

Aus den Tierexperimentellen Einrichtungen der Charité
Campus Virchow Klinikum
und dem Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Vergleichende Untersuchung der Leberkonservierung mit Biseko-
und mit UW-Lösung im Modell der normotherm hämoperfundenen
Schweineleber**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hannah Freund
geborene Trowbridge
Tierärztin
aus London, Großbritannien

Berlin 2010
Journal-Nr.:3422

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. Christian Große-Siestrup
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kroker
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pig, liver, liver transplant, organs, conservation, solutions, ischaemia,
perfusion

Tag der Promotion: 5. März 2012

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-121-5

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2012

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis..... 6

1 Einleitung 8

2 Aufgabenstellung.....11

3 Literaturübersicht.....13

 3.1 Anatomie der Leber.....13

 3.1.1 Makroskopische Anatomie der Leber13

 3.1.2 Mikroskopische Anatomie der Leber15

 3.2 Funktionen der Leber17

 3.2.1 Kohlenhydratstoffwechsel.....18

 3.2.2 Proteinstoffwechsel18

 3.2.3 Lipidstoffwechsel.....18

 3.3 Messkriterien für die Funktionstüchtigkeit der Leber.....19

 3.3.1 Metabolite des Stoffwechsels19

 3.3.2 Die Enzyme der Leber.....20

 3.3.3 Gallenproduktion22

 3.4 Geschichte der Lebertransplantation.....22

 3.5 Entwicklung der maschinellen Organperfusion25

 3.6 Vor- und Nachteile der Organkonservierung.....26

 3.6.1 Konservierungslösungen.....27

 3.6.1.1 Biseko-Lösung28

 3.6.1.2 University-of-Wisconsin-(UW-) Konservierungslösung28

 3.7 Kaltperfusion versus warme Perfusion29

 3.8 Kaltischämie versus Warmischämie29

 3.9 Ischämie und Reperfusionsschäden.....29

 3.10 Ersatzmethoden zum Tierversuch31

4 Material und Methoden.....33

 4.1 Material33

 4.1.1 Versuchstiere33

 4.1.1.1 Herkunft der Tiere33

 4.1.1.2 Haltung und Fütterung der Tiere33

 4.1.1.3 Gruppeneinteilung.....33

4.1.2	Material für Narkose/Operation	34
4.1.3	Material für die Organkonservierung	34
4.1.4	Material für die Organperfusion	34
4.1.5	Material für die Messung der Leberfunktionsparameter	35
4.1.6	Material für die histologischen Präparate.....	35
4.1.6.1	Lichtmikroskopie	35
4.1.6.2	Elektronenmikroskopie	35
4.2	Methoden	36
4.2.1	Gruppenbildung und Versuchsablauf	36
4.2.2	Operationsvorbereitung.....	37
4.2.3	Organentnahme	37
4.2.4	Organkonservierung.....	38
4.2.5	Organperfusion	39
4.2.6	Biopsieentnahme	42
4.2.7	Leberfunktionsparameter	42
4.2.7.1	Perfusatuntersuchungen	42
4.2.8	Anfertigen von lichtmikroskopischen Bildern	42
4.2.8.1	Entwässern und Einbetten	42
4.2.8.2	Schneiden am Rotationsmikrotom.....	43
4.2.8.3	Histologische Färbung.....	43
4.2.9	Anfertigen von elektronenmikroskopischen Bildern	43
4.2.9.1	Entwässern und Einbetten	43
4.2.9.2	Schneiden am Rotationsmikrotom.....	44
4.2.9.3	Histologische Färbung.....	44
4.2.10	Auswertung der histologischen Schnitte	44
4.2.11	Statistische Methode.....	45
5	Ergebnisse	46
5.1	Perfusatuntersuchung	46
5.1.1	AST.....	46
5.1.2	GLDH.....	47
5.1.3	LDH.....	49
5.1.4	Laktat.....	50
5.1.5	AP.....	52
5.1.6	GGT.....	53

5.1.7	Gallenproduktion	54
5.2	Lichtmikroskopie	56
5.3	Elektronenmikroskopie	63
6	Diskussion.....	72
6.1	Perfusat Untersuchungsergebnisse.....	72
6.1.1	AST.....	73
6.1.2	GLDH.....	73
6.1.3	LDH und Laktat	74
6.1.4	AP, GGT und Gallenproduktion.....	75
6.2	Histologische Untersuchungsergebnisse.....	79
7	Zusammenfassung.....	82
8	Summary.....	84
9	Literaturverzeichnis	86
10	Anhang.....	95
10.1	Tabellen mit gemessenen Enzymaktivität.....	95
10.2	Abbildungsverzeichnis.....	99
10.3	Tabellenverzeichnis.....	101
11	Danksagung	103
12	Selbstständigkeitserklärung	104

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen

A.	Arterie
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
ALT	Alaninaminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung u. Forschung
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlendioxid
D	Deutschland
DK	Dänemark
EA	Endothelablösung
EC	Euro-Collins
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Endothelschwellung
g	Gramm
GA	Glutaraldehyd
GGT	Glutamylgammatastransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat
IPC	Ischemic preconditioning
I/R	Ichämie/Reperfusion
K	Kalium
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LDLT	Living Donor Liver Transplantation
Lig.	Ligamentum
LT	Lebertransplantation
µg	Microgramm
mg	Milligramm

min	Minuten
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mmol	Millimol
mmol/l	Millimol / Liter
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule (=Druckeinheit)
N.	Nervus
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalzlösung)
nm	Nanometer
OP	Operation
OV	Originalvergrößerung
pH	potentia Hydrogenii
PNF	Initiale Nichtfunktion (Primary nonfunction)
Proc.	Processus
PS	Perfusion storage
RSLT	Reduced-Size Liver Transplantation
S.	Seite
sec	Sekunden
SCS	Simple cold storage
SLT	Split Liver Transplantation
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
t	Time (Zeit)
U	Units
u.a.	Unter anderem
UW	University of Wisconsin
V.	Vene
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

Die Lebertransplantationschirurgie nimmt an Bedeutung zu. Dies ist u.a. daran ersichtlich, dass die Zahl der Organempfänger stetig wächst, was wiederum zur Folge hat, dass an die 14% der auf eine Lebertransplantation Wartenden an Leberversagen sterben, bevor sie ein Spenderorgan erhalten (Bessems et al. 2005). Daher steht dieses Organ im Zentrum des Interesses klinischer Forschungen im Bereich der Transplantationschirurgie mit dem Ziel, Menschen mit Leberversagen zu helfen.

Es gibt zwei Aspekte, die bei einer Transplantation zu Komplikationen führen können: Auf der einen Seite spielt der Gesundheitszustand von Spender und Empfänger eine Rolle, auf der anderen Seite der Zustand des Organs selber, welches durch die Wahl der Konservierungslösung und die Dauer der kalten und warmen Ischämiezeit beeinflusst wird (Mimeault et al. 1989). Die Organschäden, die wegen der Konservierung, Lagerung und erneuten Durchblutung (Reperfusion) des Organs auftreten, werden als Ischämie- und Reperfusionsschäden bezeichnet. Die Ischämie bezeichnet die Unterbrechung der Durchblutung. Allerdings ist es schwierig, an dem Organ genau festzustellen, welche Schäden durch die Ischämie entstanden sind und welche durch die Reperfusion (Toledo-Pereyra 1987). Aufgrund der Ischämie, die bei einer Transplantation unvermeidlich ist, wird zwangsläufig die Leber nicht mehr mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Dies hat zur Folge, dass von Sauerstoffzufuhr abhängige Stoffwechselfvorgänge zum Erliegen kommen. Weiterhin akkumulieren die Stoffwechselprodukte. Aus Mangel an Nährstoffen werden die Energiereserven aufgebraucht. Bei der anschließenden Reperfusion kommt es hauptsächlich zu Schädigungen des Organs durch Störungen in der Mikrozirkulation und durch Reperfusion bedingte Entzündungsreaktionen (Jaeschke 1998). Die Funktionsstörungen in der Mikrozirkulation sind auf ein Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktiven (gefäßverengenden) und vasodilatativen (gefäßweiternden) Substanzen zurückzuführen. Dieses Ungleichgewicht hat zur Folge, dass die lebenswichtigen Stoffwechselfunktionen gestört werden (Uhlmann et al. 2005). Weitere Gewebeschädigungen, welche durch Konservierung auftreten können, sind Zellschwellungen (Kvitsinskaia et al. 1978) und Störungen beim Gallenabfluss (Feng et al. 2007).

Tierexperimentell wurden schon 1960 Versuche unternommen, Alternativen zur reinen Kaltlagerung als Konservierungsmethode zu entwickeln. Die maschinelle Perfusion zur Aufrechterhaltung der Durchblutung diente der Überbrückung zwischen dem Zeitpunkt der Entnahme und dem Zeitpunkt des Einsetzens des Organs. Diese Methode sollte die Schäden der Kaltlagerung minimieren. Im Jahr 1990 wurden erste Erfolge mit

kontinuierlicher maschineller Perfusion der Leber beschrieben (Pienaar et al. 1990). Obwohl die maschinelle Perfusion seitdem weiterentwickelt wurde, hat sie noch nicht die klinische Relevanz erhalten, die man sich erhofft hat (Dutkowski et al. 2008). Diese Methode dient weiterhin hauptsächlich Versuchszwecken. Vor allem führen die Konservierungs- und Perfusionsversuche am isolierten Organ zu einer Minimierung der Anzahl von Tierversuchen. Die Organstruktur bleibt hierbei weitestgehend unverändert (Groneberg et al. 2002).

Studien im Bereich der Transplantationschirurgie widmen sich der gewebetechischen und zeitlichen Optimierung durch eine Verbesserung der Konservierungslösungen. Die ersten tierexperimentellen Studien in Bereich der Lebertransplantation wurden durch Welch und Cannon durchgeführt (Welch 1955; Cannon 1956).

Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Tierversuche durchgeführt, um die Lebertransplantationschirurgie zu verbessern. Um die Versuchstierzahlen zu minimieren, wurde jedoch nach Ersatzmethoden gesucht. Die isolierte Organperfusion erwies sich dabei als geeignete Alternative (Grosse-Siestrup et al. 2002; Thewes et al. 2007). Als Ersatz für Tierversuche hat sich vor allem die Verwendung von Schweinelebern von Schlachttieren bewährt (Grosse-Siestrup et al. 2002). Hierdurch wird dem Tierschutz mehr Rechnung getragen. Hinzu kommt bei der Verwendung der gesamten Leber im Vergleich zu Leberteilen der Vorteil, dass die Funktionstüchtigkeit der Leber im Ganzen beurteilt wird – so z.B. die Gallenproduktion, die Enzymherstellung und Zellinteraktionen (Grosse-Siestrup et al. 2002). Der Nutzen dieser Vorgehensweise wurde bereits nachgewiesen (Groneberg et al. 2002; Thewes et al. 2007). Bei der Verwendung von isolierten Organen aus Schlachttieren muss allerdings berücksichtigt werden, dass Ergebnisse durch lokale oder systemische Erkrankungen des Tieres negativ beeinflusst werden können. Interessanterweise wurden die Leberperfuisionsmodelle an Schweinelebern etabliert. Die Nierenperfuisionsmodelle wurden zuerst mit Ratten- bzw. Kaninchennieren durchgeführt (Frodin 1975; Raymond et al. 1975).

Die Perfusionsversuche ermöglichen die genauere Untersuchung der Probleme, welche mit einer Lebertransplantation verbunden sind, vor allem die der Reperfusionsschäden. Reperfusionsschäden wirken sich auf die Funktionstüchtigkeit des Transplantats aus und spielen somit eine wesentliche Rolle bei der Überlebenschance des Empfängers. Die Zusammensetzung der Konservierungslösung beeinflusst die entstehenden Gewebeschädigungen durch Ischämie und Reperfusion. Aus diesem Grund stellt sie einen zentralen Erfolgsfaktor bei dem Gelingen einer Lebertransplantation und somit im Bemühen um eine Erhöhung der Überlebenschancen von Transplantatempfängern dar. Die Einführung der „University-of-Wisconsin-Konservierungslösung“ (UW-Lösung) in der Leber-

transplantationsmedizin stellt bereits eine große Verbesserung der Organkonservierung dar (Janssen et al. 2004) und hat sich als „Goldstandard“ für die Leberkonservierung etabliert (Steininger et al. 1992). Schäden, die aus Ischämie und Reperfusion entstehen, sind jedoch trotz des medizinischen Fortschritts immer noch Hauptgrund für postoperatives Leberversagen nach erfolgreicher Transplantation (Nowak et al. 2002).

Ziel vorliegender Studie ist es, zur Optimierung der Konservierung von Spenderlebern beizutragen. Es gilt, eine möglichst lange und gewebeschonende Lagerung dieser Spenderlebern zu gewährleisten ohne die Funktion der Leber einzuschränken. Die Art der Konservierung ist maßgeblich für den Erfolg einer Lebertransplantation.

2 Aufgabenstellung

Die neue Konservierungslösung Biseko soll mit der UW-Lösung als Standard im Modell der isolierten hämoperfundierten Schweineleber hinsichtlich Leberfunktion und -morphologie untersucht werden.

