

**Aus der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Königsrainer**

**Expression des Interzellulären Adhäsionsmoleküls
(ICAM-1) im Lebergewebe während und nach einer
Lebertransplantation**

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

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls- Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Ruth Christiane Strecker, geb. Polap
aus
Meersburg**

2006

Dekan : Professor Dr. I. B. Autenrieth
1.Berichterstatter: Professor Dr. Viebahn
2.Berichterstatter: Professor Dr. P. Weber

Für Papa

**„Der Mensch ist erst wirklich tot, wenn niemand mehr an ihn
denkt... “**

Berthold Brecht

Für immer in meinen Gedanken, mit Liebe und Dankbarkeit

1	EINLEITUNG	6
1.1	Transplantation der Leber	6
1.2	Transplantationsimmunologie	7
1.2.1	Das HLA – System	7
1.2.2	Leukozytenaktivierung	7
1.2.3	Leukozytenadhäsion / ICAM-1	8
1.2.4	Die Adhäsionskaskade	10
1.2.5	Der Ischämie- und Reperfusionsschaden	12
1.3	Fragestellung	13
2	MATERIAL UND METHODE	14
2.1	Material	14
2.1.1	Probenentnahme bei der Operation	14
2.1.2	Anfertigung der Schnitte	14
2.1.3	Histologische Färbung	15
2.2	Patienten	17
2.3	Methode	18
2.3.1	Leberbiopsien	18
2.3.2	Die Färbung	18
2.3.3	Die Auswertung	20
3	ERGEBNISSE	21
3.1	Verlauf ICAM-1-positiver Strukturen während der orthotopen Lebertransplantation	21
3.1.1	Anteile ICAM-1-positiver Arterien im Verlauf der Transplantation	21
3.1.2	Anteile ICAM-1-positiver Venen im Verlauf der Transplantation	22
3.1.3	Anteile ICAM-1-positiver Gallengänge im Verlauf der Transplantation	23
3.1.4	Anteile ICAM-1-positiver Hepatozyten im Verlauf der Transplantation	24
3.2	Reperfusionsschaden	25
3.2.1	Reperusionsindex	25
3.2.2	Zusammenhang zwischen ICAM-1-Expression nach Reperfusion und dem Reperfusionsschaden	26
3.2.3	Zusammenhang zwischen ICAM-1 Expression nach Reperfusion und einer histologisch gesicherten Abstoßung	27

3.2.4	Zusammenhang zwischen einer erhöhten ICAM-1 Expression und der Dauer der kalten Ischämiezeit	29
4	DISKUSSION	30
4.1	Methoden der Probengewinnung, Lagerung und Verarbeitung	30
4.2	Verlauf der Expression von ICAM-1 während der Lebertransplantation	31
4.3	Zusammenhang zwischen ICAM-1 Expression nach Reperfusion und dem Reperfusionsschaden	33
4.4	Zusammenhang zwischen ICAM-1 Expression nach Reperfusion und einer Abstoßung	35
4.5	Zusammenhang zwischen ICAM-1 Expression nach Reperfusion und Dauer der kalten Ischämiezeit	37
5	AUSBLICK	38
6	ZUSAMMENFASSUNG	39
7	LITERATURVERZEICHNIS	41
	DANKSAGUNG	50
	LEBENS LAUF	51

1 Einleitung

1.1 Transplantation der Leber

Die erste Organtransplantation fand im Jahre 1883 statt. Es war die Verpflanzung einer Schilddrüse, die den Versuch darstellte das Krankheitsbild des Kretinismus ursächlich zu behandeln (Knauer 1919). Diese frühen Versuche scheiterten jedoch am fehlenden Wissen um die Immunologie. Die Organe wurden bereits nach kurzer Zeit wieder abgestoßen, so daß die Organtransplantation, obwohl deren kurativer Ansatz erkannt worden war, bereits in den 30er Jahren wieder aufgegeben wurde. 1945 wurde die Forschung wieder aufgenommen und 1962 gelang in Boston die erste erfolgreiche Nierenverpflanzung unter chemischer Immunsuppression. Vorher waren erfolgreiche Organübertragungen nur unter eineiigen Zwillingen möglich gewesen (Merrill, Murray). Im Juni des selben Jahres gelang auch die erste erfolgreiche Lebertransplantation beim Menschen (Starzl, Marchiaro 1963).

Heute wird in Deutschland täglich im Durchschnitt eine Leber verpflanzt. Alleine im Jahre 1996 waren es sogar 699 Lebern, bei insgesamt 3436 Organübertragungen.

Die Transplantation der Leber stellt seit den 80er Jahren ein etabliertes Verfahren zur kurativen Behandlung schwerer Lebererkrankungen dar. Die häufigsten Indikationen sind Zirrhosen nach Virusinfekten (Hepatitis B,C), bzw. Zirrhosen nach Alkoholmißbrauch, sowie angeborene Stoffwechseldefekte .

Die Überlebenszeiten von Patienten nach Lebertransplantation haben sich stetig verbessert. Grundlage hierfür war die Einführung einer adäquaten immunsuppressiven Therapie, wie sie 1982 mit dem Medikament Cyclosporin gelang. Mittlerweile gelten orientierende 5-Jahres-Überlebenszeiten von 60% je nach Grundkrankheit des Patienten.

1.2 Transplantationsimmunologie

1.2.1 Das HLA – System

Die Unterscheidung von körpereigenem und körperfremden Gewebe ist eine Aufgabe des Immunsystems. Die HLA – Antigene üben hierbei eine wichtige Funktion aus: HLA – Antigene sind Zelloberflächenproteine, die beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 in einem eng begrenzten Gebiet, dem sogenannten Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex = MHC) kodiert werden (Francke und Pellegrino 1977, Benacerraf 1981, Owen 1991). Sie unterliegen einem ausgeprägten genetischen Polymorphismus und lassen sich in drei verschiedene Gruppen (HLA Klasse1, HLA Klasse2 und HLA Klasse3 Gene) unterteilen. Die HLA Klasse1 und HLA Klasse2 Gene kodieren Moleküle, die an der Immunologischen Erkennung und der Immunantwort beteiligt sind (Owen 1991). Die HLA Klasse1 Antigene können serologisch nachgewiesen werden und sind auf fast allen kernhaltigen Zellen zu finden (Bodmer 1981). Sie sind verantwortlich für die Lyse von Zielzellen durch zytotoxische T – Lymphozyten (Zinkernagel und Doherty, 197). HLA Klasse2 Antigene finden sich auf Zellen des Immunsystems. Sie werden von T-Helferzellen für die Erkennung von Antigenen auf den antigenpräsentierenden Zellen benötigt (Benacerraf 1991).

1.2.2 Leukozytenaktivierung

Die HLA Klasse1 und 2 Antigene präsentieren fremde Peptidantigene auf ihrer Zelloberfläche, den CD4-T-Zellen (T-Helferzellen). Nach erfolgter Aktivierung differenzieren sich die T-Helferzellen und setzen Zytokine (Interleukin1, TNFa) frei. Diese stimulieren zytotoxische Lymphozyten, B-Lymphozyten und Zellen der unspezifischen Abwehr. Außerdem fördern sie die Differenzierung und Teilung der B-Lymphozyten zu Antikörper – und Komplement bildenden Plasmazellen (Hammer 1993). Diese beteiligen sich an der Entzündungsreaktion, welche das Transplantat zerstört.

1.2.3 Leukozytenadhäsion / ICAM-1

Eine wichtige Rolle spielt bei dieser Entzündungsreaktion die, über Adhäsionsmoleküle vermittelte Leukozytenaggregation. Eine Voraussetzung für eine Entzündungsreaktion ist eine Interaktion zwischen T-Lymphozyten und den antigenpräsentierenden Zellen. Den Kontakt zwischen diesen Zellen stellen die Adhäsionsmoleküle her. Sie dienen nicht nur der Bindung der Zellen aneinander, sondern auch der Signalübertragung zwischen den Zellen. Das Zell-Oberflächenadhäsionsmolekül ICAM-1 (CD 54) ist ein einzelkettiges Glykoprotein (Rothlein et al. 1986) mit gewebsspezifischer unterschiedlicher Glykosylierung, woraus seine Verschiedenartigkeit im Molekulargewicht von 90-140 kD resultiert. Sein reines Proteinrückgrat hat bei allen Geweben das Molekulargewicht 53 kD (Dustin et al. 1986). Es gehört zur Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie (Staunton et al. 1988). ICAM-1 ist auf einer Vielzahl von Zellen der hämatopoetischen, und auch der nichthämatopoetischen Reihe, konstitutiv oder durch Zytokine induzierbar zu finden. Das Adhäsionsmolekül findet sich auf Endothelien großer und kleiner Gefäße, auf B-Zellen und auf antigenpräsentierenden Zellen (Dustin et al 1986). ICAM-1 ist der Hauptligand des LFA-1 Antigens (Lymphocyte function associated), welches die Adhäsion von an der Immunantwort beteiligten Zellen untereinander vermittelt (Marlin und Springer 1987). Mit geringerer Intensität bindet ICAM-1 auch an das Makrophagen Oberflächenprotein Mac 1. Außerdem wurde ICAM-1 als Rezeptor für Plasmodium falciparum (Berendt et al 1992) und Rhinoviren (Staunton et al 1989) identifiziert. Die Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei den Interaktionen der Zellen des Immunsystems. Die erste Wechselwirkung von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen wird durch Adhäsionsmoleküle herbeigeführt. Beim ersten Zusammentreffen bindet LFA 1 an ICAM-1 . So kann die T-Zelle die antigenpräsentierende Zelle nach spezifischen MHC-Komplexen absuchen. Ist das spezifische Antigen gefunden worden, löst ein intrazelluläres Signal über den T-Zellrezeptor eine Konformationsänderung von LFA 1 aus, welche die Affinität der adhäsiven Interaktion verstärkt und den Kontakt verlängert. Die T-Zelle wird stimuliert und setzt ihre Effektormoleküle frei. Schließlich lösen sich die beiden Zellen voneinander (Dustin und Springer 1989, Hahn et al 1992). Die Regulation der ICAM-1 Expression erfolgt im Vergleich zu anderen Adhäsionsmolekülen relativ langsam.

