McCaughan, G.W. et al., Thrombocytopenia post liver transplantation. Correlations with preoperative platelet count, blood transfusion requirements, allograft function and outcome. *Journal of hepatology*, 1992. 16(1-2): p. 16-22

Monaco C, Andreakos E, Young S, Feldmann M, Paleolog ET. Cell-mediated signaling to vascular endothelium: induction of cytokines, chemokines, and tissue factor. *J Leukoc Biol*. 2002; 71: 659–668

Monroe, D.M., M. Hoffman, and H.R. Roberts, Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1996. 7(4): p. 459-64

Mueller, A.R. et al. The release of cytokines, adhesion molecules, and extracellular matrix parameters during and after reperfusion in human liver transplantation. *Transplantation* 1996. 62(8): p. 1118-26

Nagata K et al, Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J Immunol*. 1993 Sep 15;151(6):3267-73.

Narizhneva N, Thrombospondin-1 up-regulates expression of cell adhesion molecules and promotes monocyte binding to endothelium , *The FASEB Journal Express Article*, oi:10.1096/fj.04-3310fje, 2005

Neuhaus, Pfitzmann. *Aktuelle Aspekte der LTX* . Bremen UNI-MED Sciene 2005

Oh C-K, et al, Independent Predictors for Primary Non-Function after Liver Transplantation. *Yonsei Medical Journal* 2004 45(6):1155-61

Osterud, B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor *Disease-a-Month*, Volume 49, Issue 1, January 2003, p 7-13

Panes, O., et al., Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood*, 2007. 109(12): p. 5242-50

Pereboom IT et al. Platelets in liver transplantation: friend or foe? *Liver transpl.* 2008; 14: 928-31

Persijn JP, van der Slik W., A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1976 Sep;14(9):421-7.

Pignatelli, P., et al., Oxidative stress-mediated platelet CD40 ligand upregulation in patients with hypercholesterolemia: effect of atorvastatin. *J Thromb Haemost*, 2007. 5(6): p. 1170-8

Ploeg, R.J., et al., Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation*, 1993. 55(4): p. 807-13

Pötzsch, B, Madlener K, Regulation der plasmatischen Gerinnungskaskade, *Hämostaseologie*, 2., vollständig aktualisierte und erweiterte Auflage, ISBN 978-3-642-01544-1_15

Pötzsch, B., Madlener, K. (Hrsg.): *Hämostaseologie – Grundlagen, Diagnostik, Therapie.* Springer, Berlin, Heidelberg 2010

Porte RJ et al, Long-term graft survival after liver transplantation in the UW era: late effects of cold ischaemia and primary dysfunction. *European Multicentre Study Group Transpl.Int.* 1998 11(1):164-7

Raffael, A. *Grundlagen der analytischen Durchflußzytometrie Labor-Medizin* (1988) 11, 89-97

Randolph GJ et al, Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. Blood. 1998 Dec 1;92(11):4167-77.

Rivers RP, The expression of surface tissue factor apoprotein by blood monocytes in the course of infections in early infancy. Pediatr Res. 1992 Jun;31(6):567-73

Ruf A, Patscheke H., Platelet-induced neutrophil activation: platelet-expressed fibrinogen induces the oxidative burst in neutrophils by an interaction with CD11C/CD18. Br J Haematol 1995; 90:791-796.

Ruggeri ZM et al, Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. Clin Invest 1983; 72:1-12.

[SOP Leitfaden LTX UKE 2.3.2. Anlage 02]

Schemmer P, et al, New aspects on reperfusion injury to liver- impact of organ harvest. Nephrol Dial Transpl.2004 Jul;19 Suppl.4:iv 26-35

Scholz, T., et al., Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. Thromb Haemost, 2002. 88(6): p. 1033-8

Schulte am Esch J 2nd, et al. Recipient levels and function of Willebrand factor prior to liver transplantation and its consumption in the course of grafting correlate with hepatocellular damage and outcome. Transpl Int. 2005; 18; 1258-1265

Schumann G et al, IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of AST, Clin Chem Lab Med 2002;40(7):725-33

Sindram, D., et al. Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver. *Faseb J*, 2001. 15(7):p. 1230-2

Singbartl K, Forlow SB et al., Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *Faseb J* 2001;15 p. 2337-2344

Solez K, Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions.. *Am J Transplant* 2008; 8:753-760

Stel HV et al, vonWillebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood* 1985;65:85-90

Stellbaum C et al., Clopidogrel-mediated reduction of circulating tissue factor in patients with stable coronary artery disease, *Eur J Haematol*. 2007 Apr;78(4):347-52. Epub 2007 Feb 27

Schwartz, BS, Monocyte synthesis of thrombospondin. The role of platelets.1989 *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 7512-7517

Szasz G. et al. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clin Chem*. 1969 Feb;15(2):124-36

Thakar CV et al. Identification of Thrombospondin 1 as a novel mediator of cell injury in kidney ischemia. *J. Clin Invest*. 2005 ; 115 p: 3451-3459]
Totsuka E, et al, Synergistic effect of cold and warm ischemia time on postoperative graft function and outcome in human liver transplantation. *Transplant Proc*. 2004 Sep;36(7):1955-8.

Ushigome H, et al The role of TF in renal ischemic reperfusion injury of the rat. *J.Surg Res*. 2002; 102:102-109

Van der Logt CP et al, Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in monocytes in response to bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1994 Apr;5(2):211-20.