Die Biseko-Lösung ist eine proteinhaltige Lösung, welche unter Verwendung von humanem Blutplasma hergestellt wird. Sie wurde als eine vergleichsweise neue Lösung ausgewählt, da Studien belegen, dass die Gefäße nach Konservierung mit Biseko-Lösung weniger Neigung zur Vasokonstriktion zeigen. Die Wirkung von Serotonin, welches maßgeblich an der Vasokonstriktion beteiligt ist, wurde hierbei herabgesetzt (Szolnoky et al. 2009). Da eines der häufigsten postoperativen Probleme bei Transplantationen mit Vasospasmus zusammenhängt, gilt zu testen, ob dieser positive Effekt (Herabsetzung der Serotoninwirkung), der bei der Konservierung von Gefäßen, z.B. bei Bypass-Operationen, beobachtet wird, auch bei der Leber erzielt werden kann und somit die Funktionsfähigkeit des Organs erhöht wird (Szolnoky et al. 2009).

Die UW-Lösung soll als Vergleichslösung verwendet werden, da sie heute überwiegend in der Klinik verwendet wird. Bei ihrem Einsatz kommt es zu geringeren Zellschwellungen, was einen positiven Effekt auf die Mikrozirkulation hat (Marzi et al. 1991).

Als Modell soll die isolierte Hämoperfusion der Schweineleber verwendet werden. Die Funktionstüchtigkeit der Lebern wird hierbei mittels histologischen Untersuchungen von gewonnenem Gewebe untersucht. Zusätzlich sollen mehrere zeitlich versetzte Blutuntersuchungen hinsichtlich Leberenzym- und Galleproduktion vorgenommen werden.

Es sollen mindestens zwölf Schweinelebern untersucht werden. Hierbei werden sechs zufällig ausgewählte Schweinelebern mit der zu testenden Biseko-Lösung und sechs Weitere mit der schon etablierten UW-Lösung 14 Std. konserviert. Anschließend sollen sie mit der Leberperforationsapparatur, die im Rahmen des BMBF-Projektes „Physiologische Hämoperfusion von isolierten Organen und ihr Einsatz zum Ersatz von Tierversuchen“ entwickelt wurde, 3 Std. durch körperwarme Hämoperfusion vital erhalten werden.

Das Perfusat, Blut von Spenderschweinen, welches für die Perfusion verwendet wird, wird auf eventuelle Leberfunktionsstörungen hin analysiert. Während der Organreperfusion werden als Funktionsparameter AST, GLDH, LDH, Laktat, AP, GGT und die Galleproduktion untersucht. Entstandene Organschäden sollen histologisch nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck werden Biopsien zu unterschiedlichen Zeitpunkten genommen. Das

gewonnene Gewebe dient zur Analyse der Hepatozyten und zur Messung des Grades der Gewebeschädigung. Es sollen licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden.

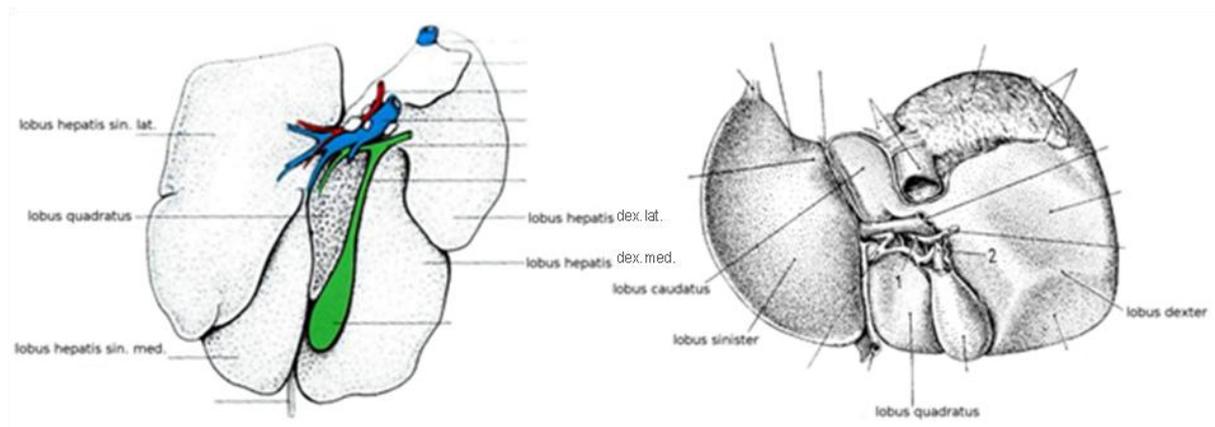
Das Ziel dieser Studie besteht darin, anhand des Ausmaßes der Gewebeschäden und der analysierten Funktionsparameter eine klare Aussage über die Effektivität der neuen Konservierungslösung zu machen.

3 Literaturübersicht

3.1 Anatomie der Leber

3.1.1 Makroskopische Anatomie der Leber

Anatomisch unterscheidet sich die Leber bei den diversen Haustieren. Der humanen Leber am ähnlichsten, vor allem bezogen auf Größe und Physiologie, ist die Schweineleber (Abouna 1973). Die Leber ist das größte Organ von Haustieren und des Menschen, sie ist in Lappen unterteilt. Wie in Abb. 1 zu sehen, besitzen sowohl die porcine als auch die humane Leber je einen *Lobus quadratus* und einen *Processus caudatus*. *Lobus sinister* und *Lobus dexter* unterscheiden sich allerdings.



Schweineleber

Humane Leber

Copyright bei Schattauer Verlag¹

Copyright bei Urban & Fischer Verlag²

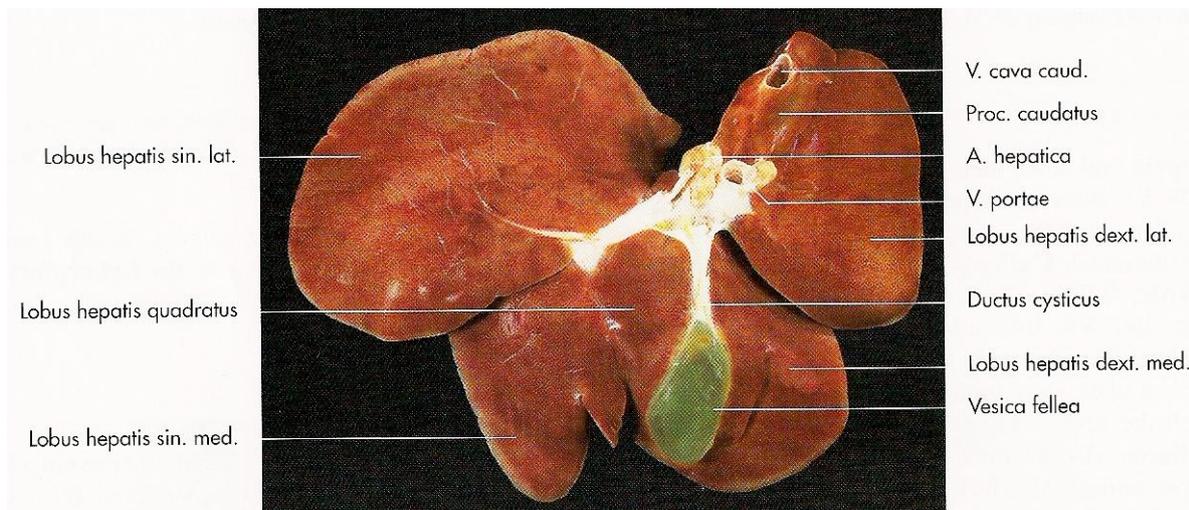
Abb. 1: Schweineleber und humane Leber im Vergleich

Dort wo es Unterschiede gibt, bezieht sich das Dargestellte im Folgenden auf die porcine Leber, da diese in der nachfolgenden Studie verwendet wird.

¹ Anatomie der Haussäugetiere, König, HE., Liebich HG. , 4.Auflage, Abb. 7-100, S.358

² Taschenbuch der Anatomie Band 2, Voss,H., Herrlinger, R., 11.Auflage, Gustav Fischer Auflage 1962, S.100

Die Leber ist von einer Leberkapsel umgeben, die als *Tunica fibrosa* bezeichnet wird. Sie liegt unterhalb des Zwerchfells im Abdomen. Sie ist mit mehreren Leberbändern am Zwerchfell befestigt. Zusätzlich erhält die Leber Halt durch die Gefäße *V. portae*, *V. cava cranialis* und *A. hepatica*. Die Schweineleber ist durch *Incisurae interlobulares* in unterschiedliche Lappen unterteilt – *Lobus hepatis sinister medialis*, *Lobus hepatis sinister lateralis*, *Lobus dexter medialis*, *Lobus hepatis dexter lateralis*, *Lobus quadratus* mit dem *Processus caudatus*. Links vom Ösophagus befindet sich der *Lobus hepatis sinister*, der sich in *Lobus hepatis sinister lateralis* und *Lobus hepatis medialis* aufteilt (Abb. 2). Der *Lobus hepatis dexter* ist ebenfalls in zwei Lappen aufgeteilt: in den *Lobus hepatis dexter medialis* und den *Lobus hepatis dexter lateralis*. Diese befinden sich rechts der *V. cava caudalis*. Unterhalb der Pfortader (*V. portae*) zwischen *Lobus hepatis sinister* (lateralis und medialis) und *Lobus hepatis dexter* (lateralis und medialis) ist der *Lobus quadratus* zu finden; dessen *Processus caudatus* ist oberhalb der Pfortader lokalisiert. Mittig in der Leber, in der *Fossa vesicae felleae*, befindet sich die Gallenblase, deren Ausführungsgang in die *V. portae* führt. Zusammen mit dem *Ductus hepatis communis* (gemeinsam als *Ductus choledochus* bezeichnet) mündet der Gallengang in den Dünndarm (Nickel 2004).



Copyright bei Schattauer Verlag³

Abb. 2: Übersicht der Anatomie der Schweineleber (Liebich 2009)

³ Anatomie der Haussäugetiere, König, HE., Liebich HG., 4.Auflage, Abb. 7-106, S.361

3.1.2 Mikroskopische Anatomie der Leber

Die Leber weist die Besonderheit einer doppelten Blutversorgung auf: Einerseits erhält sie Blut über die *V. portae* (80%), andererseits über *A. hepatica* (20%) (Nickel 2004). In den bindegewebigen Septen verlaufen Äste der *V. portae*, der *A. hepatica* und Gallenausführungsgänge nebeneinander, um so die Versorgung der Leber und Entsorgung von Abfallstoffen zu gewährleisten. Diese Einheit wird auch als Glisson Trias oder Trias hepatica bezeichnet. Die Septen unterteilen die Leber in Leberläppchen. Aus den Gefäßästen in den Septen zweigen kleinere Gefäße ab, die vom Läppchenrand durch die Leberläppchen führen und in zentral gelegenen Sinusoiden münden. Diese wiederum münden in der Zentralvene (*V. centralis*). Auf diese Weise ist die Versorgung der Leberzellen mit Nährstoffen (Hepatozyten) gewährleistet (Lüllmann-Rauch 2006). Jedoch ist wegen dieses Aufbaus die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der randständigen Hepatozyten besser als die der zentral gelegenen. Dies spiegelt sich in der Enzymausstattung und Aktivität wieder. Aufgrund dieser Tatsache sind die Leberläppchen in verschiedene „Zonen“ aufgeteilt (Hermanns 1999):

Zone 1, hier liegen die Leberzellen direkt an den zuführenden Arterien und Venen und sind daher gut mit Sauerstoff und mit Nährstoffen versorgt,

Zone 2, die mittig liegenden Zellen,

Zone 3, deren Zellen sich um die Zentralvene anordnen, mittig vom Leberläppchen.

Weiterhin ist es möglich, histologisch Bestandteile der Leber zu analysieren – Leberparenchym, das Bindegewebe, die Gefäßstrukturen und die Gallengänge. Diese einzelnen Strukturen bilden in ihrer Gesamtheit die komplexe histologische Struktur der Leber. Die kleinste morphologische Einheit der Leber sind die Leberläppchen, die aus den Leberzellen (Hepatozyten) bestehen (Mosimann 1990). Die Leberläppchen sind durch bindegewebige Septen voneinander getrennt. Diese sind beim Schwein viel stärker ausgeprägt als beim Menschen. Die Leberläppchen bestehen jeweils aus zahlreichen in Säulen angeordneten Hepatozyten, auch als „Leberbälkchen“ bezeichnet, die konzentrisch um die Zentralvene angeordnet sind. Angrenzend an die Hepatozyten liegen die Sinusoide (Blutkapillaren). Über kleinste Poren in den Zellwänden der Hepatozyten erfolgt der Stoffaustausch. Zudem wird der Bereich zwischen den Hepatozyten und den Endothelzellen der Lebersinusoide, wo vereinzelte Kollagenfasern verlaufen, als Disse-Raum bezeichnet. Hier findet der eigentliche Stoffaustausch zwischen Blutplasma und Hepatozyten statt. Des Weiteren befinden sich die sogenannten Ito-Zellen in dem Disse-Raum, die für das

Herstellen der Kollagenfasern verantwortlich sind (Denk 2000; Lüllmann-Rauch 2006). Histologisch wird einerseits zwischen dem Zentralvenenläppchen, welches ein Leberläppchen darstellt und dessen Mittelpunkt die Zentralvene bildet, unterschieden. Andererseits gibt es das sogenannte Portalvenenläppchen, welches aus Anteilen von drei Zentralvenenläppchen besteht und dessen Zentrum das Periportalfeld ist. Dieses wird als Glisson-Trias bezeichnet (Abb. 3). Es enthält die *Vene interlobularis*, die *A. interlobularis* und den Gallengang (Denk 2000).

Zusätzlich zu den Hepatozyten befinden sich in der Leber auch Makrophagen, die als Kupffer-Sternzellen bezeichnet werden. Die Kupffer-Sternzellen befinden sich in der Wand der Sinusoide und dienen der Phagozytose körpereigener und körperfremder Substanzen (z.B. Schadstoffe, Bakterien, Erythrozyten, und Stoffwechselprodukte).