Die LFA Expression kann hingegen schnell und vorübergehend hochreguliert werden. Durch diese Kombination von Langzeit- und Kurzzeitexpression wird eine Feinregulation der Leukozytenadhäsion erreicht (Schürmann 1997). Dieser Vorgang kann auch bei der Abstoßung von transplantierten Organen beobachtet werden. Man unterscheidet hierbei drei Formen:

Hyperakute Abstoßung: Sie zeigt sich binnen Minuten nach der Transplantation und führt zu einer Thrombose der Organgefäße und ischämischer Nekrose des Transplantates. Sie wird verursacht durch zirkulierende, präexistierende Antikörper, welche aufgrund früherer Transplantationen oder Transfusionen im Körper vorhanden sind. Diese Antikörper werden von Antigenen gebunden und führen zu einer Komplementaktivierung, was zu einer Verletzung des Gefäßendothels, einer Entzündung und schließlich zur Thrombose führt (Abbas, Lichtman, Pober 1997).

Die akute Abstoßung: Sie tritt innerhalb von Tagen oder Wochen nach der Transplantation auf. Sie wird hauptsächlich über T-Zellen vermittelt, welche gegen Alloantigene im Transplantat reagieren. Sie greifen entweder die Gefäßendothelien an, und führen so zum Bild einer Vaskulitis, oder sie führen zu einer Zerstörung der Parenchymzellen, was dann zum Organversagen führt.

Die chronische Abstoßung: Sie ist charakterisiert durch eine Fibrose mit Verlust der normalen Organstruktur. Es kann auch eine Veränderung der Blutgefäße auftreten, die an eine Arteriosklerose erinnert. Auch hier scheinen T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen, die Zytokine sezernieren, welche die Proliferation und Aktivität der Fibroblasten und glatten Gefäßmuskelzellen stimulieren.

1.2.4 Die Adhäsionskaskade

Bei fast allen Reaktionen des Immunsystems müssen zirkulierende Leukozyten die Blutgefäße verlassen, um an den Ort der Entzündung zu gelangen. Dieser Vorgang wird auch als Extravasation bezeichnet und läuft in vier Schritten ab.

- Als erstes verlassen die Leukozyten die zentrale Blutstrombahn und nähern sich der Gefäßwand an (Margination). Dann bewegen sie sich in einer Art Rollbewegung am Gefäßendothel entlang. Diese Verminderung der Fließgeschwindigkeit kommt durch erste lockere Bindungen zwischen Leukozyten und Gefäßendothel zustande. Dieser lockere Kontakt (tethering) wird hauptsächlich durch Zelladhäsionsmoleküle der Selektinfamilie vermittelt. Diese Bindung ist aber sehr schwach und wird durch den Blutstrom immer wieder gelöst (Steinhoff G, Brandt 1996).
- Der zweite Schritt, die eigentliche stabile Zelladhäsion, wird durch die Integrine auf den Leukozyten und ICAM-1 auf den Gefäßendothelien vermittelt. ICAM-1 wird nach Stimulation der Endothelzelle mit Cytokinen hochreguliert, wobei die Expression von ICAM-1 langsamer eintritt als die Expression von anderen Adhäsionsmolekülen (Selektinen).
- Der dritte Schritt ist die transendotheliale Migration, welche durch chemotaktische Substanzen (Cytokine) gesteuert wird. Die Passage findet meist an den interendothelialen Kontaktstellen statt, und wird durch das Zelladhäsionsmolekül PECAM 1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1) vermittelt. Hierfür werden von der passierenden Zelle lysierende Enzyme freigesetzt.

- Den vierten Schritt stellt dann die weitere Migration zum Entzündungsort dar. Auch hier scheinen chemotaktische Substanzen eine Rolle zu spielen (Schürmann 1997).

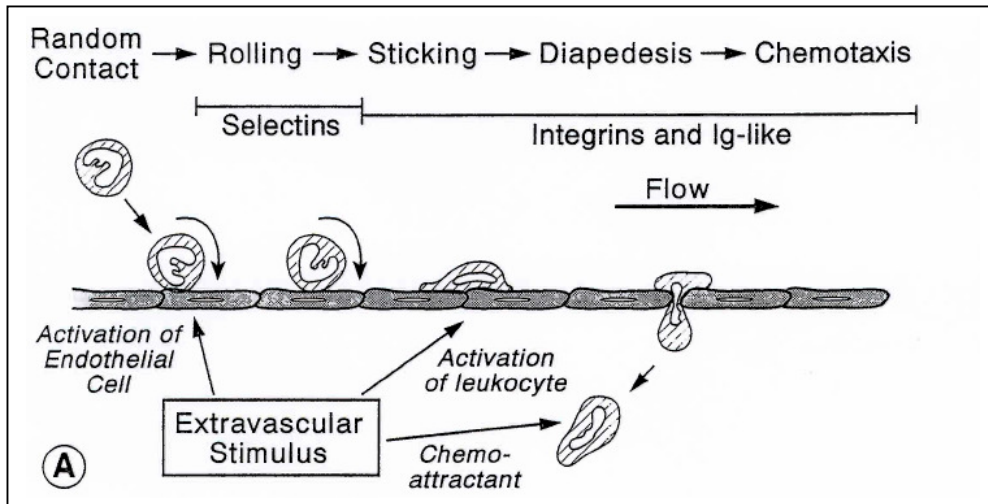


Abb.1: Schema der Leukozytenadhäsionskaskade

1.2.5 Der Ischämie- und Reperfusionsschaden

Diese Leukozytenemigration spielt sich so auch bei der Entstehung eines Reperfusionsschadens nach der kalten Ischämiezeit bei Transplantationen ab. Bei Blutdruckabfall und Ischämie führen neutrophile Zellen, aufgrund ihrer morphologischen Besonderheiten (Größe, Elastizität), besonders im aktivierten Zustand schnell zu einer Propfbildung, die dann zu einer Mikrozirkulationsstörung führt (Engler et al 1994, Pretto EA 1991). Hierdurch kann es im Zusammenspiel mit anderen Mechanismen, wie capillare Schrankenstörung, erhöhter Gewebedruck und vermindertem Capillardurchmesser, zu einem irreversiblen Perfusionsstopp kommen (Gute et al 1995). Nach Wiederherstellung der Blutversorgung des Organs kann die Schädigung aber noch verstärkt werden. Für diesen Reperfusionsschaden verantwortlich sind die Generierung von Sauerstoffradikalen, die Freisetzung verschiedener lokaler und systemisch wirkender Mediatoren, sowie die Rekrutierung und Aktivierung zirkulierender Entzündungszellen. Diese beginnen dann in der oben beschriebenen Weise die Blutgefäße zu verlassen. Dabei werden die Endothelzellen der Gefäßwände durch toxische Sauerstoffprodukte und Proteasen der Neutrophilen angegriffen. Über ähnliche Mechanismen wird auch das Gewebe außerhalb der Gefäße geschädigt (Schürmann 1997).

1.3 Fragestellung

Obwohl die Transplantationsmedizin in den letzten Jahren große Fortschritte verzeichnen konnte, stellen immunologische Komplikationen wie Abstoßung, sowie Ischämie und Reperfusionsschaden immer noch ein häufiges und ernstzunehmendes Problem dar.

Die Adhäsionsmoleküle scheinen eine wichtige Rolle im immunologischen Geschehen während und nach der Lebertransplantation zu spielen, da sie bei fast jedem entzündlichen Geschehen exprimiert werden, und somit als Marker für immunologische Reaktionen dienen können.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, wie sich die Expression von ICAM-1 im Verlauf der Transplantation verändert und welche Rückschlüsse auf ein späteres immunologisches Geschehen sich daraus ziehen lassen. Es soll die Frage beantwortet werden, ob anhand des Expressionsmusters von ICAM-1 eine Aussage über einen stattgefundenen Ischämie- oder Reperfusionsschaden gemacht werden kann.

Desweiteren soll geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen einer späteren Abstoßung und der erhöhten Expression von ICAM-1 besteht.

Außerdem soll diskutiert werden inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Expression von ICAM-1 und der Dauer der kalten Ischämiezeit des Lebertransplantates besteht.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Probenentnahme bei der Operation

- Biopsienadel: 14 Ga (15,2cm), steril, 20mm Probenentnahmebereich
Baxter Healthcare Cooperation Deerfield USA
- UW Via Span: Belzer UW Du Pont Pharma Netherlands
- Insulin Velasulin; Human
Novo Nordisk Pharma GMBH Mainz-
- Penicillin: Benzylpenicillin Natrium
Grünenthal GMBH Mainz
- Biopsieröhrchen: Bio freeze Vials
Costar Cooperation Cambridge USA

2.1.2 Anfertigung der Schnitte

- Microtom: Klinik
- Objektträger: 76/26mm
R. Laugenbrinck Emmendingen
- Aceton: Pro Analysis 4°
Merck Darmstadt

2.1.3 Histologische Färbung

-Pipetten, -Spitzen:	100 μ l, 200-1000 μ l, 0,5-10 μ l Eppendorf
-Glaspipetten:	Pipette-Fortuna 150ml Pasteur
-Fettstift:	Dako-Pen
-Röhrchen:	Falcon Becton Dickinson Labware, Braunschweig
-Waage:	Sartorius analytic
-Ampuwa aqua dest.:	Fresenius Bad Homburg
-Tris-Puffer:	Trizma Sigma Chemic Deisenhofen
-NaCl:	Pro analysis Merck Darmstadt
-Rinderserumalbumin:	Behring Marburg
-Kaninchenserum:	Dako A/S Denmark
-Antikörper,	HLA1,HLA2: Monoklonal Immunotech Marseille
-Antikörper anti human ICAM-11	0,1mg, Monoklonal British Biotechnology
-Antikörper Rabbit anti Mouse	Immunglobulin Dako A/S Denmark
-Antikörper APAAP:	Mouse, Monoklonal

Dako A/S Denmark

-Neufuchsin: Substrate system, Dako Cooperation USA

-Levanisole: Sigma Chemical company St. Louis USA

-Hämalaun: in TBS Mayers Hämalaun
Merck Darmstadt

-Gelatine: Glyceringelatine
Merck Darmstadt

-Deckgläser: 24/40mm
R. Laugenbrinck, Emmendingen

-Mikroskop: Zeiss, Oberkochen

2.2 Patienten

Es werden in dieser Studie 31 Lebertransplantationen (davon 8 Retransplantationen) untersucht.