Vogelbach P, Splitting liver transplantation. Orthotopic liver transplantation in two recipients with a single donor liver] *Helv Chir Acta*. 1991 Jul;58(1-2):147-8.

Wahlefeld AW et al, Modification of the Malloy-Evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in serum *Scand J clin Lab invest* 1972 29 Supplement 126:Abstr 11.12

Werner, Andreas, Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von Gangliosiden bei der E-Selektin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion
Dissertation 2001-- Technische Fakultät Universität Bielefeld
<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=urn:nbn:de:hbz:361-4466>
URL: <http://bieson.ub.uni-bielefeld.de/volltexte/2004/446/>

Weyrich AS et al, Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest*. 1996 Mar 15;97(6):1525-34

Weyrich AS et al, Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest*. 1995 May;95(5):2297-303.

Wright, S. D., Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin: dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. *Exp Med* 173, 1281-6 (1991).

Zhou H et al, Characterization of monocyte tissue factor activity induced by IgG antiphospholipid antibodies and inhibition by diltiazem. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2353-8. Epub 2004 Jun 29.

Ziegler-Heitbrock, H. W. & Ulevitch, R. J., CD14: cell surface receptor and differentiation marker. Immunol Today 14, 121-5 (1993).

9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADP	Adenosindiposphat
ATP	Adenosintriophosphat
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of differensation
CIT	cold ischaemic time
EC	endothelial cells
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FFP	fresh frozen plasma
g	Gramm
GP	Glukoprotein
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
I/R	Ischämie/Reperfusion
IRI	ischemic reperfusion injury
IRS	Ischämie-Reperfusionsschaden
KDa	Kilodalton
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M/l	Mol/Liter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter

μl Mikroliter
mmol Millimol
oLTX orthotope Lebertransplantation
PBS Phosphat puffered saline
PMN polymorph neutrophils
PNF primary non function
p.o. postoperativ
POD postoperative day
ROS reaktive Sauerstoffspezies
PRP Plättchenreiches Prpm rounds per minute
RT Raumtemperatur
s.c. subkutan
sec Sekunde
TF Tissue factor
TFPI Tissue factor pathway inhibitor
TSP-1 Thrombospondin-1
U units
vWF von Willebrand Faktor
WIT warm ischaemic time

10. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Jan Schulte am Esch für die Themenstellung, langjährige Unterstützung und Beratung während dieser Doktorarbeit danken. Er hat es geschafft, mich immer wieder zu motivieren. Durch seine Unterstützung konnte bereits ein Teil dieser Promotion publiziert werden. Prof. Lutz Fischer als meinem Doktorvater danke ich sehr für die Übernahme der Dissertation.

Dem gesamten Team der hepatobiliären Chirurgie, den MTAs und den Transplantkoordinatoren des UKE danke ich für die allseits freundliche Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Dem Team um Prof. Beate Kehrel im Münster danke ich für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie und die weitere Beratung beim Durchführen der Experimente.

Natürlich bedanke ich mich auch bei meinem Mitdoktoranden Holger Voss, ohne den ich diese Arbeit niemals geschafft hätte. Für die allseits willige Unterstützung bei Problemen bei der Textverarbeitung danke ich Lutz Rippe ganz herzlich.

Zum Schluss danke ich meinem Mann und meiner besten Freundin Dorit dafür, dass sie nie an dem Gelingen dieser Arbeit zweifelten.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Gesine Steinig geb. Röder
Familienstand verheiratet, 3 Kinder
Geburtsdatum 26.02.1973
Geburtsort Grevesmühlen
Anschrift Ilseweg 7, 39291 Möser
Email: Gesine_Steinig@web.de

Schulbildung:

1979-1989 Wilhelm Pieck Oberschule Grevesmühlen
1994-1996 berufsbegleitend Abendgymnasium Wismar
06/1996 Abitur

Berufsausbildung:

1989-1992 Abgeschlossene Berufsausbildung zur Krankenschwester,
Höhere Pflegefachschule Wismar

Berufliche Tätigkeit:

1992 – 1994 Krankenschwester, Abteilung für Anästhesiologie, DRK
Krankenhaus, Grevesmühlen
1994 – 1998 Krankenschwester, Ambulantes OP- Zentrum
Schwanbeck, Grevesmühlen

Hochschulbildung:

04/1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
03/2000 Ärztliche Vorprüfung

03/2001 1. Staatsexamen

09/2003 2. Staatsexamen

10/2004 3. Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit:

02/06 – 10/07 Assistenzärztin, Abteilung für Urologie, Segeberger Kliniken GmbH, Bad Segeberg

11/07 – 12/08 Assistenzärztin, Abteilung für Chirurgie, Segeberger Kliniken GmbH, Bad Segeberg

03/10 – 10/10 Assistenzärztin, Abteilung für Kardiologie, Segeberger Kliniken GmbH, Bad Segeberg

01/12- jetzt KH Jerichower Land Burg, Innere Abteilung,

Promotion seit 2001 Thrombozytenaktivierung und Tissue Factor Expression auf Monozyten im frühen Verlauf nach orthotoper Lebertransplantation korreliert mit dem Ausmaß des hepatischen Ischämie/Reperfusionsschadens

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere außerdem, dass ich keine andere als die angegebene Literatur verwendet habe. Diese Versicherung bezieht sich auch auf alle in der Arbeit enthaltenen Zeichnungen, Skizzen, bildlichen Darstellungen und dergleichen.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