In den Hepatozyten findet die Entgiftung statt, zudem werden hier Proteine und Fettsäuren synthetisiert. Aus dem Cholesterin wird in der Leber die Gallensäure produziert. Sie ist somit ein Endprodukt des Cholesterinstoffwechsels. Der Gallensaft besteht zum größten Teil aus Wasser, Gallensäuren, Gallenfarbstoffen, Enzymen und abgebauten Erythrozyten. Sie fließt über Gallenkapillaren zu den Gallengängen, die dann über den *Ductus cysticus* in die Gallenblase münden (von Engelhardt 2000). Die Gallensäuren werden über die Gallengangskanälchen, über den *Ductus hepaticus communis*, abgegeben. Zum einen verläuft sie dann über den *Ductus cysticus*, der in die Gallenblase mündet, und zum anderen über den *Ductus choledochus* in den Dünndarm. Der Gallenfarbstoff, Bilirubin, entsteht durch den Abbau von Hämoglobin. Der Gallensaft dient der Emulgation von Fetten; die Fette werden aufgespalten, sodass nur noch Mono- oder Diacylglycerine im Darm vorliegen. Lipasen übernehmen die weitere Aufspaltung. Somit wird die Aufnahme der Fette und der fettlöslichen Vitamine E, D, K und A über die Darmwand erleichtert (Hermanns 1999; Silbernagl 2000). Die Gallensäuren werden größtenteils im Darm wieder resorbiert und über die Pfortader zurück in die Leber geführt. Dort wird die Gallensäure dem Stoffwechselkreislauf wiederum zugeführt oder in der Gallenblase gespeichert. Die Gallenblase besteht aus drei Schichten: *Tunica serosa*, *Tunica muscularis* und *Tunica mucosa*. Die Entleerung der Gallenblase wird durch endokrine Signale ausgelöst (über den Anstieg von Cholezystokinin im Darm bei Aufnahme von fettreicher Nahrung) und erfolgt über parasymphatische Signale des *N. vagus* (Hermanns 1999; Silbernagl 2000).

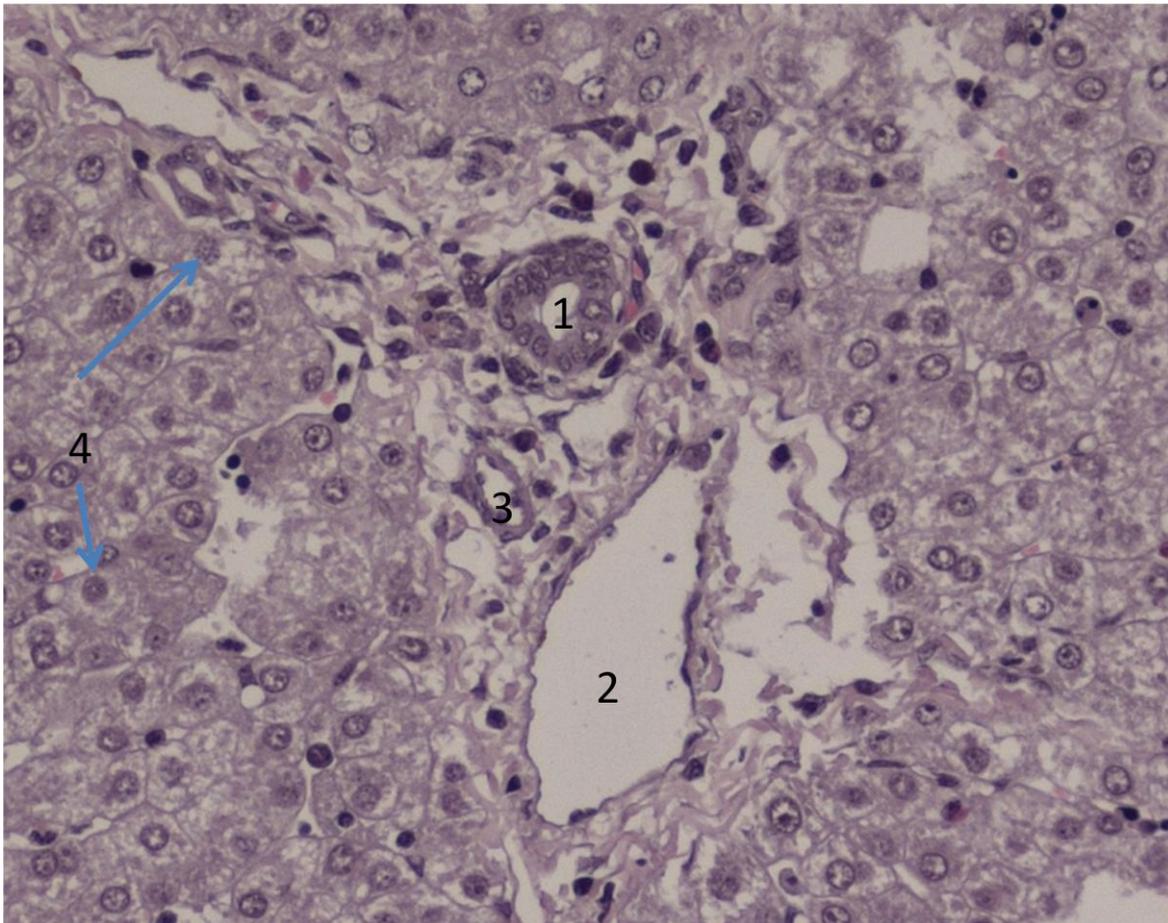


Abb. 3: Mikroskopische Abbildung der Schweineleber, Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, 1: Gallengang, 2: Vene, 3: Arterie, 4: Hepatozyten mit Zellkern (OV x400)

3.2 Funktionen der Leber

Die Leber ist eine der größten Drüsen im Körper und übernimmt viele Funktionen: Abwehr, Entsorgung und Versorgung. Damit diese Funktionen erfüllt werden können, müssen unterschiedliche Mechanismen u. a. im Bereich der Durchblutung, der biliären Sekretion, der Synthese und der Exkretion erfolgreich ablaufen (Denk 2000).

Die Leber greift regulierend in das Immunsystem ein und hat Einfluss auf den Hormonhaushalt. Sie gehört zu den wichtigsten Entgiftungsorganen im Organismus, vor allem im Bereich des Medikamentenabbaus, aber auch bei der Entsorgung von Abbauprodukten des Stoffwechsels, wie z.B. Bilirubin. Aufgrund der Lage der Leber und ihrer Versorgung mit Blut aus dem Magen-Darm-Trakt (über die V. portae) und der Leberarterie spielt sie eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Organismus. Sie nimmt Nährstoffe aus dem Blut auf und speichert sie. Gegebenenfalls werden diese Nährstoffe durch biochemische Vorgänge verändert und

dann wieder abgegeben. Lebenswichtige Stoffwechselforgänge im Organismus, bei denen die Leber eine zentrale Bedeutung hat, sind Kohlehydratstoffwechsel, Proteinstoffwechsel und Lipidstoffwechsel (von Engelhardt 2000; Nelson 2001).

3.2.1 Kohlenhydratstoffwechsel

Zum Kohlehydratstoffwechsel gehört u. a. die Aufnahme (und Speicherung) oder Abgabe von Glucose, wodurch der Blutglucosespiegel konstant gehalten wird. Diese Aufgabe ist essentiell, da eine kontinuierliche Aufnahme von Glucose durch die Nahrung nicht erfolgt. Sowohl die Aufnahme und Speicherung als auch die Freisetzung von Glucose wird durch die Hormone Insulin, Adrenalin und Glukagon reguliert (von Engelhardt 2000). Insulin und Glukagon werden jeweils in der Bauchspeicheldrüse (*Pankreas*) produziert. Sie wirken antagonistisch. Insulin senkt den Blutglucosespiegel, indem die Aufnahme des Zuckers in die Leber gefördert wird, u.a. durch die Aktivierung der GLUT-Transporter. Gleichzeitig erfolgt eine Aktivierung des Enzyms Glucokinase, das für die Glykolyse (Abbau von Zucker) in der Leber wichtig ist (Dancygier 2003). Glukagon als Gegenspieler fördert die Gluconeogenese in der Leber und die Freisetzung der Glucose in den Organismus. Es steigert somit den Blutglucosespiegel. Adrenalin, ein Hormon aus dem Nebennierenmark, fördert ebenfalls die Freisetzung von Glucose durch die Aktivierung der Glycogenolyse, also des Abbaus von Speicherzucker. Des Weiteren wirken Glukokortikoide, die in der Nebennierenrinde produziert werden, steigend auf den Glucosespiegel im Blut, und zwar über Freisetzung von Glucose aus der Leber, u. a. durch die Aktivierung der Neubildung von Enzymen, die für die Gluconeogenese essentiell sind (von Engelhardt 2000).

3.2.2 Proteinstoffwechsel

Im Rahmen des Proteinstoffwechsels besteht die Funktion der Leber aus Abbau und Neusynthese von einzelnen Aminosäuren sowie der Synthese und Katabolisierung von Plasma-proteinen, wodurch die Proteinplasmakonzentration aufrechterhalten wird (Dahme 1999). Ein wichtiges Protein, welches in der Leber synthetisiert wird, ist Albumin. Eine geringe Konzentration von Albumin im Blut ist ein Indiz für eine Leberschädigung (Giannini et al. 2005). Eine wichtige Aufgabe der Leber ist die Produktion von Pyruvat als Endprodukt über die Glykolyse, welches dann dem Zitratzyklus zugeführt wird, und somit der Energiegewinnung dient. Schließlich ist natürlich der Harnstoffzyklus ein wichtiger proteinogener Stoffwechselforgang, der teilweise in der Leber abläuft (Hermanns 1999).

3.2.3 Lipidstoffwechsel

Der Lipidstoffwechsel bezeichnet die Aufnahme und Verwertung der Lipide. Die beteiligten Fette werden über die Nahrung aufgenommen und über unterschiedliche Enzyme im Darm

in einzelne Fettsäuren aufgespalten. Die Fettsäuren, die zur Leber transportiert werden, sind an das Albumin gebunden und werden als Lipoproteine bezeichnet. Fettsäuren werden in die Leber unterschiedlich weiterverarbeitet. Zum einen werden sogenannte „Very Low Density Proteins“ (VLDL) gebildet, die dazu dienen, wasserunlösliche Fette (Cholesterin und Triacylglycerine) aus den Hepatozyten über die Blutbahn zum peripheren Gewebe zu transportieren. Zum anderen werden die Fette mittels β -Oxidation in Acetyl-CoA umgewandelt, welches dann über den Zitratzyklus abgebaut werden kann (Denk 2000; Silbernagl 2000). Weiterhin werden „High Density Lipoproteins“ (HDL) gebildet, die das überschüssige Cholesterin in der Blutbahn binden und zurück zur Leber transportieren, wo es über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden wird (Denk 2000).

An diesen Erläuterungen wird ersichtlich, welche zentrale Bedeutung die Leber hat. Diese spielt eine maßgebliche Rolle bei vielen wichtigen Stoffwechselfvorgängen.

3.3 Messkriterien für die Funktionstüchtigkeit der Leber

Mögliche Leberschäden können über Enzymwerte und Stoffwechselprodukte der Leber ermittelt werden. Um ein möglichst umfangreiches Bild über Schäden an der zu transplantierten Leber zu erhalten, werden in dieser Studie unterschiedliche Parameter gemessen. Eine umfangreiche Untersuchung der relevanten „Marker“ gewährleistet eine genaue Überprüfung der Funktionstüchtigkeit (Giannini et al. 2005). Laktat, Pyruvat, Glucose und Glycerol sind hier wichtige zu überprüfende Metabolite des Stoffwechsels. Sie lassen Aussagen über Ischämieschäden zu (Brosnan et al. 1970; Winblad et al. 2009). Ein Anstieg u. a. von Laktat deutet auf eventuelle Gewebeschädigungen aufgrund einer Sauerstoffunterversorgung hin.

3.3.1 Metabolite des Stoffwechsels

Der Laktatwert erhöht sich während des anaeroben Stoffwechsels, während sich das Pyruvat beim aeroben Stoffwechsel erhöht. Eine Zunahme, entweder des Laktates oder des Pyruvats, hilft demnach zu klären, ob sich der Organismus in einem anaeroben oder in einem aeroben Glukosestoffwechsel befindet (Winblad et al. 2009).

Die Überprüfung biochemischer Parameter ist somit essenziell, um vorhandene und entstehende Schäden durch Ischämie bzw. Reperfusion erkennen zu können (Nowak et al. 2002). Studien zeigen, dass eine Mikrodialyse eine Erhöhung von bestimmten Stoffen zeigen kann, die bei Ischämieschäden auftreten, und durch Veränderungen im Blut noch nicht nachweisbar sind (Winblad et al. 2009).

Da es bei einer Lebertransplantation kurzzeitig zu einer Ischämie kommt, welche auf die Unterbrechung der Durchblutung zurückzuführen ist, schaltet der Organismus von aerobem auf anaeroben Stoffwechsel um. Dies hat aufgrund von Sauerstoff- und Glucosemangel eine Zunahme von Laktat zur Folge (Kannerup et al. 2009).

3.3.2 Die Enzyme der Leber

Diverse Enzyme werden in der Leber synthetisiert. Sie fungieren als Biokatalysatoren im Organismus, d.h. sie können die Reaktionsgeschwindigkeit bei Stoffwechselfvorgängen beeinflussen (Gagianiss 2007). Um die Funktionstüchtigkeit der Leber zu untersuchen, ist eine Analyse der Leberenzyme notwendig, da somit eine genauere Aussage über die Funktionalität der Leber getroffen werden kann und sie einen Anhaltspunkt dafür bietet, wo genau die Ischämie- bzw. Reperfusionsschäden zu lokalisieren sind (von Engelhardt 2000).