Die Indikationen zur Lebertransplantation verteilen sich auf folgende Diagnosen:

Diagnose	Anzahl Patienten
Primär biliäre Zirrhose	8
Retransplantation	8
Alkoholtoxische Zirrhose	5
Sklerosierende Cholangitis	3
Posthepatische Zirrhose nach HCV	3
Sonstige Indikationen	2
Posthepatischr Zirrhose nach HBV	1
Akutes Leberversagen	1

2.3 Methode

2.3.1 Leberbiopsien

Das Biopsiematerial wurde im Rahmen von Lebertransplantationen, mittels einer speziellen Hohlnadel zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus dem rechten Leberlappen entnommen. Den genauen Punktionsort legte der Operateur anhand der OP-Verhältnisse fest. Die Zeitpunkte der Entnahmen waren bei der Spender-Operation (Leberentnahme): nach Laparotomie, sowie vor Verpackung des Organs. Bei der Operation des Empfängers waren die Zeitpunkte während der Präparation der Leber, sowie eine Stunde nach Reperfusion.

Nach der Entnahme wurden die Biopsien verpackt und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte im Schnellschnittlabor der Klinik an einem Mikrotom Schneidegerät. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und bei -24°C bis zur Färbung aufbewahrt.

2.3.2 Die Färbung

Zur Weiterverarbeitung mussten die Schnitte auf Raumtemperatur aufgetaut werden. Nach Beschriftung der Objektträger wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, um ein Auslaufen der verwendeten Reagenzien zu verhindern. Es erfolgte eine Fixierung in Aceton für zwei Minuten bei 4°C .

Es wurden nun, je nach Größe der Schnitte, ein Volumen zwischen 25-100 μl Kaninchenserum als Blockierungsreagenz aufpipetiert, um unspezifische Bindungen von Proteinen an Gewebestrukturen zu verhindern. Das Kaninchenserum wurde sofort wieder abgesaugt. Jetzt wurde der, zuvor mit TBS und 3%igem Rinderserumalbumin auf 1:3000 verdünnte, Primärantikörper (Antikörper anti-human ICAM-1), hinzugegeben und reagierte mit dem Gewebeantigen.

Es folgte eine dreißigminütige Inkubation in einer flachen, mit einem Deckel verschließbaren Kunststoffschachtel, die mit feuchten Tüchern ausgelegt wurde (feuchte Kammer). Zum Entfernen der überschüssigen Antikörper wurden die Objektträger für eine Minute in ein Gefäß mit TBS-Puffer gestellt.

Nun wurde der Primärantikörper mit einem Brückenantikörper (Antikörper Rabbit anti Mouse) überschichtet. Es erfolgte erneut eine dreißigminütige Inkubation in der feuchten Kammer mit einer abschließenden einminütigen Spülung in TBS-Puffer. Den nächsten Schritt stellte die Bindung des APAAP-Komplexes an den Brückenantikörper dar. Nach aufpipetieren von 25-100µl des APAAP-Komplexes wurde wieder für dreißig Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Es folgte die Spülung in TBS-Puffer.

Die nächsten zwei Schritte waren eine Wiederholung der Brückenantikörper und APAAP-Komplex Bindung, mit dem Unterschied, dass sich die Inkubationszeit auf 10 Minuten verkürzte.

Nun wurden die Präparate mit einer Mischung aus Neufuchsin-Substrat und 2µl Levamisole bedeckt und für 15 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Die überschüssige Farbe wurde sorgfältig mit destilliertem Wasser abgespült. Die Gegenfärbung erfolgte für 7 Minuten in Hämalaun, das 1:10 mit TBS-Puffer verdünnt wurde.

Nach dem Abspülen mit destilliertem Wasser wurden die Deckgläser mit flüssiger Gelatine auf die Objektträger aufgebracht.

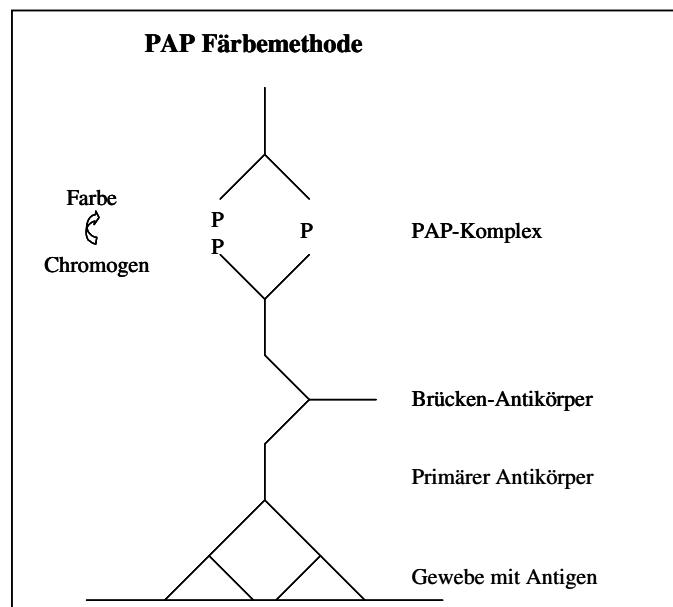


Abb. 2: Schema der APAAP-Färbemethode.

2.3.3 Die Auswertung

Die Auswertung erfolgte unter dem Durchlichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung. Es wurden 4 Gesichtsfelder ausgezählt. Gezählt wurden Arterien, Venen, Gallengänge und Hepatozyten pro Gesichtsfeld, sowie der Anteil der positiv gefärbten Arterien, Venen, Gallengänge und Hepatozyten pro Gesichtsfeld.

3 Ergebnisse

3.1 Verlauf ICAM-1-positiver Strukturen während der orthotopen Lebertransplantation

Es wurden die Anteile positiver Arterien, positiver Venen, positiver Gallengänge und positiver Hepatozyten zu den jeweiligen Operationszeitpunkten bestimmt. Daraus berechnete man die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Struktur zu jedem Zeitpunkt.

3.1.1 Anteile ICAM-1-positiver Arterien im Verlauf der Transplantation

Bei den Arterien zeigte sich ein Anstieg der positiv gefärbten Anteile auf 20 % erst zum Zeitpunkt der Präparation der Spenderleber (Abb. 3).In den Proben nach Laparatomie fanden sich keine Arterien. Zum Zeitpunkt der Reperfusion des Organs lag der Mittelwert der positiven Anteile dann doppelt so hoch (40%).

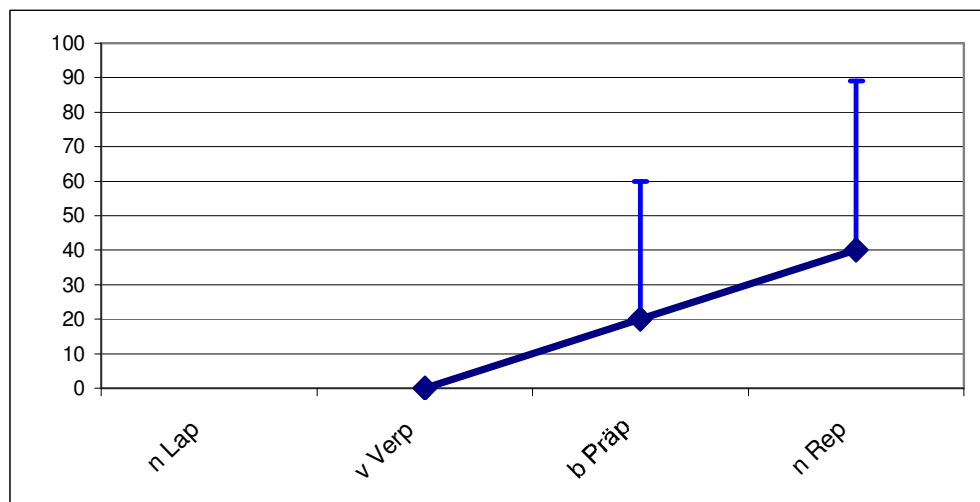


Abb. 3 Anteile ICAM-1- positiver Arterien im Verlauf der Transplantation mit Mittelwerten und Standardabweichungen

3.1.2 Anteile ICAM-1-positiver Venen im Verlauf der Transplantation

Positiv gefärbte Venen zeigten sich schon nach Laparotomie des Spenders (25%). Dieser Wert verringerte sich bis zur folgenden Probenentnahme bei Verpackung geringfügig auf 23 %. Nachfolgend stiegen die Mittelwerte nach Präparation (39%) und nach Reperfusion (54%) jedoch deutlich an.(Abb.4)