Alaninaminotransferase (ALT, früher GPT), Aspartataminotransferase (AST, früher GOT), und Glutamatdehydrogenase (GLDH) sind wichtige Leberenzyme. Die Feststellung der jeweiligen Mengen gibt Auskunft über die Funktionstüchtigkeit der Leber und auf das Vorliegen von Membranschäden. Weitere Enzyme sind u. a. die Alkalische Phosphatase (AP) und die Gammaglutamyltransferase (GGT). Oft werden bei Untersuchungen von Leberschädigungen auch die Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen (Aragon et al. 2010).

Alaninaminotransferase (ALT) ist ein leberspezifisches Enzym, welches besonders in den periportal Leberzellen vorkommt. Es befindet sich im Zytosol, wird schon bei geringen Membranschäden (Zellpermeabilitätsstörung) freigesetzt und kann dann im Plasma nachgewiesen werden (Giannini et al. 2005).

Aspartataminotransferase (AST) kommt im Zytosol und in den Mitochondrien diverser Zellen vor. In der Leber tritt es häufiger in den Periportalzellen als in den Zentralleberzellen auf. AST ist zumeist erst bei hochgradigen Zellnekrosen nachweisbar. Es ist allerdings nicht leberspezifisch und daher nur im Zusammenhang mit den anderen genannten „Leberenzymen“ aussagekräftig (Giannini et al. 2005; Hagemann 2010). Die höchste Aktivität ist im Herzmuskel messbar, gefolgt von Leber, Niere, Skelettmuskel und Gehirn (Fluckiger et al. 1977).

Glutamatdehydrogenase (GLDH) ist hingegen ein spezifisches Enzym der Leber, da es vor allem in den Mitochondrien der Zentralleberzellen vorkommt. Es tritt zwar durchaus auch in geringen Mengen in anderen Zellen im Organismus in Erscheinung, allerdings ist eine Erhöhung von GLDH fast ausschließlich auf Leberschädigungen zurückzuführen. Aufgrund

seiner Lokalisierung in den Mitochondrien wird GLDH erst freigesetzt, wenn die Zellen fast komplett zerstört sind. Anders verhält es sich bei ALT und AST, welche schon bei geringen Schäden freigesetzt werden, da diese Enzyme sich im Zytosol befinden. GLDH wird vor allem bei hypoxischen und cholestatischen Schädigungen freigesetzt (Kraft 2005)

Die Laktatdehydrogenase (LDH) galt lange Zeit nicht als wichtiges Leberenzym, da es sich auch in anderen Organzellen befindet. Zwischenzeitlich ist bekannt, dass LDH ein Indikator für hypoxische Schäden der Leber sein kann (Cassidy et al. 1994; Kotoh et al. 2008). Der LDH-Wert steigt sogar bei Hypoxie stärker an als die AST- und ALT-Werte, die als die gängigsten Untersuchungsparameter herangezogen werden. Anzunehmen ist, dass die Erhöhung der LDH-Konzentration im Blut auf Membranschädigungen zurückzuführen ist. Allerdings könnte eine weitere Erklärung sein, dass sich der Körper bei Sauerstoffmangel auf einen anaeroben Stoffwechsel einstellt. LDH ist bei der anaeroben Glykolyse das Schlüsselenzym, welches für die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat verantwortlich ist. Hierbei ist nicht nur der Anfangswert ($t = 0$) aussagekräftig. Vielmehr zeigen Studien von Kotoh et al., dass der Verlauf der LDH-Konzentration im Serum ebenso eine Rolle spielt. Die Ergebnisse von Kotoh et al. deuten darauf hin, dass ein langsamerer Abbau der LDH-Konzentration – normalerweise hat LDH eine relativ schnelle Halbwertszeit im Vergleich zu z.B. AST – mit einer schlechteren Überlebensrate korreliert (Kotoh et al. 2008).

Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) ist ein Enzym, welches als Marker verwendet werden kann, um den Funktionszustand der Gallenblase zu kontrollieren. Bei Abflussstörungen der Galle erhöht sich das Vorkommen dieses Enzyms. GGT findet sich in mehreren Zellen des Organismus, vor allem in der Niere und Bauchspeicheldrüse. Auch ist eine hohe Aktivität in den Leberzellen nachgewiesen (Kraft 2005), insbesondere in den Zellen, die die Gallengänge auskleiden. Eine Erhöhung von GGT ist messbar, wenn eine funktionelle Beeinträchtigung des Fließverhaltens der Galle in den Gallengängen vorliegt. Dies ist z.B. der Fall, wenn es zu einer Stauung der Gallenflüssigkeit kommt (Kakar et al. 2004).

Alkalische Phosphatase (AP) ist ein weiteres Enzym, welches im Fall von Störungen in der Gallenproduktion bzw. beim Gallenabfluss aussagekräftig ist. Aufgrund der Tatsache, dass AP auf intakte Leberstrukturen angewiesen ist, eignet es sich auch als Marker für die Funktionstüchtigkeit der Leber. Es reagiert sehr sensibel auf jegliche Veränderungen des Lebergewebes (Bowers et al. 1987; Almada et al. 2003).

Hier ist wichtig anzumerken, dass die Aussagekraft nur im Zusammenhang mit GGT vorhanden ist. Sind beide Enzyme erhöht, ist dies mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine

Störung im Bereich der Leber und der Gallenblase zurückzuführen. Ist der GGT-Wert normal und nur der AP-Wert erhöht, ist die Ursache wahrscheinlich in einem anderen Bereich des Organismus zu suchen (Neumeister 2009). Die AP-Aktivität ist altersabhängig (Kraft 2005). Zudem beeinflussen beim Schwein auch das Geschlecht und die Art der Haltung die AP-Aktivität (Gregor 1979).

3.3.3 Gallenproduktion

Die Gallenflüssigkeit eignet sich ebenfalls als Parameter für die Überprüfung der Funktionstüchtigkeit der Leber. In früheren Untersuchungen wurde eine Reduzierung der Menge der Gallenflüssigkeit bei der Reperfusion nach Kaltischämie festgestellt (Almada et al. 2003). Je geringer der Gallenfluss, desto eher kommt es gemäß der experimentellen Studien zu einem Leberversagen. Da der Gallenfluss sensibel auf jegliche Veränderung der Zellstrukturen im Sinusoidalraum reagiert, ist der Rückgang vermutlich auf durch Kaltischämie verursachte Schäden zurückzuführen (Clavien et al. 1992). Die Analyse der Gallenflüssigkeit bietet eine Möglichkeit, die Funktionstüchtigkeit der Leber zu überprüfen, da die Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit auf verschiedene biochemische Prozesse zurückzuführen ist, die nur in einer funktionstüchtigen Leber ungestört ablaufen (Hedaya et al. 2009).

3.4 Geschichte der Lebertransplantation

Die ersten Transplantationsversuche wurden mit der Niere durchgeführt, doch relativ schnell auf die Leber und andere Organe ausgeweitet. Die ersten tierexperimentellen Studien auf dem Feld der Lebertransplantation wurden 1955 von C.S. Welch am Albany Medical College New York mit Hunden durchgeführt. In dieser Studie wurde die Leber eines Hundes zur Unterstützung der ursprünglichen Leber in einen anderen Hund transplantiert, ohne dass dessen kranke Leber entfernt wurde. Die Veröffentlichung dieser Studie bedeutete die erstmalige Erwähnung der Lebertransplantation in der Literatur (Starzl 2003).

Unabhängig voneinander wurden weitere tierexperimentelle Studien am Hund – in Boston von F.D. Moore und in Chicago von T. Starzl – durchgeführt, allerdings wurden hier die kranken Lebern entfernt und durch „neue“, funktionierende ersetzt. 1963 gelang es Starzl erstmalig, am Menschen eine Lebertransplantation durchzuführen, allerdings verstarb der Patient. Die erste erfolgreiche Lebertransplantation ist erst 1967 zu verzeichnen. Der Patient überlebte 400 Tage (Abbasoglu 2008). Die erste Lebertransplantation in Europa wurde 1968 von Sir Roy Calne in Großbritannien durchgeführt (Calne 1968)

Die auftretenden Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen sind immunologisch induziert. Der Empfängerorganismus reagiert mit Antikörperbildung auf das körperfremde Eiweiß,

wodurch es zu einer Organabstoßung kommt. Daher ist es wichtig, vor einer Transplantation die Funktionsweise des Immunsystems anzupassen. Dies bedeutet die Immunabwehr des Empfängers wird künstlich geschwächt, um die Gefahr einer Abstoßungsreaktion zu minimieren. Durch die Behandlung mit Immunsuppressiva soll die Immunantwort des Empfängers, die im Normalfall sowohl auf humoraler als auch zellulärer Ebene erfolgt, unterdrückt werden. Die Immunsuppression muss während der gesamten Funktionszeit des Spenderorgans beibehalten werden. Hierdurch wird das Risiko einer Immunreaktion des Empfängerkörpers gegen das Spenderorgan reduziert. Es wird allerdings unterschieden zwischen der Basisimmunsuppression (vor der OP und unmittelbar nach der Transplantation) und der Erhaltungimmunsuppression. In diesem Kontext gilt die Entdeckung von Cyclosporin A als Immunsuppressivum durch Sir Roy Calne als ein Meilenstein in der Transplantationschirurgie (Calne 2004), vor allem, da die zur Verfügung stehenden Medikamente, wie z.B. Kortison, nicht immer ausreichend wirksam waren.

1984 wurde erstmals, von Bismuth und Houssin, die sogenannte RSLT-Technik eingeführt (Broelsch et al. 1988), um das Problem des Spenderlebermangels bei Kindern zu beheben. RSLT wird meist bei Kindern eingesetzt, da es mehr Spenderorgane von Erwachsenen gibt, die aufgrund ihrer Größe bei einem Kind nicht eingesetzt werden können und daher aufgeteilt werden müssen. Studien haben gezeigt, dass eine Leber in acht Segmente aufgeteilt werden kann und dass zwei Segmente reichen, um die Funktion der Leber zu übernehmen. Voraussetzung hierfür ist, dass diese zwei Segmente gesund und voll funktionsfähig sind (Busuttil et al. 1999). Hierdurch kann nunmehr die Leber eines Erwachsenen auch für Kinder verwendet werden. Als Folge hierdurch konnte allerdings ein Mangel an Spenderlebern bei Erwachsenen beobachtet werden (Nadalin et al. 2006).

1987 unternahm Raia im brasilianischen Sao Paulo den ersten Versuch einer Lebertransplantation mit einem lebenden Spender. Bei der LDLT wird ein Teil der Leber des Spenders entfernt und einem Kranken, dessen kranke Leber komplett entfernt wurde, eingesetzt. Die LDLT bietet somit eine weitere Möglichkeit, den Mangel an Spenderlebern zu minimieren. Die erste erfolgreiche Durchführung einer LDLT gelang Strong 1989 im australischen Brisbane. Die Überlebensrate des Patienten belief sich auf 14 Monate. Seine Mutter, die Leberspenderin, wies in der Folge keine Anzeichen von Leberversagen auf (Tanaka 2003; Nadalin et al. 2006; Chan et al. 2008). Inzwischen hat sich die Gesetzeslage gelockert, sodass auch Freunde und Bekannte als Spender infrage kommen (Florman et al. 2006).

Als weiteren wichtigen Fortschritt in der Lebertransplantationschirurgie ist die Einführung der sogenannten UW-Lösung für die Leber zu nennen. Bei den ersten Versuchen, ein Organ

über einen bestimmten Zeitraum zu lagern, wurde die Leber für zwölf Stunden konserviert und zeigte keine maßgeblichen klinischen Veränderungen (Kalayoglu et al. 1989).

Broelch gelang nicht nur die erste erfolgreiche Serierendurchführung von LDLTs (in Chicago, USA), sondern er brachte die Technik auch nach Europa, wo die erste LDLT in Hamburg 1991 durchgeführt wurde (Walter et al. 2008). Ein weiterer Ansatz in der Lebertransplantationschirurgie, um das Problem des Spendermangels zu lösen, war die Einführung der „Split Liver Transplantation“ (SLT). Dieses Verfahren wurde erstmals von Pichlmayer im Jahr 1988 angewendet. Hierbei wird die Spenderleber zweigeteilt und jeweils eine Hälfte pro Empfänger eingepflanzt (Nadalin et al. 2006). In den darauf folgenden Jahren war die Forschung damit beschäftigt, OP-Techniken zu verfeinern, um u. a. den Blutverlust einzuschränken. Darüber hinaus sollten weitere Möglichkeiten gefunden werden, dem Spenderlebermangel entgegenzutreten. Um die Abstoßungsreaktionsgefahr zu minimieren war die Entwicklung von Medikamenten zur Immunsuppression weiterhin von Bedeutung. Zudem war man bestrebt, neue Konservierungslösungen zu entdecken, um die Konservierungszeiten zu verlängern, ohne dass das zu transplantierende Organ größeren Schäden nahm. Der Fortschritt in diesen Punkten diente der Verbesserung der Überlebensrate der Patienten.

Tabelle 2: Meilensteine in der Lebertransplantation

1955	Welch	Erste Durchführung einer LT am Hund
1960	Starzl	Transplantation von multiplen Bauchorganen in Hunde
1963	Starzl	Erste LT weltweit (Denver, Colorado)
1968	Gütgemann	Erste LT in Deutschland (Bonn)
1969	Collins	Einführung der Euro-Collins-Konservierungslösung
1975	Pereya	Erfolgreiche Perfusionskonservierung
1978	Calne	Einführung von Cyclosporin A (um die Abstoßungsreaktion zu minimieren)
1984	Bismuth	Erste RSLT
1987	Raia	Erste LDLT am Menschen
1987	Strong	Erste erfolgreiche LDLT in Australien
1988	Kalayoglul	Einführung der UW-Lösung als Konservierungslösung
1988	Pichlmayer	Erste SLT-Transplantation
1989	Broelch	Erste LDLT-Durchführung als Serie
1991	Broelch	Einführung der LDLT in Europa (Hamburg)

3.5 Entwicklung der maschinellen Organperfusion

Hinter der Entwicklung der maschinellen Perfusion steht der Gedanke, das zu transplantierende Organ so physiologisch wie möglich zu halten, um etwaige Schäden, die bei der reinen kalten Konservierung entstehen, zu verhindern.

Der Grundgedanke basiert auf dem Prinzip der Dialyse, welche das bei Nierenpatienten angewandt wird. Das entsprechende Wissen macht man sich für Konservierungen der Leber zunutze (Vekemans et al. 2008). Wenn Organe mit Entgiftungs- und Stoffaustauschfunktion, wie Leber oder Niere, versagen, müssen diese Aufgaben von außen, über eine Dialyse,

übernommen werden. Zu diesem Zweck wird zusätzlich zum Blut ein „Gegenspieler“, das Dialysat (Spülflüssigkeit), benötigt. Blut und Dialysat werden durch den Dialysator geleitet, wo sie, getrennt durch eine Membran, aneinander vorbeilaufen. Maßgeblich für das Funktionieren des Stoffaustauschs sind die Membraneigenschaften (z.B. Porengröße) und die unterschiedlichen Stoffkonzentrationen der beiden Flüssigkeiten. Der Austausch zwischen den Flüssigkeiten findet über Osmose/Diffusion statt. Die Membran lässt nur kleine Moleküle, z.B. Elektrolyte, durch die Poren passieren (Breuch 2007).

Es wird zwischen einer normothermen maschinellen Perfusion (37° C), die mit körperwarmem autologem Blut durchgeführt wird, und einer hypothermen maschinellen Perfusion (4° C), die mit einer kalten Perfusionslösung durchgeführt wird, unterschieden (Dutkowski et al. 2008). Größter Vorteil bei der normothermen maschinellen Perfusion ist, dass das Organ mit Sauerstoff und Nährstoffen (über das Dialysat) versorgt werden kann. Sie bietet weiterhin die Möglichkeit dass Schäden, die durch die kalte Ischämie auftreten, verhindert werden. Ferner ermöglicht Sie eine ständigen Überprüfung der Vitalität der Leber (Schon et al. 2001). Ein weiterer Ansatz schließt vor der maschinellen Perfusion eine Kaltischämiezeit ein, um einen Transport der Organe zum Transplantationsinstitut zu ermöglichen. Um Schäden zu vermeiden, werden die Ischämiezeiten auf ca. vier Stunden begrenzt (Tolboom et al. 2008).

3.6 Vor- und Nachteile der Organkonservierung

Da bei einer Transplantation die Blutversorgung unterbrochen wird, ist die Sauerstoffversorgung des Organs nicht mehr gewährleistet und die Stoffwechselfunktionen kommen wegen mangelnder Energieversorgung zum Erliegen. Ohne Konservierung bleibt nur eine Stunde um das Organ zu transplantieren. Um diese zeitliche Einschränkung zu umgehen muss konserviert werden (Erhard et al. 1994; Erhard 1999). Hierdurch wird auch der Spenderkreis erweitert, da die geografische Nähe nicht mehr so wichtig ist und da mehr Zeit zwischen Entnahme des Organs und Retransplantieren des Organs entsteht (Den Toom et al. 1991).

Die Grundidee der Organkonservierung basiert auf der Erkenntnis von van't Hoff, dass bei Abkühlung der Körpertemperatur auf ca. 4° C die Stoffwechselaktivität auf ca. ein Zwölftel des normalen Metabolismus reduziert wird (Belzer et al. 1988). Studien an der Rattenleber (Kebis et al. 2007) zeigen, dass eine schnelle Abkühlung der entnommenen Leber auf 4 °C nicht nur Vorteile mit sich bringt, sondern dass es auch zu Beeinträchtigungen der Mikroperfusion im peripheren Lebergewebe kommt (Drews et al. 1998). Eine Untersuchung

von Kebis verdeutlicht, dass sich die Konservierung der Rattenleber bei 10° C bei der Reperfusion positiv auf das Lebergewebe auswirkt.

Bei den Konservierungstechniken wird zwischen der sogenannten reinen Kaltlagerung („Cold Storage“ – CS) und der Perfusionskonservierung („Perfusion Storage“ – PS) unterschieden. Bei der CS wird das Organ nach der Entnahme und dem Durchspülen mit der Konservierungslösung schnell auf ca. 4° C abgekühlt und in der Konservierungslösung gelagert. Bei der Perfusionskonservierung wird das Organ mithilfe einer Perfusionsapparatur bei 10-20° C dauerperfundiert (Fujita et al. 1997; Moers et al. 2009).

Konservierungslösungen, die eine längere Lagerung der Leber zulassen (bei den ersten Konservierungsversuchen lag die Konservierungsdauer bei ca. sechs Stunden), eröffnen nicht zuletzt ein größeres Zeitfenster, um die bestmögliche Gewebeverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger zu ermitteln. Die Wahl der Konservierungslösung ist essentiell, da der Schutz der Leber während der Konservierungszeit von der Zusammensetzung der Konservierungslösung abhängt. Je geringer die Schädigung, desto schneller und effektiver kann das Organ wieder seine Aufgaben aufnehmen (Pegg 1986).

Es wurden im Laufe der Jahre in der Forschung unterschiedliche Konservierungslösungen getestet. Diese hatten verschiedene Zusätze, die wiederholt verändert wurden. Durch die Änderung der Zusammensetzung konnte jene Konservierungslösung gefunden werden, welche die geringsten Schäden am Lebergewebe verursacht.

3.6.1 Konservierungslösungen

Die Konservierung umfasst im Allgemeinen eine Reduktion des Zellstoffwechsels, das reversible Herabsetzen der Membranaktivität und die Pufferung der durch die Hypoxie entstandenen Azidose. Die Wahl der Konservierungslösung und die Zeit der kalten Konservierung beeinflusst das Ausmaß der entstehenden Schäden an der Leber. Bei der Etablierung einer geeigneten Konservierungslösung geht es darum, die Prozesse, die zu diversen Schäden führen können, zu unterbinden oder zu minimieren. Die Hauptansatzpunkte sind jeweils die Pufferung und Blockierung bestimmter Stoffwechselforgänge (Belzer et al. 1988; Janssen et al. 2004; Vekemans et al. 2008). Inzwischen werden verschiedene Lösungen eingesetzt. Die vier gängigsten Konservierungslösungen, die sich mit der Zeit bewährt haben und die Ischämie- und Perfusionschäden minimier(t)en, sind neben University-of-Wisconsin-Konservierungslösung, Euro-Collins-Konservierungslösung, die Celsior Konservierungs-

ösung, und die Histidin-Tryptophan-Konservierungslösung. Im Detail sind unten die UW-Lösung und die zu testende Biseko-Lösung aufgeführt.

3.6.1.1 Biseko-Lösung

Die Biseko-Lösung zählt zu den kolloidhaltigen Lösungen, die aus humanem Spenderplasma hergestellt werden. Es handelt sich um eine isotone 5%ige Serumproteinlösung, die virusinaktiviert und reich an stabilen Immunglobulinen ist (Kotitschke et al. 1985). Sie enthält aber auch Albumin und andere Transport- und Inhibitor-Proteine. Ein weiterer wichtiger Vorteil besteht darin, dass die Biseko-Lösung frei von Hämolytinen ist und daher unabhängig von der jeweiligen Blutgruppe verabreicht werden kann (Stephan 1982). Eine Studie von Lobo et al. zeigt auf, dass kolloidhaltige Lösungen bessere Ergebnisse hinsichtlich Zellödemen erzielen als herkömmliche Elektrolytlösungen (Lobo et al. 2008). Die Biseko-Lösung wird häufig nach Operationen verwendet, da hierdurch eine unzureichende Immunglobulinkonzentration ausgeglichen werden kann (Probst 1985). Weiterhin wird sie generell zur Prophylaxe von Infektionskrankheiten bei Antikörpermangelsyndromen und bei Hypoproteinämien bzw. generell zum Flüssigkeitsausgleich eingesetzt. Eine Studie von Maier (2004) verweist darauf, dass die Biseko-Lösung auch eine positive Auswirkung auf die Mikrozirkulation hat (Maier et al. 2004).

3.6.1.2 University-of-Wisconsin-(UW-) Konservierungslösung

Die UW-Lösung wurde von Fokert O. Belzer in Madison, Wisconsin (USA) entwickelt. Sie enthält u.a. Glutathion, welches die Effekte von freien Radikalen reduziert. Weitere Komponenten wie Laktobionat, Raffinose und Hydroxyäthylstärke verhindern die Zellschwellung. Die UW-Lösung enthält Adenosin, welches energetisch vom Transplantat genutzt werden kann. Die Lösung wird in Mengen von 50–60ml/kg Körpergewicht eingesetzt. Sie ist natriumreich und sollte daher vor der Reperfusion ausgespült werden (Erhard et al. 1994; Erhard 1999). Aufgrund der hohen Viskosität kommt es allerdings vermehrt zu Störungen in der Mikrozirkulation, vor allem im Bereich der Lebersinusoiden, was wiederum nach der Transplantation zu Problemen bei der Funktionstüchtigkeit der Leber führt (Feng et al. 2006). Die UW-Lösung wurde erstmals 1987 erfolgreich als Konservierungslösung bei einer Lebertransplantation eingesetzt. Die Konservierungszeit betrug zwölf Stunden.

Zu Verbesserung der Ergebnisse bei der Verwendung der UW-Lösung, wird die Anwendung der „Carolina Rinse Solution“ nach der Konservierung empfohlen. Ihr Einsatz minimiert die Aktivierung der Kupferzellen, fördert nach der Transplantation die Mikrovaskularisierung der Leber und verbessert den Gallenfluss. Mit der Förderung der Mikrovaskularisierung der

Leber wirkt man Schäden, die infolge der Reperfusion entstehen können, entgegen (Abdennebi et al. 1998).

3.7 Kaltperfusion versus warme Perfusion

Kaltperfusion ist die Phase, in der das Organ mit Konservierungslösung im Perfusionsapparat perfundiert wird.

Als Warmperfusion wird die Phase bezeichnet, während der im Versuchsablauf das entnommene Organ in der Perfusionsapparatur mit Spenderblut perfundiert wird. Diese Zeit soll der Zeit entsprechen, in der das Organ ohne Spender- oder Empfängerperfusion ist.

3.8 Kaltischämie versus Warmischämie

Im Zuge des Transplantationsvorgangs ist es unvermeidlich, dass es zu einer Ischämiezeit kommt – eine Phase, in der das Organ aufgrund der Unterbrechung des Blutflusses nicht mit Sauerstoff versorgt wird. Es gibt einerseits die Phase, die als warme Ischämiezeit bezeichnet wird. Diese Phase fängt mit dem Abklemmen der Blutgefäße im Organismus an und endet mit der Immersion des entnommenen Organs in 4° C kalter Kochsalzlösung. Andererseits gibt es eine Phase, die als kalte Ischämiezeit bezeichnet wird. Sie beginnt mit der Immersion des entnommenen Organs in der 4° C kalten Kochsalzlösung, setzt sich mit anschließender Konservierung in der gewählten Konservierungslösung fort und endet mit der Reperfusion, entweder im Empfängerorganismus oder in der Perfusionsapparatur.

Nicht nur die Entwicklung und die Wahl der Konservierungslösung spielen eine wichtige Rolle bei der Transplantation, sondern auch die Methode der Konservierung. Schon frühzeitig war bekannt, dass durch Abkühlung des Organs der Zellmetabolismus heruntergefahren wird und so ischämischen Schäden entgegengewirkt werden kann (Belzer et al. 1988). Allerdings kam es in der Folge zur Problematik der Ischämiezeit der Leber. Je länger der Blutfluss durch die Leber gestoppt wird, desto länger befinden sich die Leber bzw. die Zellen im anaeroben Zustand. Die Ischämie führt zu Schäden, die nach der Transplantation ein Leberversagen nach sich ziehen können (Kannerup et al. 2009).

3.9 Ischämie und Reperfusionsschäden

In diversen Studien wurde festgestellt, dass die Schädigungen an den Hepatozyten vorwiegend auf die Warmischämie (Phase der Unterbrechung des Blutflusses bei der Entnahme) zurückzuführen sind. Die Schädigungen an den Endothelzellen werden durch die Kaltischämie (Konservierungszeit) verursacht (Ikeda et al. 1992). Erschwerend kommen

Schädigungen hinzu, die durch reperfusionsbedingte Entzündungsreaktionen auftreten (Jaeschke 1998).

Grundlage der Schädigung an den Hepatozyten durch die Ischämie ist eine gestörte Energieversorgung. Es kommt zu Schädigungen an unterschiedlichen Stellen der Zelle: an Mitochondrien, am endoplasmatischen Reticulum und an der Plasmamembran (Dancygier 2003). Mit Sauerstoffmangel geht der Verbrauch der Energiereserven einher und damit eine vermehrte anaerobe Glykolyse, wodurch sich Laktat ansammelt. In der Folge verändert sich der pH-Wert in den Zellen. Es kommt zu Veränderungen an den Elektronentransportern bis hin zu Schädigungen an der zellulären Membran (Dancygier 2003).