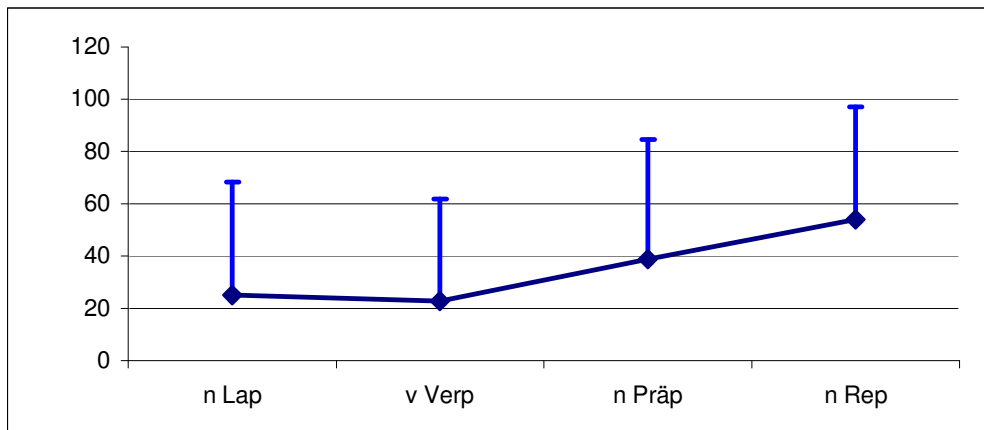


Abb. 4: Anteile ICAM-1- positiver Venen im Verlauf der Transplantation mit Mittelwerten und Standardabweichungen

3.1.3 Anteile ICAM-1-positiver Gallengänge im Verlauf der Transplantation

Bei den Gallengängen wurde der höchste Wert zu Beginn der Operation, nach Laparatomie des Spenders festgestellt (33%). Zu den Zeitpunkten vor Verpackung (25%) und bei Präparation (17%) fielen die Mittelwerte etwas ab, um dann nach Reperfusion wieder etwas anzusteigen (20%). Abb. 5

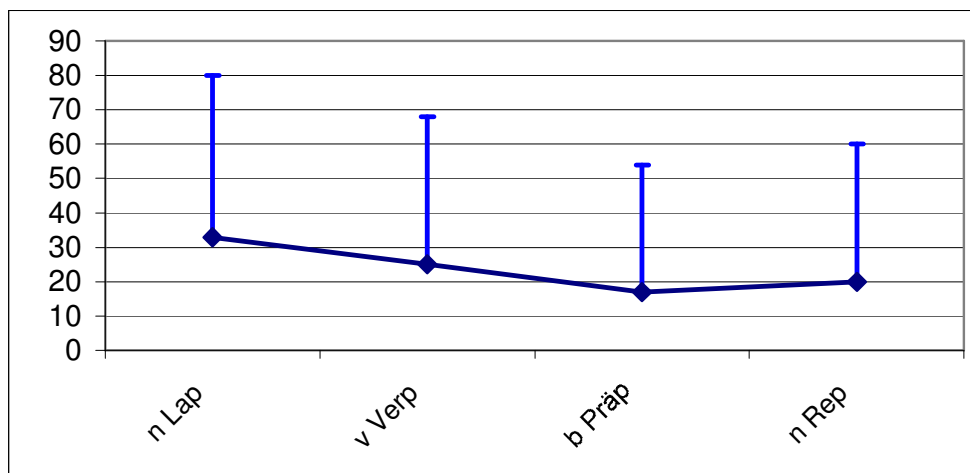


Abb. 5: Anteile ICAM-1- positiver Gallengänge im Verlauf der Transplantation mit Mittelwerten und Standardabweichungen

3.1.4 Anteile ICAM-1-positiver Hepatozyten im Verlauf der Transplantation

Der Anteil positiv gefärbter Hepatozyten lag nach Laparotomie bei 22%. Es konnte dann ein geringfügiger Abfall auf 20,6% vor Verpackung festgestellt werden, bevor die Werte bei Präparation wieder anstiegen (36,9%). Nach Reperfusion sanken die Mittelwerte dann wieder auf 31,4%. Abb. 6

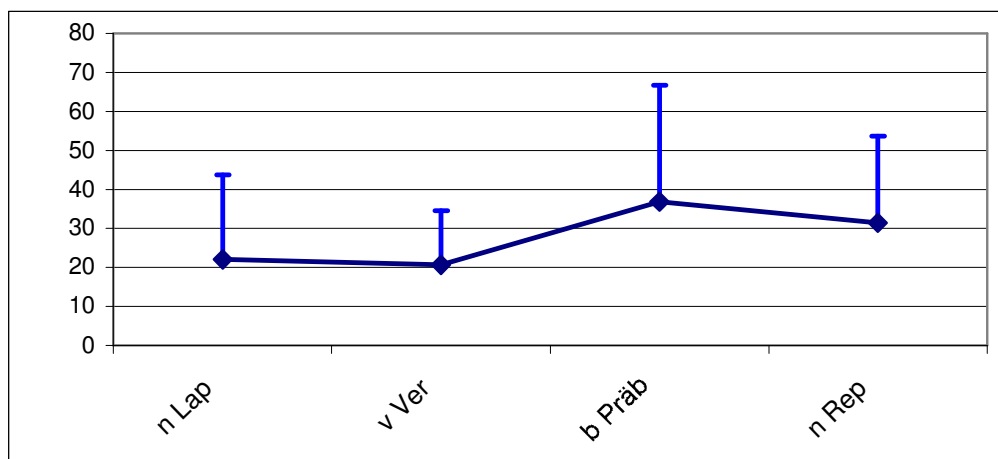


Abb. 6: Anteile ICAM-1- positiver Hepatozyten im Verlauf der Transplantation mit Mittelwerten und Standardabweichungen

3.2 Reperfusionsschaden

3.2.1 Reperusionsindex

Der Reperfusionsschaden wurde aus dem Mittelwert der höchsten Transaminasen- (Glutamat-Oxalazetat-Transaminase=GOT, Glutamat-Pyruvat-Transaminase=GPT) und GLDH (Glutamat-Dehydrogenase) Konzentrationen in den ersten vierzehn postoperativen Tagen der Lebertransplantation definiert.

$$\text{Reperfusionsschaden} = (\text{GOT} + \text{GPT} + \text{GLDH}) / 3$$

Anhand der Höhe des errechneten Reperfusionsschadens wurden die Patienten in 3 Indexgruppen aufgeteilt.(Abb.7)

Die Indexgruppe 1 (16 Patienten) wies einen errechneten Reperfusionsschaden bis zu 1000 U/l auf. Die Indexgruppe 2 (7 Patienten) hatte einen Reperfusionsschaden bis zu 3000U/l, und in der Indexgruppe 3 (3 Patienten) lag der berechnete Reperfusionsschaden über 3000U/l

Die Intensität des Reperfusionsschadens war von Gruppe 1 zu Gruppe 3 zunehmend.

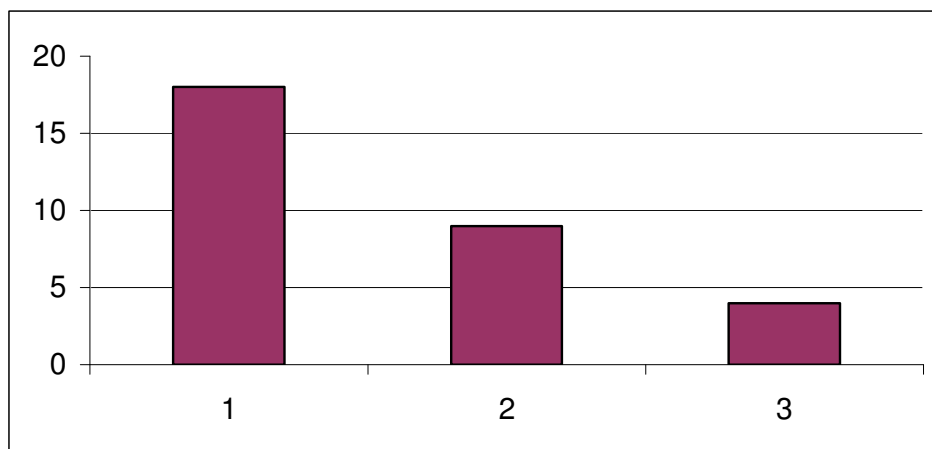


Abb7: Verteilung der Patienten auf die drei Reperusionsindexgruppen

3.2.2 Zusammenhang zwischen ICAM-1-Expression nach Reperfusion und dem Reperfusionsschaden

Es wurde untersucht, ob bei Patienten mit einer erhöhten ICAM-1-Expression auf den Hepatozyten nach Reperfusion, postoperativ ein Reperfusionsschaden nachzuweisen war.

In der Gruppe der Patienten mit dem Reperfuionsindex 1 lag der durchschnittliche Quotient der positiv markierten Hepatozyten bei $29,5\% \pm 17,6$.

In der Indexgruppe 2 stieg der Anteil der positiv gefärbten Strukturen auf $32 \pm 35,6$. Bei weiter zunehmendem Reperfusionsschaden in der Indexgruppe 3 lag der durchschnittliche Wert dann bei $37\% \pm 24,8$. Siehe Abb. 8

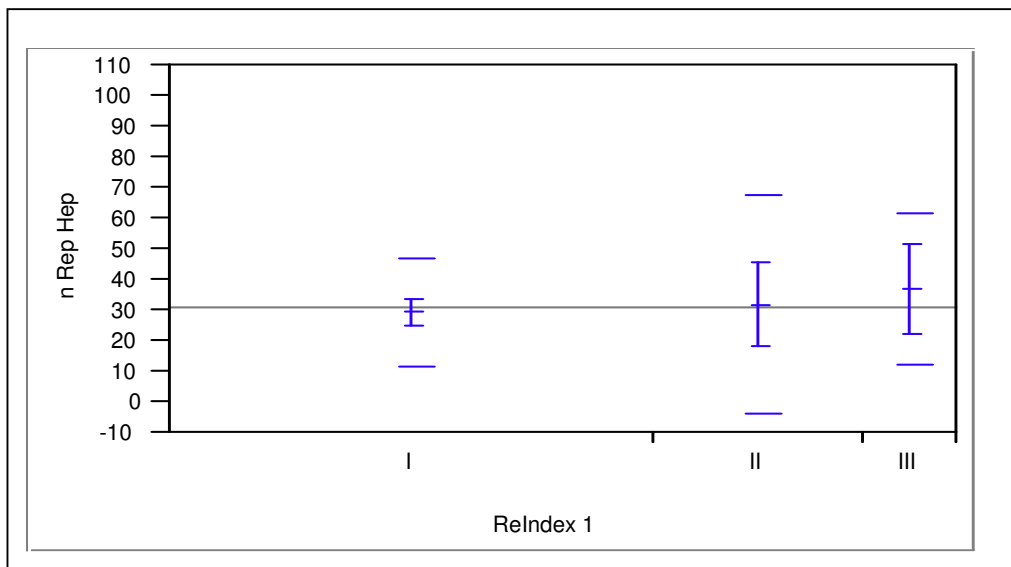


Abb.8:Zusammenhang zwischen einem Reperfusionsschaden und einer ICAM-1-Expression nach Reperfusion

3.2.3 Zusammenhang zwischen ICAM-1 Expression nach Reperfusion und einer histologisch gesicherten Abstoßung

Um den Zusammenhang zwischen der initialen Expression von ICAM-1 auf den Hepatozyten, Arterien, Venen und Gallengängen nach Reperfusion und einer möglichen Abstoßungsreaktion zu untersuchen, wurde die Intensität der ICAM-1 Expression nach Reperfusion mit den Ergebnissen der postoperativ bei Abstoßungsverdacht entnommenen Histologiebefunde verglichen. Hierzu wurde die Intensität der ICAM-1 Expression auf einer Skala bewertet. Lag der Wert der ICAM-1 Expression auf den Hepatozyten über 50 %, wurde ein Punkt vergeben. Bei den Arterien, Venen und Gallengängen wurde eine Bewertungsgrenze von 25% gesetzt. Alle Werte über 25% wurden mit einem Punkt bewertet. Die maximal erreichbare Punktzahl waren vier Punkte.

Die Histologiebefunde wurden danach bewertet, wie viele der postoperativ entnommenen Biopsien eine histologisch gesicherte Abstoßung aufwiesen, unabhängig von der Intensität der Abstoßung.

Die Untersuchung zeigte die größte Anzahl histologisch gesicherter Abstoßungen in der Gruppe, in der keine, oder nur eine sehr geringe Expression von ICAM-1 auf den Hepatozyten, Gefäßen und Gallengängen stattgefunden hatte.(Abb.9)

In der Gruppe 1 lagen zwei Biopsien mit histologisch gesicherter Abstoßung vor.

In der Gruppe 2 lag gar keine Biopsie, die eine Abstoßung aufwies vor, und in die Gruppe 3 mit über 75% ICAM-1 positiver Hepatozyten, Gefäßen und Gallengängen fiel eine Biopsie mit histologisch gesicherter Abstoßung.

Zusammenfassend lässt sich zwischen der ICAM-1 Expression auf den Hepatozyten nach Reperfusion und einer Abstoßung keine Korrelation finden.

Die maximale Punktzahl von vier Punkten wurde nie erreicht, was hauptsächlich darauf zurückzuführen ist, dass die Gallengänge fast keine ICAM-1 Expression aufwiesen.

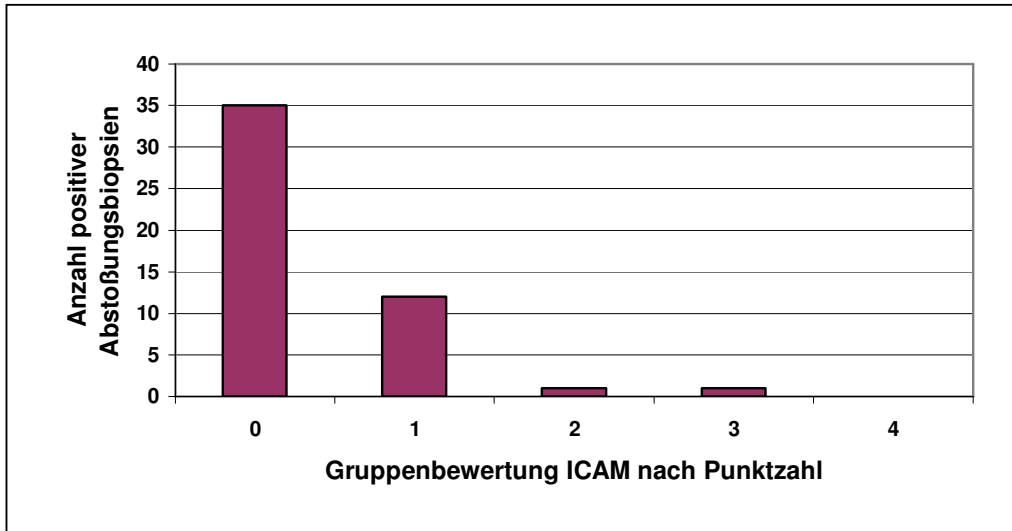


Abb.9: Zusammenhang zwischen einer ICAM-1-Expression nach Reperfusion und einer Abstoßung

3.2.4 Zusammenhang zwischen einer erhöhten ICAM-1 Expression und der Dauer der kalten Ischämiezeit

Um den Zusammenhang zwischen der kalten Ischämiezeit und einer ICAM-1 Expression auf den Hepatozyten nach Reperfusion zu untersuchen, wurden die Organe anhand der Dauer der kalte Ischämiezeit in zwei Gruppen eingeteilt. Die Dauer der kalten Ischämie lag zwischen 4,3 und 16,5 Stunden. Der durchschnittliche Wert betrug 8,8 Stunden.

In der Gruppe I betragen die Werte bis zu 600 Minuten, in der Gruppe II lagen sie über 600 Minuten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Werte der ICAM-1 Expression in der Gruppe I geringfügig über den Werten der Gruppe II lagen. Siehe Abb.11

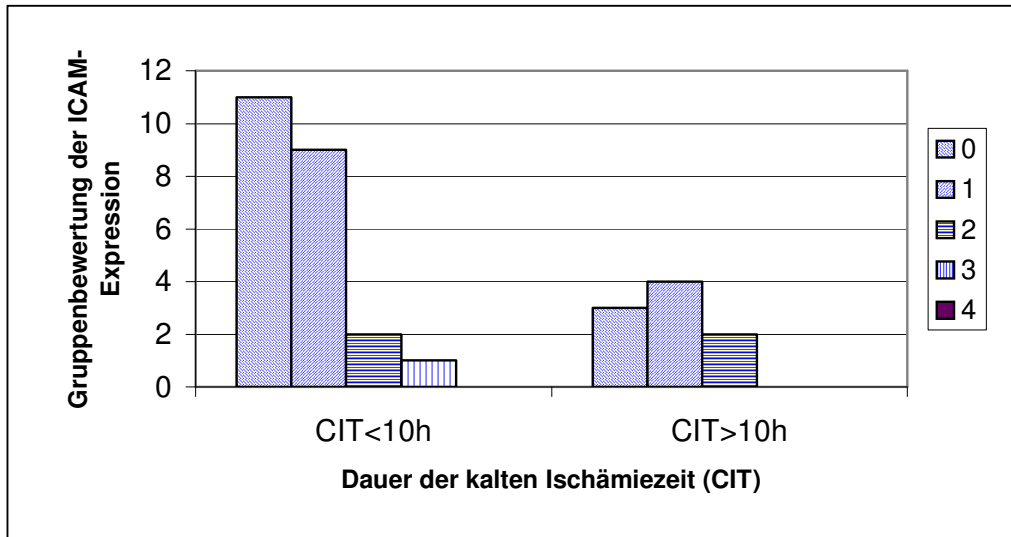


Abb.11: ICAM-1-Expression in Abhängigkeit von der Dauer der kalten Ischämie

4 Diskussion

4.1 Methoden der Probengewinnung, Lagerung und Verarbeitung

Die Auswahl der Entnahmestelle der Biopsien wurde dem jeweils operierenden Chirurgen überlassen. Daraus ergibt sich keine einheitliche Folge von Biopsien pro Patient. Es besteht die Möglichkeit ,dass bei einer Biopsie eher oberflächliche Schichten getroffen wurden, während bei einer folgenden Biopsie tieferliegende Schichten entnommen wurden. Oberflächliche Biopsien aus peripheren Anteilen der Leber sind anfälliger für Ischämieschäden als tiefergelegene Regionen der Leber.(Scoazec et al.1994)

Die Biopsien wurden , wie in anderen Studien auch, direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren.(El-Wahsh et. al.1997, Scazec et.al. 1994)

Das von uns verwendete Färbeverfahren, die indirekte Immunperoxidase Technik, wird auch bei ähnlichen Studien häufig verwendet (El-Wahsh et. Al. 1997, Hoffmann et.al. 1993).

4.2 Verlauf der Expression von ICAM-1 während der Lebertransplantation

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass die Mittelwerte der beobachteten Expression von ICAM-1 auf den Gefäßendothelien von Arterien und Venen im Verlauf der Transplantation zunahm. Zu Beginn der Transplantation wurde auf den Endothelien der Arterien keine und auf den Endothelien der Venen nur eine schwache Expression von ICAM-1 beobachtet. Zum Ende der kalten Ischämiezeit erhöhte sich die Expression auf beiden Gefäßendothelien und stieg nach Reperfusion noch einmal an. Auch bei den Hepatozyten zeigte sich am Anfang der Transplantation nur eine geringe Expression von ICAM-1, die zum Ende der kalten Ischämiezeit anstieg und nach der Reperfusion wieder geringfügig abfiel. (Hoffmann et al. 1993) beschrieben in Ihrer Studie im Verlauf von unkomplizierten Lebertransplantationen eine nur schwache ICAM-1 Expression auf Endothelien von Arterien und Venen. Auf Hepatozyten zeigten sie während der Transplantation einen leichten Anstieg der Expression von ICAM-1. Die unterschiedlichen Ergebnisse in der Expression auf den Gefäßendothelien sind schwer zu vergleichen, da bei der Studie von Hoffmann et al keine Information über die Entnahmezeitpunkte der Biopsien vorlagen.