Studien verweisen darauf, dass durch die Kaltischämiezeit Schäden an der Leber auftreten, welche auf Zellödeme, Kalziumüberschuss, Azidose, Oxidation, Freisetzung von Zytokinen, Apoptose und Störungen in der Mikrozirkulation zurückzuführen sind (Feng et al. 2006).

Die Beeinträchtigung der Funktionstüchtigkeit des Organs bei einer Transplantation geht zurück auf Schäden am Endothel der Lebersinusoiden, die u.a. durch die Ischämie verursacht werden können. Aufgrund dieser Endothelschäden kommt es zu einer Veränderung der Durchblutung der Leber, zur Aktivierung von Kupferzellen und Nekrotisierung der Hepatozyten. Kupferzellen setzen u.a. proteolytische Enzyme, Prostaglandine und den Tumor Nekrose Faktor (TNF- α) frei, die zu Organschäden beitragen (Abdennebi et al. 1998). Es ist bekannt, dass Zytokine, wie z.B. diverse Interleukine, und TNF- α bei Entzündungsprozessen (oder auch Verletzungen) freigesetzt werden und an der Immunantwort beteiligt sind. Sie wirken aber nicht nur immunmodulatorisch, sondern haben auch Einfluss auf endokrine und auf metabolische Funktionen. Diese Zytokine sind auch an den Prozessen in der Leber bei einer Lebertransplantation bzw. bei der Reperfusion beteiligt (Studzinski et al. 2008). Durch die Reperfusion werden Kupferzellen aktiviert, die dann aktive Sauerstoffverbindungen und Zytokine wie Interleukine und TNF- α produzieren. Es kommt zur Produktion von aktiven Sauerstoffverbindungen und Proteasen, was eine direkte Zellschädigung nach sich ziehen kann. Des Weiteren werden neutrophile Granulozyten und Adhäsionsmoleküle aktiviert, wodurch es zu einer Bindung zwischen den neutrophilen Granulozyten und den Endothelzellen kommt. Die Lebersinusoide verengen sich, folglich wird der Blutfluss verlangsamt und Leukozyten werden akkumuliert. Die Reperfusion des Leberparenchyms wird beeinträchtigt. Die Schädigung der Endothelzellen zieht einen Anstieg von Endothelin nach sich, und somit entsteht ein Ungleichgewicht zwischen der vasokonstriktiven Eigenschaft von Endothelin und der vasodilatativen Eigenschaft von Stickoxid (NO) (Montalvo-Jave et al. 2009; Tapuria et al. 2009).

Reperfusionsschäden sind u.a. auf das freigesetzte Hypoxanthin zurückzuführen. Hypoxanthin entsteht bei der Verstoffwechslung von ATP während der warmen Ischämiezeit. Hierbei ist eine Ansammlung von Hypoxanthin zu verzeichnen, da das ATP aufgrund des Sauerstoffmangels aufgebraucht wird. Während der Reperfusion der Leber mit sauerstoffreichem Blut wird es dann über eine enzymatische Reaktion zu Xanthin oxidiert; es entstehen Harnsäure und freie Radikale, die letztlich zu Schädigungen der Leber führen. Je größer der Schaden während der Ischämiezeit, desto höher das Hypoxanthinniveau und umso mehr freie Radikale entstehen durch die Reperfusion, die wiederum weitere Schäden an der Leber verursachen. Der Hypoxanthinnachweis dient der Feststellung, ob sich die Leber zur Transplantation eignet (Nagayama et al. 2002).

Aufgrund dieser Problematik wurden unterschiedliche Studien durchgeführt, um Ansätze zu finden, wie man auftretenden Schäden entgegenwirken kann: angefangen von Kontrollmöglichkeiten der Organfunktion über genaue Untersuchungen, welche Schäden nach welcher Ischämiezeit auftreten, bis hin zur Untersuchung von unterschiedlichen Konservierungsmöglichkeiten im Vergleich, z.B. „Simple Cold Storage“ (SCS) [Konservierung bei 4 °C] (Vekemans et al. 2008), unterschiedliche Formen von maschineller Organperfusion (Schon et al. 2001) und „Ischemic Preconditioning“ [IPC] (Kannerup et al. 2009). Bei der IPC wird die Leber an die nach der Transplantation und der anschließenden Konservierung auftretenden Ischämie gewöhnt. Dabei wird die Leber schon bei der Entnahme durch das Anhalten des Blutflusses in bestimmten Zeitabständen auf die Ischämie vorbereitet (Montalvo-Jave et al. 2009). Es wurde festgestellt, dass durch IPC die Kupferzellaktivierung und die Endothelschädigung minimiert wird (Montalvo-Jave et al. 2009).

3.10 Ersatzmethoden zum Tierversuch

Die isolierte Organperfusion ist eine Methode, die der Minimierung von Tierversuchen dient. Der Paradigmenwechsel in Bezug auf Tierversuche geht bis nach 1954 zurück und hatte seine Ursprünge u.a. in dem 3R-Konzept („Refine, Reduce, Replace“) von Charles Hume. Die Ausführung erfolgte dann 1959 durch Russel und Burch. Ihr Ziel war es, Tierversuche durch alternative Verfahrensweisen zu ersetzen – und wo dies nicht möglich ist - zumindest die Zahl der Tierversuche zu minimieren bzw. die Versuchsdurchführung zu verbessern. Ziel war es, das Leiden der Tiere zu vermindern (Zurlo et al. 1996).

Um Tierversuche zu reduzieren, werden immer mehr Studien an Zell- und Gewebekulturen sowie mit Hilfe von Simulationsprogrammen am Computer durchgeführt (1996; Fenwick et al.

2009). Der Nachteil der Studien an Zellkulturen und Gewebekulturen ist das Nichtvorhandensein von physiologischen Strukturen und Gegebenheiten des Gesamten innerhalb des Organismus.

Die Methode der isoliert perfundierten Organe hat den Vorteil, dass man damit Untersuchungen der Organfunktion durchführen kann und auch pharmakologische bzw. toxikologische Wirkungen auf das jeweilige Organ analysieren kann. Zusätzlich hat sie den Vorteil, dass das Organ in seiner gesamten Struktur erhalten bleibt und der Gallenabfluss überprüft werden kann. Aus diesem Grund wird diese Methode inzwischen häufiger als Ersatzmethode verwendet (Groneberg et al. 2002; Thewes et al. 2007).

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

4.1.1.1 Herkunft der Tiere

Die Tiere, die für diese Studie verwendet wurden, gehören zur Rasse der „Deutschen Landschweine“ und wurden vom Schweinemastbetrieb „Landwirtschaft Sommerfeld“ bezogen. Es handelte es sich bei allen Versuchstieren um weibliche Tiere. Die Schweine wiesen zum Zeitpunkt der Versuche keine äußerlichen Krankheitsmerkmale auf, waren ca. drei Monate alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von 39 kg +/- 4 kg.

4.1.1.2 Haltung und Fütterung der Tiere

Die Tiere wurden in der tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Charité gehalten. Sie erhielten pro Tag ca. 1.700 g des pelletierten Standardalleinfuttermittels „Mast Solo“ (F G L, 15517 Fürstenwalde) und hatten freien Zugang zum Wasser.

Die Schweine wurden vor der Operation an das Personal und an die Umgebung gewöhnt indem sie jeweils eine Woche vor dem Versuch in das Forschungsgebäude gebracht wurden. Durch dieses Vorgehen sollte der Streß der Schweine vor dem Eingriff reduziert werden.

4.1.1.3 Gruppeneinteilung

Die Einteilung in Gruppen erfolgte randomisiert.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung

Gruppe	Versuchsnummern der untersuchten Lebern	Tiere	Konservierungslösung
A	3, 9, 10, 11, 12, 13	6	Biseko-Lösung
B	1, 2, 5, 7, 8, 14	6	UW-Lösung

4.1.2 Material für Narkose/Operation

Fentanyl-Janssen R , 0,5 mg	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, D
Povidon-Iod	Braunol, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Thiopental-Natrium	Trapanal, 2,5 mg, Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, D
Vicryl 1	Ethicon, Norderstedt, D

4.1.3 Material für die Organkonservierung

0,9 % NaCl-Lösung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Biseko-Konservierungslösung	Fa. Biotest, Dreieich, D
UW-Konservierungslösung	Herstellung im hausinternen Labor Siehe Tabelle 5

4.1.4 Material für die Organperfusion

Tabelle 4: Zusammensetzung des Dialysats

Stammlösung 1

NaCl	321,42	g/5L
KCL	14,91	g/5L
NaHCO ₃	84,01	g/5L
NaH ₂ PO ₄	3	g/5L
Harnstoff	15,02	g/5L
Kreatinin	2,83	g/5L

Stammlösung 2

CaCl ₂ *2H ₂ O	11,03	g/5L
MgCL ₂ *6H ₂ O	10,17	g/5L

500 ml Stammlösung 1 wird in 3 L Aqua dest. gelöst und geschüttelt, anschließend werden dann 500 ml Stammlösung 2 hinzugefügt, die vorher in 2 L Aqua dest. gelöst werden. Dann erfolgen das Schütteln und das Hinzufügen der Glucose.

4.1.5 Material für die Messung der Leberfunktionsparameter

Blutgasanalysegerät	Blutanalysegerät ABLTM505 +OSM3, Fa. Radiometer, Kopenhagen, DK
---------------------	---

4.1.6 Material für die histologischen Präparate

4.1.6.1 Lichtmikroskopie

Entwässerungsautomat Leica TP 1020m	Leica Microsystems, Nussloch GmbH, D
Kühlplatte Leica EG 1130	Leica Microsystems, Nussloch GmbH, D
Lichtmikroskop	Leica Microsystems, Nussloch GmbH, D
Objektträger	Langenbrink, Emmendingen, D
Paraffinbad Leica EG 1120	Leica Microsystems, Nussloch GmbH, D
Rotationsmikrotom RM 2125	Leica Microsystems, Nussloch GmbH, D
Wasserbad Leica HI 1210	Leica Microsystems Nussloch GmbH, D
Alkohol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, D,
Formaldehyd 4 %	Herbeta, Berlin, D
Meyers Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt, D
Paraplast Plus Tissue Embedding Medium	Tyco Healthcare, Mansfield, USA
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, D

4.1.6.2 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskop EM 906	Zeiss, Oberkochen, D
Kupfergrids	Plano, D
Mikrotom Leica RM 2065	Leica Microsystems, Nussloch GmbH, D
Ultracut S, Leica	Leica Microsystems, Nussloch GmbH, D
Epon	Serva GmbH, Heidelberg, D
2,5 % Glutaraldehyd	Serva GmbH, Heidelberg, D
Osmiumtetroxid	Chempur, Karlsruhe, D

Phosphatpuffer	Merck KGaA, Darmstadt, D
Propelinoxid	Serva GmbH, Heidelberg, D
Richardson Methylenblau/Azurblau	Merck KGaA, Darmstadt, D
Richardson Bleicitrat / Bleinitrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Uranylacetat	Serva GmbH, Heidelberg, D

4.2 Methoden

4.2.1 Gruppenbildung und Versuchsablauf

Die Gruppeneinteilung erfolgte aufgrund der verwendeten Konservierungslösung:

Gruppe A	Biseko-Lösung	n = 6
Gruppe B	UW-Lösung	n = 6

Je sechs Tiere bilden eine Gruppe. Die Gruppeneinteilung erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Zur Übersicht dient der in Abb. 4 skizzierte Versuchsablauf mit den Zeitpunkten der Biopsieentnahmen, als auch dem Zeitpunkt der Messungen der Vitalparameter.

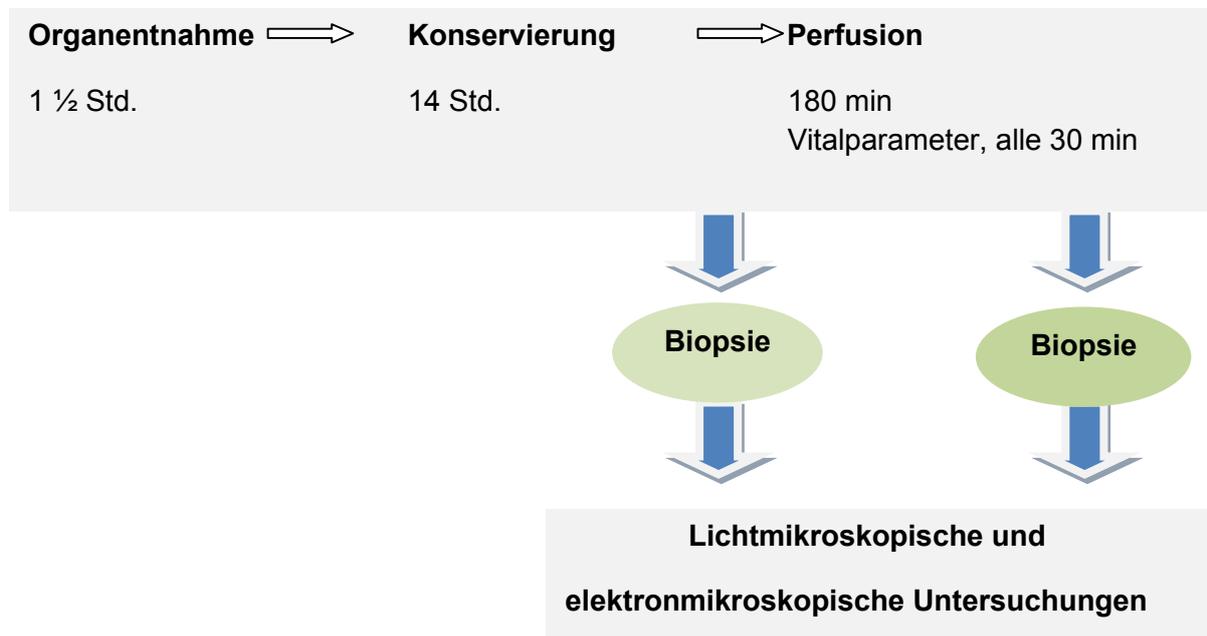


Abb. 4: Die Darstellung gibt die zeitliche Dauer an und stellt die Zeitpunkte der Biopsieentnahme (vor und nach der Perfusion) sowie die durchgeführten Untersuchungen dar.