(El-Wahsh et al 1997) untersuchten in einer Studie Leberbiopsien, welche zum Ende der kalten Ischämiezeit, sowie 90 Minuten nach Reperfusion entnommen wurden. Sie zeigten nach der kalten Ischämie keine Expression auf den Endothelien großer Gefäße, sowie eine geringe Expression auf Hepatozyten. Nach Reperfusion beschrieben sie eine verstärkte ICAM-1 Expression auf den Hepatozyten. Über die Expression auf den Gefäßendothelien wurde keine Aussage gemacht.

Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Expression von ICAM-1 auf den Hepatozyten könnten die verschiedenen Entnahmetechniken der Biopsien sein.

Chirurgisch entnommene Biopsien zeigen eher Läsionen in der Leberperipherie, die gegenüber ischämischen Schäden gefährdeter ist als die tieferen Regionen der Leber, die bei Nadelbiopsien entnommen werden. (Scazecz et al 1994) In der Studie von (Scazecz et al 1994) wurden chirurgische Biopsien nach Reperfusion untersucht. In 22 von 30 Fällen wurde ICAM-1 exprimiert, In 11 Fällen lag eine fokale Expression vor und in 11 Fällen eine diffuse Expression. Hierfür wird auch eine Aktivierung der Kupffer-Zellen während der Transplantation verantwortlich gemacht.

(Steinhoff et al 1996) beschreiben in ihrer Untersuchung ICAM-1 als „spätes“ Adhäsionsmolekül, dessen Expression durch Cytokine induziert wird, welches aber erst

in der intermediären Phase der Adhäsion (bis zu 6 Stunden nach der Aktivierung) eine Rolle spielt.

Maximale Cytokinkonzentrationen werden bei einer Transplantation meist erst 60 – 120 Minuten nach Reperfusion gemessen(Grenz 2000), so dass eine Cytokininduzierte Expression von ICAM-1 erst entsprechend später stattfinden kann .

Die ICAM-1 Expression beginnt einige Stunden nach Reperfusion und erreicht ihr Maximum erst nach 24 Stunden (Kiuchi et al. 1998). Eine ICAM-1- Expression, eine Stunde nach Reperfusion kann also womöglich auch auf Schädigungen zurückzuführen zu sein, die bereits Stunden , oder sogar Tage zurückliegen.

(Kiuchi et al1998) beschrieben in ihrer Untersuchung ebenfalls, dass eine ICAM-1 Expression nach Reperfusion, in diesem Fall 2 Stunden nach Reperfusion , auf länger zurückliegende Schäden zurückzuführen sein könnte.

Auch eine ICAM-1 Expression vor Reperfusion könnte laut (Kiuchi et al.1998) durch eine Schädigung des Spenderorgans bei der Lagerung, oder sogar durch eine präexistierende Schädigung durch Krankheit oder Unfall des Spenders, zu erklären sein.

4.3 Zusammenhang zwischen ICAM-1 Expression nach Reperfusion und dem Reperfusionsschaden

Als Parameter zur Diagnosestellung eines Reperfusionsschadens werden Enzymkonzentrationen gemessen. In der Literatur werden hauptsächlich die Leberenzyme GOT, GPT, LDH und γ GT verwendet, da sie bei einem Leberzellschaden in den Extrazellulärraum abgegeben werden, und somit als Marker einer potentiellen Schädigung gemessen werden können (Ikeda et al 1992).

In dieser Studie wurde für jeden Patienten aus den Enzymkonzentrationen (GOT, GPT, GLDH) ein Reperfuionsindex berechnet. Dieser Index soll die Intensität des Reperfusionsschadens vereinheitlichen. Die zur Berechnung gewählten Parameter haben sich schon in anderen Studien bewährt, da die GPT als zytosolisches, die GOT als zytosolisches und mitochondriales, sowie die GLDH als mitochondrialer Marker einer Leberzellschädigung fungieren, und mit der Schwere des parenchymalen Leberzellschadens korrelieren (Mueller et al 1996), (Reinders et al 1997)

Die Anzahl der ICAM-1 exprimierenden Hepatozyten nach Reperfusion lag in der Gruppe mit dem Reperfuionsindex I (30% \pm 18) deutlich unter dem Wert der Gruppe II (32% \pm 36). In der Indexgruppe III stiegen die Werte sogar auf 37% \pm 25. Es zeigt sich also ein deutlicher Anstieg der Anzahl ICAM-1 exprimierender Hepatozyten von Indexgruppe I zu Indexgruppe III .(Kiuchi et al 1998) machten in Ihrer Studie eine ähnliche Beobachtung, als sie eine starke ICAM-1 Expression bei primärer Nichtfunktion nach Reperfusion beobachteten. Wie schon früher erwähnt, kann diese ICAM-1 Expression aber nicht eindeutig auf einen möglichen Reperfusionsschaden zurückgeführt werden, da die Zeitspanne zwischen auslösendem Geschehen und der Expression von ICAM-1 zu kurz ist, um einen eindeutigen Zusammenhang zuzulassen. Auch (El-Wahsh et al.1997) haben in ihrer Untersuchung eine Korrelation zwischen einem Reperfusionsschaden und der Expression von ICAM-1 festgestellt.

Eine wichtige Rolle bei dem Ischämie- und Reperfusionsschaden von Lebertransplantaten spielen die Kupffer-Zellen der Leber. Diese Zellen stellen eine spezielle in der Leber vorkommende Makrophagenart dar. Es wird angenommen, dass sie während der kalten Ischämiezeit und durch die anschließende Reperfusion aktiviert werden, und dabei Cytokine freisetzen, welche potente Induktoren von Adhäsionsmolekülen sind und nachfolgend zu einer Expression von ICAM-1 führen

(Monden et al 1995), (Scoazec et al. 1994), (el Wahsh et al.1997).

Auch die sinusoidalen Endothelzellen in der Leber scheinen während Ischämie und Reperfusion aktiviert zu werden. Sie beginnen mit der Expression von ICAM-1, was die Adhäsion von Leukozyten am sinusoidalen Endothel vereinfacht. Dies führt zu einer Ansammlung von Leukozyten in den Sinusoiden , was wiederum zu einer Mikrozirkulationsstörung führt (Yoshia et al.1996),(Monden et al.1995). Die an den Gefäßwänden adhären Leukozyten können in aktiviertem Zustand ebenfalls Cytokine freisetzen, was zu einer Pemeabilitätsstörung der Gefäßwände führt, (Bevilaqua 1994) und die Migration von Leukozyten in das umliegende Gewebe begünstigt. Die gewebeschädigende Entzündungsreaktion breitet sich so durch Führung chemotaktischer Mediatoren (Cytokine) im Gewebe aus.

In dieser Studie konnten aufgrund, der nur geringvergrößernden lichtmikroskopischen Auswertung, nur die Gefäße, Gallengänge und Hepatozyten beurteilt werden. Es ist aber denkbar , dass die sinusoidale Expression bei der Auszählung der Hepatozyten mitbewertet wurde.

4.4 Zusammenhang zwischen ICAM-1 Expression nach Reperfusion und einer Abstoßung

Wie im Ergebnisteil dargestellt, gab es keinen Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von ICAM-1 auf Hepatozyten nach Reperfusion und einer histologisch gesicherten Abstoßung.

Die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle bei der Aktivierung und Vermittlung immunologischer Prozesse ist schon länger bekannt. Generell ist es aber schwierig, eine erhöhte ICAM-1 Expression während und nach Lebertransplantationen zu beurteilen. In der Literatur findet man einige Untersuchungen, in denen eine erhöhte ICAM-1 Expression im Verlauf einer Transplantation als zuverlässiges, aber unspezifisches Zeichen einer immunologischen Aktivierung beschrieben wird.

(Lautenschlager et al 1993) beschrieben in ihrer Studie eine erhöhte ICAM-1 Induktion auf den Hepatozyten als einen frühen aber unspezifischen Marker für eine akute Abstoßung, da eine bakterielle Sepsis oder eine CMV Infektion ebenfalls zu einer steigenden ICAM-1 Expression führen.

(Steinhoff et al. 1990) berichten ebenfalls über eine de novo Induktion von ICAM-1 auf Hepatozyten während einer Abstoßung oder Infektion (CMV, Cholangitis, Hepatitis). Sie beschreiben aber auch eine generell erhöhte ICAM-1 Expression nach erfolgter Lebertransplantation. Auch andere Autoren berichten von einer generellen ICAM-1 Expression bei Lebertransplantationen. (Scazecz et al 1994) nennen die Kupffer Zellen der Leber als mögliche Ursache dieser ICAM-1 Expression, da diese speziell in der Leber auftretenden Makrophagen während der Lebertransplantation aktiviert werden. (Kiuchi et al 1998) kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass lediglich eine frühe Abstoßung (bis 10 Tage) mit einer erhöhten ICAM-1 Expression korreliert. Für eine später festgestellte Abstoßungsreaktion fand sich hingegen keine Korrelation.

(Scazecz et al 1994) kamen bei ihrer Untersuchung zu unterschiedlichen Ergebnissen betreffend der Expressionsmuster von ICAM-1. Sie unterschieden zwischen fokaler und diffuser ICAM-1 Expression. 81,8% der Patienten mit diffuser ICAM-1 Expression hatten eine akute Abstoßung, während nur 42,1% der Patienten mit fokaler Expression eine Abstoßung aufwiesen. So scheint ein eindeutiger Zusammenhang nur in der Gruppe der Patienten mit diffuser ICAM-1 Expression gegeben zu sein. Diese Einteilung kann aber nicht auf unsere Ergebnisse übertragen werden.

Allgemein wird in der Literatur hauptsächlich die ICAM-1 Expression auf den Hepatozyten und Sinusoidalzellen bewertet. Die ICAM-1 Expression auf Gefäßen und

Gallengängen findet hingegen kaum Beachtung, wahrscheinlich, da sie auch bei einer Abstoßung auf Gefäßen nur mäßig und auf Gallengängen fast gar nicht erhöht sind. (in unserer Untersuchung in 2 Fällen auf Gallengängen.)

Generell sind viele Autoren der Ansicht, dass es schwierig ist eine vorhandene ICAM-1 Expression einem auslösenden Ereignis zuzuordnen. Einerseits kommt es im Verlauf einer Lebertransplantation allgemein zu einer immunologischen Aktivierung welche zu einer Expression von ICAM-1 führen kann (Steinhoff et al 1990), andererseits ist auch der Zeitpunkt des Eintritts der Schädigung schwer zu bestimmen, da bis zur maximalen Expression von ICAM-1 ein langer Zeitraum vergehen kann (bis zu 24 Stunden). Wie sich eine einmal stattgefundene ICAM-1 Expression in Bezug auf eine Wiederauflösung verhält, ist leider nicht bekannt, man geht eventuell sogar von einer kaskadenförmigen Steigerung durch mehrere auslösende Ereignisse aus.

4.5 Zusammenhang zwischen ICAM-1 Expression nach Reperfusion und Dauer der kalten Ischämiezeit

Im Ergebnisteil ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer ICAM-1 Expression auf Hepatozyten nach Reperfusion und der Dauer der kalten Ischämiezeit darstellen. Einige Untersuchungen haben sich schon mit diesem Zusammenhang beschäftigt. Es zeigten sich jedoch unterschiedliche Ergebnisse. (Kiuchi et al 1998) und (Scoazec et al 1994) zeigten in ihren Studien ebenfalls keine Korrelation zwischen einer erhöhten ICAM-1 Expression und der Dauer der kalten Ischämie. Hingegen fand sich in mehreren tierexperimentellen Untersuchungen eine zum Teil deutliche ICAM-1 Expression nach längerer kalter Ischämie. (Mc Keown et al 1988) , (Yoshia et al 1996)

In vielen Studien zeigte sich aber eine erhöhte Rate von primärer Dysfunktion und Nichtfunktion nach längerer kalter Ischämiezeit. Dies konnte bis zur Replantation führen. (Hiroyuki et al 1991)

Auch (Deschenes et al 1998) beschreiben in ihrer Untersuchung eine erhöhte Anzahl von Organen mit primärer Nichtfunktion bei kalten Ischämiezeiten über 15 Stunden. Die Frage nach der maximalen, sicheren kalten Ischämiezeit, die zur Lagerung und Vorbereitung des Organs zur Verfügung steht, ist noch nicht geklärt. Die in der Literatur angegebenen Zeiten reichen von 10 Stunden bis zu einer Zeitspanne von bis zu 24 Stunden, ohne dass es zu größeren Enzymveränderungen im Lebergewebe kommen soll. (Klar et al 1998)

5 Ausblick

Die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle in der Transplantationsimmunologie wurde erst in den letzten Jahren erkannt und untersucht. Das interzelluläre Adhäsionsmolekül (ICAM-1) scheint ein sehr sensitiver, wenn aber auch unspezifischer Marker für immunologische Reaktionen zu sein.

Bisher gab es nur die Möglichkeit nach der Transplantation medikamentös das ganze Immunsystem des Patienten zu supprimieren, um ihn vor unerwünschten immunologischen Komplikationen zu schützen. Neuere Untersuchungen zeigen jetzt die Möglichkeit direkt in die Entzündungskaskade einzugreifen. Eine Möglichkeit der Unterbrechung der Rekrutierung von Entzündungszellen ist die Gabe von Antikörpern gegen ICAM-1 und LFA 1. Hierbei konnte im tierexperimentellen Modell die Adhäsion zirkulierender Zellen an das Gefäßendothel signifikant vermindert werden. Sie verlängern auch das Überleben transplantierte Rattenlebern. (Degawa 1995), (Harihara et al 1994)

Bei Patienten liegen erste Erfahrungen mit dem Einsatz von Antikörpern gegen ICAM-1 in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis und bei der Immunsuppression nach Nierentransplantation vor (Haug et al. 1993). Eine ähnliche Immunsuppression mit Anti-ICAM-1 wird auch bei Leber und Herztransplantationen geprüft. (Rothlein 1994). Eine weitere therapeutische Möglichkeit ist die Blockade der Zelladhäsionsmolekül-mRNA. Dies führt zu einer Herabsetzung der ICAM-1 Biosynthese auf Translokationsebene (Jurgensen 1990). Es besteht außerdem die Möglichkeit der exogenen Verstärkung endogener, antihäsiver Moleküle. Hierzu gehört zum Beispiel Stickstoffmonoxid, das, bei Ratten und Katzen unter bestimmten Bedingungen die Adhäsion und Migration von Entzündungszellen hemmt.

Es sollte auch bedacht werden, dass bereits präexistierende Schäden an dem Spenderorgan vorhanden sein können, welche bereits vor der Transplantation zu einer immunologischen Aktivierung geführt haben können. Diese Schäden können durch eine vorbestehende Krankheit oder einen Unfall des Spenders entstanden sein und sich durch den Operationsstress noch verschlimmern. Diese vorzeitige Aktivierung des Gewebes kann möglicherweise eine spätere Schädigung oder Funktionsstörung des Organs begünstigen (Kiuchi et al 1998).

6 Zusammenfassung

Obwohl auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin ständig Verbesserungen erarbeitet wurden, stellen Komplikationen bedingt durch eine Aktivierung des Immunsystems, noch immer ein großes Problem dar. Nicht selten führen diese Komplikationen zu einer Einschränkung oder zum Verlust der Organfunktion, im schlimmsten Fall erfordern sie sogar eine Retransplantation.

Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Vermittlung dieser Immunreaktionen. In dieser Studie wurde der Verlauf der Expression des Interzellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM-1) während der Lebertransplantation, sowie dessen Verhalten während eines Reperfusionsschadens oder einer Abstoßung untersucht.

Es erfolgten Biopsieentnahmen zu festgelegten Zeitpunkten während der Organentnahme, sowie während der Transplantation. Diese Biopsien wurden geschnitten, immunhistochemisch gefärbt und lichtmikroskopisch beurteilt. Es wurde die ICAM-1 Expression auf den Gefäßen, den Gallengängen und den Hepatozyten bewertet.

Der Verlauf von ICAM-1 während der Transplantation zeigte bei den Gefäßen einen Anstieg während der Transplantation, bei den Gallengängen zeigte sich allgemein nur eine äußerst geringe Anfärbung und bei den Hepatozyten zeigte sich erst ein Anstieg, aber nach Reperfusion dann ein geringfügiger Rückgang der Expression. Da ICAM-1 bis zu 24 Stunden nach Stimulation durch Zytokine exprimiert wird, ist es schwierig dem Expressionsmuster einzelne Ursachen zuzuordnen.

Als Maßstab für die Quantifizierung eines eventuell aufgetretenen Reperfusionsschadens wurde ein Reperfuptionsindex definiert. Die Transplantate der Patienten der Indexgruppe III mit dem größten Reperfusionsschaden wiesen eine wesentlich verkürzte Funktionswahrscheinlichkeit auf. Die Patienten zeigten auch eine erhöhte ICAM-1 Expression auf den Hepatozyten nach Reperfusion.

Es ließ sich keine Korrelation zwischen einer erhöhten ICAM-1 Expression und einer postoperativen histologisch gesicherten Abstoßung nachweisen.

Die Dauer der kalten Ischämiezeit betrug durchschnittlich 531 Minuten. Es bestand kein Zusammenhang zwischen der Länge der kalten Ischämie und einer vermehrten ICAM-1 Expression.

Eine erhöhte ICAM-1 Expression, während und nach einer Lebertransplantation, kann sicherlich als ein Zeichen einer immunologischen Aktivierung gewertet werden. Es

scheint aber nur ein sehr unspezifischer Marker zu sein, da die ICAM-1 Expression sowohl im Rahmen einer Abstoßung , eines Reperfusionsschadens als auch bei verschiedenen Infektionen erhöht sein kann. (CMV Sepsis, Hepatitis)

Ein weiteres Problem bei der Bewertung einer ICAM-1 Expression ist die zeitliche Einordnung der Ursache der immunologischen Aktivierung. Die Expression kann bis zu 24 Stunden nach Stimulation auftreten. Wie lange eine ICAM-1 Expression bestehen bleibt ist nicht bekannt.

7 Literaturverzeichnis

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS

Effector mechanisms in allograft rejection

In. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS

Cellular and molecular Immunology

3. Auflage WB Sanders Company Philadelphia, London Toronto, Montreal, Sidney
Tokio

Benacerraf R (1981)

Role of MHC gene products in immune regulation

Science 212; 1229-1238

Berendt AR, Mc Dowell A, Craig AG Bates PA Sternberg MJE, Marsh K, Newbold C,
Hogg N (1992)

The binding site on ICAM-1-1 for plasmodium falciparum infected erythrocytes
overlaps, but is distinct from the LFA-1 binding site.

Cell 68; 71-81

Bodmer WF(1981)

HLA structure and function: a contemporary view.

Tissue Antigens 17; 9-20

Calne RY, Rolles K, Thirm (1979)

Lancet 2 ; 1033

Carlos TM, Harlan JM (1994)

Leukocyte-endothelial adhesion molecules

Blood 84(7) 2068-2101

Degawa H, Watanabe K, Uchida H, Nagao T, Tomikawa S, Beck Y, Nomura Y
Ichikawa N, Ando J, Kikuchi K, Ito S (1996)
Blocking of ICAM-1 –1 and LFA-1 in rat liver transplantations
Transplantation Proceedings Jun; 28(3), 1362-1363

Deschenes M, Belle S-H, Kirom RA, Zetterma RK, Lake J-R (1998)
Early allograft dysfunction after liver transplantation. A definition and predictory of
outcome
Transplantation 66(3); 302-310

Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CK, Springer TA (1986)
Induction by IL-1 and interferon gamma. Tissue distribution, biochemistry and function
of a natural adherence molecule (ICAM-1-1)
J. Immunol. 137; 245-254

Dustin ML, Springer TA, (1989)
T-cell receptor crosslinking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1
Nature 341; 619-624

El-Wahsh M, Fuller F, Sreehumar NS, Burroughs A, Dhillon P, Rolles K, Davidson BR
(1997)
Effect of reperfusion on human allograft ICAM-1-1 expression and its correlation with
histological evidence of reperfusion changes.
Transplantation Proceedings 29; 3000-3001

Engler RL, Schmid-Schönbein G, (1995)
Leukocytes in capillary networks.