4.2.2 Operationsvorbereitung

In den zwölf Stunden vor Operationsbeginn erhielten die Versuchstiere nur Wasser und wurden ansonsten nüchtern gehalten. Vor Beginn der Operation wurde jedem Schwein ein intravenöser Zugang in die Ohrrendvene gelegt, über die es zur Sedation 5mg Thiopental-Natrium pro kg erhielt. Die Tiere wurden im Anschluss unter Laryngoskope-Kontrolle intubiert, an ein Beatmungsgerät angeschlossen und mit einem Isofluran-Lachgas-Sauerstoff-Gemisch beatmet. Das Abdomen wurde enthaart und gereinigt und anschließend im Operationssaal mit Povidon-Iod desinfiziert. Der gesamte Körper wurde im Anschluss unter Aussparung der zu operierenden Stelle steril abgedeckt.

Als Analgetikum erhielten die Schweine 20 Minuten vor Operationsbeginn intravenös 5 ml Fentanyl-Dihydrogencitrat. Der Zustand der Schweine wurde während der gesamten Operation über die Parameter Sauerstoffsättigung und die CO₂-Expirationskonzentration kontrolliert. Die Atemfrequenz wurde CO₂-adaptierend bei einem vorgegebenen expiratorischen CO₂-Partialdruck von etwa 39 mm Hg auf 10–12 Atemzüge pro Minute eingestellt.

4.2.3 Organentnahme

Die Explantation der Leber wurde operativ durchgeführt. Außerdem wurden weitere Organe für andere Versuche entnommen. Zu Beginn der Operation wurde die Bauchhöhle mittels eines Medianschnittes vom Sternum bis zum Inguinalbereich geöffnet. Nach Freilegung wurde die Harnblase punktiert und mittels einer Spritze entleert, um mehr Übersicht im Operationsfeld zu gewinnen.

Im zweiten Schritt wurde die Bifurkation der *V. cava caudalis* aufgesucht und oberhalb davon eine Ligatur gesetzt (Vicryl 1, Ethicon). Diese wurde zunächst nicht geschlossen. Auf gleicher Höhe wurde die *Aorta* aufgesucht und mit zwei Ligaturen versehen, welche ebenfalls noch nicht geschlossen wurden.

Im dritten Schritt wurde das *Ligamentum hepatoduodenale* freigelegt, welches den Gallengang, die *A. hepatica* sowie die *Vena portae* enthält. Dieses wurde ligiert und durchtrennt, die Leber nach oben geklappt sowie die *Aorta* infradiaphragmal mit einer Ligatur versehen. Auch diese Ligatur wurde noch nicht geschlossen.

Im vierten Schritt wurden die Ligaturen an der *Aorta* wie folgt verschlossen: Die erste Ligatur an der Bauchaorta wurde verknotet und ein Katheter zur Perfusion in die *Aorta* eingeführt, welcher mit der an der *Aorta* befindlichen zweiten Ligatur fixiert wurde. Die dritte Ligatur, die sich infradiaphragmal befindet, wurde ebenfalls geschlossen. Die Perfusion wurde gestartet.

Im fünften bis achten Schritt wurde das Zwerchfell geöffnet, um die dort befindliche *V. cava* eine Ligatur gesetzt und kaudal davon ein Loch eingeschnitten. Ebenso wurde mit der *Vena cava* in der Nähe der Bifurkation verfahren und kranial ein Loch gesetzt.

Nachdem alle Ligaturen verknotet waren, wurde die Leber ohne jeglichen unnötigen Zug bzw. Druck auf das Organ entnommen. Für die spätere Histologie wurden vor der Perfusion Gewebeproben von der Leber genommen.

Im zweiten Teil der Operation, der sich auf die Nieren bezog, wurden die Nieren herausgenommen. Insgesamt wurden während der Entnahme 3.000 ml Konservierungslösung durch die Leber und durch beide Nieren geleitet.

4.2.4 Organkonservierung

Während der Versuche wurden zwei verschiedene Konservierungslösungen verwendet. Zum einen wurde als Vergleichsstandard die als „Goldstandard“ bekannte und etablierte Konservierungslösung „University of Wisconsin“ (UW) verwendet. Zum anderen wurde die zu testende Lösung, die humane Plasmalösung „Biseko“ der Fa. Biotest, eingesetzt. Die detaillierte Zusammensetzung der im Institut hergestellten UW-Lösung ist in Tabelle 5 nachzulesen.

Um eine sofortige Kühlung der Organe zu erreichen, wurden diese nach der Entnahme in eine Schale mit z.T. gekühlter und z.T. gefrorener 0,9%iger NaCl-Lösung überführt. Dadurch erfuhren die Organe halb schwimmend eine sofortige Oberflächenkühlung und die warme Ischämiezeit wurde auf ein Minimum reduziert. Nach dem Herunterkühlen der Organe wurden diese in entsprechender Konservierungslösung bei 4° C steril konserviert. Die kalte Ischämiezeit betrug 14 Stunden.

Tabelle 5: Zusammensetzung Standard UW-Lösung; pH = 7,4; Osmolalität 320mosmol/l

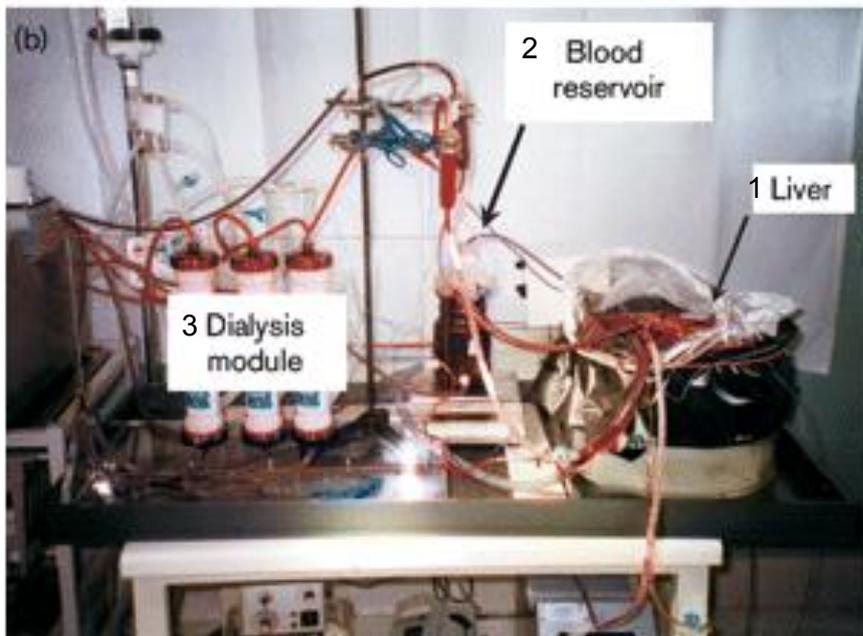
Laktobionat	100 mmol / l
Raffinose	30 mmol / l
K-H ₂ PO ₄ / K-HPO ₄ ⁻	25 mmol / l
Mg-Sulfat	5 mmol / l
Gluthation	3 mmol / l
Adenosin	5 mmol / l
Allopurinol	1 mmol / l
Natrium	29 mmol / l
Kalium	125 mmol / l
HAES	50 g / l

4.2.5 Organperfusion

Die verwendete Leberperfusionsapparatur (Abb. 5), wurde von der AG Grosse-Siestrup im Rahmen eines BMBF-Projektes entwickelt. Sie besteht aus einer Perfusionskammer aus Plexiglas, worin die Leber in einem Isolationsbeutel aufgehängt wird, um sie von dem umgebenden Wasser zu trennen. Die Kammer enthält Ein- und Austrittsanschlüsse für die Schläuche. Weiterhin sind folgende Komponenten der Perfusionsapparatur zu unterscheiden: Blutreservoir (Blutbeutel), Auffangschale für die Galle, zwei Luftfallen, drei Pumpen und ein Flussmesser. Wie in Abb. 5 und Abb. 6 zu sehen ist, besteht die gesamte Perfusionsapparatur aus zwei funktionell unterschiedlichen Kreisläufen: dem Blutkreislauf und dem Dialysatkreislauf. Beide Kreisläufe sind über drei Dialysatoren miteinander verbunden, die für den Gas- und Solutenaustausch verantwortlich sind. Der Austausch erfolgt mittels Gegenstromprinzip.

Zum Blutkreislauf gehören das Organ, der Blutbeutel, Auffangschale für die Galle und zwei Schlauchventilpumpen. Im Dialysatkreislauf befinden sich das Gefäß mit dem Dialysat und ein Wasserbad.

Um die physiologischen Perfusionsverhältnisse an der isolierten Leber möglichst zu gewährleisten, sind Pumpen in die Perfusionsapparatur eingebaut. Sie lassen den arteriellen und gemischtvenösen Zufluss von Blut zur Leber sowie den Abtransport des Blutes aus der Leber zu. Die Pumpen sind flexibel regulierbar, um auch bei schwankenden intrahepatischen Perfusionswiderständen eine gleichmäßige Perfusion des Organs sicherzustellen.



1. Organbehälter mit Leber
2. Blutbeutel
3. Dialysemodule

Abb. 5: Leberperfusionsapparatur mit ihren wesentlichen Bestandteilen⁴

Während der Perfusion wurden in Abständen von 30 min Blutproben entnommen. Die erste Probenentnahme von Blut erfolgte vor Anschluss des Organs an den Kreislauf. Die Perfusionsdauer betrug 180 min.

Weiterhin wurden Perfusionsdruck, der den Blutdruck im Organismus imitieren sollte, und Temperatur während der Perfusion gemessen und festgehalten. Bei steigendem Druck konnte das Wasser in der Perfusionskammer abgelassen werden, bei sinkendem Druck konnte Wasser in die Perfusionskammer gefüllt werden. So konnten Abweichungen vom Normwert reguliert werden.

⁴ Druckgenehmigung erteilt bei PD. Dr. Grosse-Siestrup

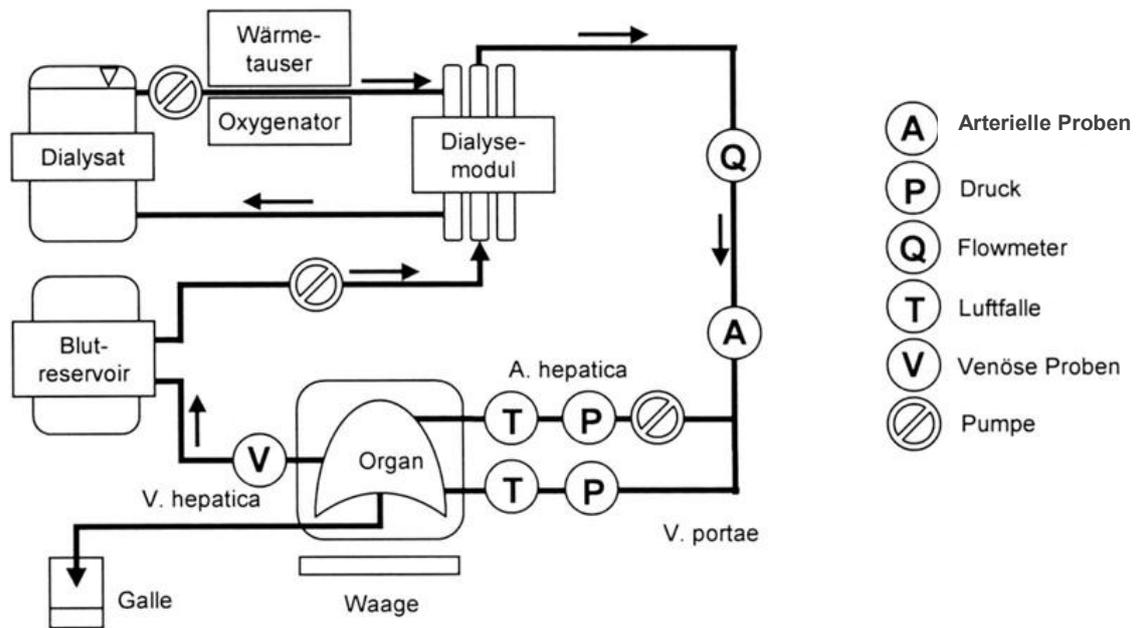


Abb. 6: Graphische Darstellung der Leberperfusionsapparatur⁵
(Dialysemodul nach H. von Bayer)

Das Blutreservoir (2,5 l) enthielt das Eigenblut des Schweins. Das Blut lief auf zwei Wegen durch die Perfusionsapparatur (Abb. 6): zum einen nach dem Dialysemodul über den Durchflussmeter und die „Luftfalle“ zur *V. portae* und in die in der Perfusionskammer liegende Leber. Zum anderen nahm das Blut den arteriellen Weg, floss über den Durchflussmeter und die „Luftfalle“ in die *A. hepatica* und zum Organ. Nach dem Durchfließen der Leber gelangte das Blut über die *V. cava caudalis* zurück zum Blutreservoir, wo über einen eingebauten Drei-Wege-Hahn Blutproben entnommen wurden (Abb. 6).