In: Granger DN . Schmid-Schönbein G (eds) Physiology and pathophysiology of leukocyte adhesion.
Oxford University Press, Oxford

Francke U, Pellegrino MA (1977)
Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74; 1147-1151

Grenz A (2000)
Konzentrationen von TNF α , sTNF-RI und sTNF-RII im Serum während und nach einer Lebertransplantation

Gute D, Korthuis RJ, (1995)
Role of leukocyte adherence in reperfusion-induced microvascular dysfunction and tissue injury.
In: Granger DN, Schmid-Schönbein G (eds) Physiology and pathophysiology of leukocyte adhesion.
Oxford University Press. Oxford

Hahn WC, Rosenstein Y, Clewo W, Burakoff SJ, Biener B (1992)
A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T-cell responseiveness to antigen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 7179-7183

Hammer C (1993)
Transplantationsimmunologie und Organtransplantation
In: Heberer, Köle und Tscherne: Chirurgie und angrenzende Gebiete
6. Auflage, Springer Berlin

Haug CE, Colvin RB, Belmonico FL, (1993)

A phase I trial of immunosuppression with anti-ICAM-1-1 (CD 54)mab in renal allograft recipients.

Transplantation 54; 766

Harihara Y, Sakamoto H, Sanjo K, Otsubo O, Watanabe G, Idezuki Y (1994)

Prolongation of hepatic allograft survival with antibodies to ICAM-1-1 and LFA-1

Transplantation Proceedings 26; 2258

Hiroiyuki F, Satoruto T, Oscar I, Casvilla A, MinwuY, Scotti-Foglierni C, Broznick B, BryantJ, Daytz , Starzl TE (1991)

Effect of cold ischemia time on the early outcoma of human hepatic allografts preserved with UW-Solution

Transplantation 51; 1000-1004

Hoffmann MW, Wonigwit K, Steinhoff G, Herzbeck H, Flad H_D, Pichlmayr R (1993)

Production of cytokines (TNF α , IL β) and endothelial cell activation in human liver allograft rejection.

Transplantation 55; 329-335

Ikeda T, Yanega K, Kishihawa K, Kakizoe S, Shimada M Suginachi K (1992)

Ischemic injury in liver transplantation: Difference injury sites between warm and cold ischemia in rats

Hepatology 16 (2); 454-461

Irmeli T, Lautenschlager, Krister A, Höckerstedt (1993)

ICAM-1-1 Induction on Hepatocytes as amarker for immune activation of acute liver allograft rejection.

Transplantation 56; 1495-1499

Kiuchi T, Oldhafer KJ, Schlitt HJ, Nashan B, Deiliwich A, Wonigeit K, Ringe B, Tanaka K, Yamaoha Y, Pichlmayr R (1998)

Background and prognostic implications of perireperfusion Tissue injuries in human liver transplants.

Transplantation 66; 737-747

Klar E, Angelescu M, Zapletal C, Kraus T, Brecht M, Herfarth C (1998)

Definition of maximum cold ischemia time without reduction of graft quality in clinical liver transplantation

Transplantation Proceedings Nov. 30(7) 3683-3685

Knauer S (1919)

Organtransplantation

In: Lexer Teil 1; 17-186

Ley K (1993)

Molecular mechanisms of leukocyte rolling and adhesion to microvascular endothelium.

Europ. Heart Journal 14/I 68-73

Mc Kevon CMB, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PRC, Petrunka CN, Strasberg SM (1988)

Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allograft in the rat.

Transplantation 46; 178

Monden K, Arii S, Ishiguro T, Nakamura T, Fujita S, Mise M, Niwano M, Sasaoki T, Imamura M (1995)

Involvement of ICAM-1 –1 Expression on sinusoidal endothelial cell and neutrophil adherence in the reperfusion injury of cold preserved livers

Transplantation Proceedings 27; 759-761

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH (1955)

Renal homotransplantation in identical twins

Journal of the American society of nephrology 2001 12(1) 201-204

Müller AR, Platz KP, Haak M, Undi H, Müller C, Köttgen E, Weidemann H, Neuhaus P (1996)

The release of cytokines, adhesion molecules and extracellular matrix parameters during and after reperfusion in human liver transplantation.

Transplantation 62; 1118-1126

Owen M (1991)

Haupthistokompatibilitätskomplex 42-53

In: Roitt IM, Brostoff J, Male DK

Kurzes Lehrbuch der Immunologie, 2. Auflage

Thieme Stuttgart, New York

Pretto EA Jr (1991)
Reperfusion injury in the liver
Transplantation Proceedings 23; 1912-1914

Reinders ME, Bart A, van Wagensveld, van Gulik MT, Noortje PM, Coorsmit WM,
Frederiks WM, Chamuleau RAFM; Roojen N, Obertrop H (1997)
No attenuation of ischemic and reperfusion injury in Kupffer-cell depleted cold
preserved rat livers.
Transplantation 63; 449-454

Rothlein R, Czajkowski M, Kishimoto TK (1991)
A intercellular adhesion molecule in the inflammatory response
Hogg N (ed): Integrins and ICAM-1-1 in immune responses
Chem. Immunol. 50; 135-142

Rothlein R, Scharschmidt LA (1994)
Leukocyte adhesion in inflammation: from discovery to the clinic.
In: Wegner CD (ed)
The landsohof immunopharmacology adhesion molecules
Academic Press London

Scazec JY, Durand F, Benhamon JP, Feldmann G (1994)
Expression of cytokine dependent adhesion molecules in postperfusion Biopsy
specimens of liver allografts.
Gastroenterology 107; 1094-1102

Scoazec SY, Durand F, Degott C, Delantier D, Bernhau B, Belghiti J, Bentamoon JP, Feldmann G (1994)
Expression of cytokine dependent adhesion molecules in postperfusion biopsy specimens of liver allografts.
Gastroenterology 107, 1094-1162

Schürmann G (1997)
Zelladhäsion: Molekulare Grundlagen und erste Aspekte für die Chirurgie
Der Chirurg 68; 477-487

Starzl TE, Marchiaro TL, von Kaulla KN, Herrmann G, Brittain RS, Wadell WR (1963)
Homotransplantation of the liver in humans
Surg. Gynecol. Obstet. 117; 659-676

Staunton DE, Meluzzi VJ, Rothlein R, Bartron R, Marlin SD, Springer TA (1989)
A cell adhesion molecule ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses.
Cell 56; 849-853

Steinhoff G, Behrend M, Wonigeit K (1990)
Expression of adhesion molecules on lymphocytes, monocytes and hepatocytes in human liver grafts

Steinhoff G, Behrend M, Pichlmayr R (1990)
Induction of ICAM-1 on hepatocyte membranes during liver allograft rejection and infection
Transplantation Proceedings 22; 5; 2308-2309

Steinhoff G, Brandt M (1996)

Adhesion molecules in liver Transplantation

Hepato-Gastroenterology 43; 1117-1123

Thiagarajan, R-R, Winn RK, Harlan JM (1997)

The role of leukocyte and endothelial adhesion molecules in ischemia-reperfusion injury

Thrombosis and haemostasis 78(1) 310-314

Yoskiya N, Yoskiyuki T, Sunao K, Moritaka C, Konichi N, Skingotsuyi, Hiroataka N,

Atsmushi O, Hideyuki F, Takenobu K (1996)

The F(ab^γ) Fragment of an anti-ICAM-1-1 monoclonal antibody attenuates liver injury after orthotopic liver transplantation

Transplantation 61; 99-104

Zinkernagel RM, Doherty PC, (1979)

MHC-restricted cytotoxic T-cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction, specificity, function and responsiveness

Adv. Immunol. 27, 51-177

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst meinem Ehemann Torsten und meinen Eltern Inge und Bert Polap, sowie meinem Bruder Lars, die mir immer zur Seite standen.

Ich möchte mich auch bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Viebahn für die Betreuung während der Doktorarbeit bedanken.

Ich danke auch meinen „Mitdoktoranden“ Michaela und Matthias sowie dem Leiter des Labors Martin für die sehr gute Zusammenarbeit und Hilfe.

Außerdem danke ich allen Ärzten, Schwestern und Pflegern im OP und auf den Stationen der Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie Tübingen für die mir stets entgegen gebrachte Hilfe.

Lebenslauf

Name: Ruth Christiane Strecker geb. Polap

Geboren: 08.05.1972 in Meersburg

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder

Eltern: Bert Polap, techn. Angestellter, Inge Polap, kaufm. Angestellte

Schulbildung

1982 - 1991 Karl-Maybach Gymnasium in Friedrichshafen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

04.1992- 09.1997 Studium der Humanmedizin an der
Eberhard-Karl-Universität in Tübingen

03.1994 Ärztliche Vorprüfung

08.1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

09.1997 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11.1998 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

10.1997- 01.1998	Prof. Dr. med. H-D. Becker, Chirurgische Abteilung Universitätsklinik Tübingen
02.1998- 05.1998	Prof. Dr. med. K. Unertel, Abteilung für Anästhesiologie Universitätsklinik Tübingen
06.1998- 10.1998	Prof. Dr. med. L. Kanz, Abteilung für Innere Medizin Universitätsklinik Tübingen
07.2000- 03.2003	AIP-Tätigkeit in der anästhesiologischen Gemeinschafts- praxis Dr. Ebert und Dr. Rall in Bernhausen.