Das Dialysat, welches in ein Sechslitergefäß eingefüllt wurde, floss nach dem Austreten aus dem Organ durch einen Oxygenator und Wärmeaustauscher. Im Oxygenator (Membranoxygenator) wurde das Dialysat mit Sauerstoff angereichert, gleichzeitig wurde Kohlendioxid entfernt. Durch den Gasfluss (welcher von außen reguliert werden konnte) ließ sich die Sauerstoffsättigung steuern. Mittels des dazu geschalteten Wärmeaustauschers, welcher 37° C warmes Wasser enthielt, wurde über das Gegenstromprinzip das Dialysat auf 37° C angewärmt.

⁵ Druckgenehmigung erteilt von PD Dr. Grosse-Siestrup

Während das Dialysat über die Dialysatoren floss, kam es in indirekten Kontakt mit dem Blut. Aufgrund des Gegenstromprinzips wurden Glucose und Elektrolyte an das Blut abgegeben sowie Abbauprodukte des Blutes an das Dialysat abgegeben. Wegen des hierbei herrschenden Unterdrucks konnte das Dialysat nicht ins Blut übertreten.

4.2.6 Biopsieentnahme

Während des Versuchsablaufs wurden zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten mehrere Biopsien aus den jeweiligen Lebern entnommen. Der erste Zeitpunkt der Probenahme war vor der Reperfusion (= direkt nach der Konservierungszeit) und der zweite nach Ablauf der Perfusion. Die Biopsien für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden nach der Entnahme mit 4 %igem gepuffertem Formaldehyd fixiert. Die Biopsien für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden in 2,5 %ige Glutaraldehyd-Fixierungslösung in Phosphatpuffer gegeben. Bei der Probenentnahme wurde darauf geachtet, dass die Gewebeproben eine gewisse Größe nicht überschritten, v.a. bei den Biopsien, die für die Elektronenmikroskopie verwendet werden sollten. Bedingt durch die langsame Diffusion der Fixierungslösung durch das Gewebe durften die Proben hierfür nicht größer als 1 mm x 1 mm sein.

4.2.7 Leberfunktionsparameter

4.2.7.1 Perfusatuntersuchungen

Die Analysen des Perfusats wurden im Institut für klinische Chemie der Charité, Campus Virchow Klinikum, durchgeführt.

Folgende Parameter wurden gemessen: AST, GLDH, LDH, Laktat, AP, GGT, und Gallenproduktion. Die angegebenen physiologischen Referenzwerte, die als Anhaltspunkt für die untersuchten Parameter dienen, stammen aus dem „Lehrbuch der Schweinekrankheiten“ (Parey Verlag) von Karl-Heinz Waldmann (S.175).

4.2.8 Anfertigen von lichtmikroskopischen Bildern

4.2.8.1 Entwässern und Einbetten

Die Proben, die dem Anfertigen von lichtmikroskopischen Bildern dienten, wurden nach zwölf Stunden Fixation mit Leitungswasser gespült, danach in einen Entwässerungsautomat gegeben und nach folgendem Ablauf in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert:

Alkohol 70% für 1 Std., Alkohol 80% für 1 Std., Alkohol 80% für 2 Std., Alkohol 96% für 2 Std., Alkohol 96% für 2 Std., Alkohol 100% für 2 Std., Alkohol 100% für 3 Std., Xylol für 1 Std., Xylol für 1,5 Std., Paraffin 60° C für 2 Std., Paraffin 60° C für 2 Std.

Nach der Entwässerung wurden die Gewebeproben aus dem Automaten entfernt, zur Paraffineinbettung in Metallgussformen platziert und anschließend mit flüssigem Paraffin aus dem Paraffinbad übergossen. Zur Aushärtung wurden die Paraffinblöcke auf eine Kühlplatte gestellt. Nach Erkalting konnten die Gussformen entfernt werden.

4.2.8.2 Schneiden am Rotationsmikrotom

Aus den Paraffinblöcken wurden am Rotationsmikrotom 4µm dicke Schnitte angefertigt. Um möglichst intaktes Gewebe zu erhalten, wurden die Paraffinblöcke vor jedem Schnittgang auf Eis gekühlt. Die Gewebeschnitte wurden zuerst zum Glätten in warmes Wasser überführt und dann auf Objektträger aufgezogen. Diese wurden nach der Lufttrocknung 48 Std. im Brutschrank bei 37° C aufbewahrt, um die Haftung der Schnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten.

4.2.8.3 Histologische Färbung

Im Anschluss wurden die Paraffinschnitte mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydratisiert. Anschließend wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefertigt. Die Färbung der Präparate erfolgte mit Hämalaun-Eosin. Durch die HE-Färbung werden zum einen die Zellkerne, Bakterien und Verkalkungen blau sichtbar, zum anderen Zytoplasma und Kollagen rot. Die Färbung wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Xylol für 5 min, Xylol für 5 min, 100% Ethanol für 30 sec, 95% Ethanol für 30 sec, 70% Ethanol für 30 sec, entsalztes H₂O für 30 sec, Mayer's Hämatoxylin für 1,5 min, entsalztes H₂O für 30 sec, 70% Ethanol für 30 sec, 95% Ethanol für 30 sec, Eosin für 1,5 min, 95% Ethanol für 30 sec, 95% Ethanol für 30 sec, 100% Ethanol für 30 sec, Xylol für 1,5 min.

4.2.9 Anfertigen von elektronenmikroskopischen Bildern

4.2.9.1 Entwässern und Einbetten

Die Proben, die nach der Biopsie-Entnahme in mit Phosphat gepuffertem 2,5 %igem Glutaraldehyd fixiert wurden, wurden für die Anfertigung von elektronenmikroskopischen Schnitten wie folgt weiter verarbeitet: Die Biopsien wurden zunächst 72 Std. bei 5° C im Kühlschranks gelagert. Die Gewebestücke wurden dann 3 x 10 min in Puffer gewaschen und anschließend 2 Std. in 2 %iges Osmiumtetroxid (OSO₄) zum Nachfixieren gegeben. Das OSO₄ dient der Fixierung der Lipide im Gewebe. Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert:

Alkohol 70% für 10 min, Alkohol 80% für 10 min, Alkohol 96% für 10 min, Alkohol 100% für 10 min.

Im Anschluss erfolgte eine 2 x 15 min dauernde Nachbehandlung in Propelinoxid als Intermedium, dann eine „Infiltration“ der Gewebeproben in einer Mischung von Epon und Propylenoxid mit aufsteigenden Epon-Konzentrationen:

Epon / Propylenoxid (1:2) für 1 Std., Epon / Propylenoxid (1:1) für 1 Std., Epon / Propylenoxid (2:1) für 1 Std.

Abschließend wurden die Gewebeproben in mit frischem, reinem Epon gefüllte Kapseln eingebettet und 48 Std. bei 60° C auspolymerisiert.

4.2.9.2 Schneiden am Rotationsmikrotom

Die Hartplastikblöcke wurden aus den Kapseln entfernt. Mithilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2065) wurden dann aus den Hartplastikblöcken 0,5 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Diese wurden vor der Weiterverarbeitung unter dem Lichtmikroskop untersucht und die gewünschten Areale ausgewählt.

4.2.9.3 Histologische Färbung

Die Semidünnschnitte wurden in Richardson Methylenblau gefärbt. Anschließend wurden mit einem Leica-Ultracut S 70 nm dünne Ultradünnschnitte angefertigt. Diese Ultradünnschnitte wurden auf Kupfergrids aufgezogen und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Im Anschluss konnten die Schnitte mit einem Elektronenmikroskop untersucht und bewertet werden.

4.2.10 Auswertung der histologischen Schnitte

Die histologischen Schnitte wurden untersucht und der Grad der Schädigung festgestellt. Zur Einteilung der Schädigungen in geringgradig, mittelgradig und hochgradig wurde ein Auswertungsbogen verwendet, in welchem die Befunde wie Zellschwellungen, Sinusdilataion, Trabekelbrüche, Einblutungen, Endothelschäden, und Nekrosen festgehalten wurden. Diese Befunde geben Auskunft über das Ausmaß der Zell- und Gewebeschädigung und den damit verbundenen Funktionsverlust des Organs.

Bei den elektronmikroskopischen Untersuchungen wurde die Intaktheit von Zellstrukturen (v.a. Zellkern), Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum bewertet. Zudem wurden die Gallengänge untersucht.

4.2.11 Statistische Methode

Die durch die Entnahme von Perfusat ermittelten hämatologischen und klinisch-chemischen Parameter wurden mit dem Statistik-Programm SPSS ausgewertet. Die Werte sind als Median mit 25–75-Perzentilen angegeben. Die tabellarische Errechnung erfolgte mit SPSS Statistik Version 18.

Zur Bewertung der Unterschiede zweier unabhängiger Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Abhängige Proben wurden mit dem Wilcoxon Test bewertet.

Der Mann-Whitney Test ist ein parameterfreier statistischer Test. Dieser Test (auch als „U-Test“ bezeichnet) ist ein Homogenitätstest. Mit dem Test wird überprüft, ob sich zwei Gruppen signifikant bezüglich ihrer Ränge (oder auch ihres Medians) unterscheiden. Anders als parametrische statistische Tests machen sie keine Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung der untersuchten Variablen und sind deswegen auch dann anwendbar, wenn die bei vielen statistischen Aussagen notwendigen Verteilungsvoraussetzungen nicht erfüllt sind (Tiede 2000; Corder 2009). Der Wilcoxon-Test betrachtet bei zwei abhängige Proben nicht nur die Richtung der Unterschiede zwischen den Wertepaaren, sondern auch die Höhe der Abweichung (Tiede 2000; Corder 2009).

Ein Testresultat wird als signifikant definiert, falls der p-Wert $<0,05$ ist. Tendenzen werden bei p-Werten $<0,1$ angegeben. Die Werte mit Signifikanz werden mit einem Sternchen [*] gekennzeichnet, die Werte, die auf eine Tendenz verweisen, mit [#].

Die Ergebnisse, die ebenfalls mit SPSS generiert wurden, wurden graphisch als Box-Plot dargestellt. Die hervorgehobene „Box“ stellt 50% der Werte dar. Die Horizontale Linie innerhalb der Box zeigt den Median Wert an. Dieser teilt die Werte so, dass sich je 50% darunter und darüber befinden. Die T-förmigen Linien ober- und unterhalb der Boxen werden als „Whiskers“ bezeichnet. Die „Whiskers“ sind nicht länger als maximal 1,5 Boxenlängen. Die Enden der Whiskers zeigen den Minimal (unter der Box) und Maximalwert (über der Box) innerhalb dieser Länge auf (Burkschat et al. 2004).

Werte im Bereich (zwischen 1,5 – 3 Boxenlängen) werden als Ausreisser definiert und speziell gekennzeichnet (\diamond). Extremwerte (Werte die ausserhalb dieses Bereiches von 3 Boxenlängen liegen) werden mit (\circ) gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

Es wurden 12 isolierte Hämoperfusionen von Schweineorganen nach zwei verschiedenen Konservierungsmethoden durchgeführt. Während der 180-minütigen Perfusion wurde einerseits die Enzymaktivität innerhalb der einzelnen Versuchsgruppe im zeitlichen Verlauf beurteilt (mittels Wilcoxon), andererseits die Enzymaktivität der zwei Versuchsgruppen verglichen (mittels Mann-Whitney-U).

Im Text werden Werte $p < 0,1$ mit „tendenziell“ und Werte $p < 0,05$ mit „signifikant“ umschrieben.

5.1 Perfusatuntersuchung

Während der dreistündigen Perfusion wurden Leberfunktionsparameter im Serum untersucht. Daneben wurde die Gallenproduktion gemessen, da diese durch die Konservierung mit anschließender Perfusion negativ beeinflusst werden kann. Im Einzelnen wurden folgende Werte gemessen: AST, GLDH, LDH, Laktat, AP, GGT und Gallenproduktion. Es wurde ein Vergleich der jeweiligen einzelnen Werte zum Zeitpunkt nach der 14-stündigen Kaltischämie durchgeführt, sowie der Veränderungen im Verlauf der Perfusion. Zudem erfolgte ein Vergleich zwischen den mit UW-Lösung und den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern. Dieser Wert wurde untersucht um einen Vergleich der Beeinträchtigung der Leberfunktion durchführen zu können. Im Folgenden werden die Ergebnisse in einer vergleichenden Betrachtung aufgeführt.

5.1.1 AST

Zu Beginn der Perfusionsphase mit Biseko-Lösung lag der AST-Wert mit 380 U/l höher als zu jedem untersuchten Zeitpunkt mit der UW-Lösung. Im Zeitverlauf stieg er noch weiter an (Tabelle 7 im Anhang).

Bei der durchgeführten Kaltkonservierung mit der Standard UW-Lösung lag der AST-Wert zu Beginn der Perfusion (0 min) unter dem von der mit Biseko-Lösung konservierten Lebern. Insgesamt stieg der AST-Wert im Verlauf der 180-minütigen Perfusion weiter an bis auf durchschnittlich 327,5 U/l gemessen am Ende des Untersuchungszeitraumes (Tabelle 8 im Anhang).

Zum Zeitpunkt 0 min (Beginn der Perfusion) lag der AST-Wert bei Verwendung der Biseko-Lösung höher (380,5 U/l) als bei Einsatz der UW-Lösung (154 U/l). Hier ergab sich ein Wert von $p = 0,063$.

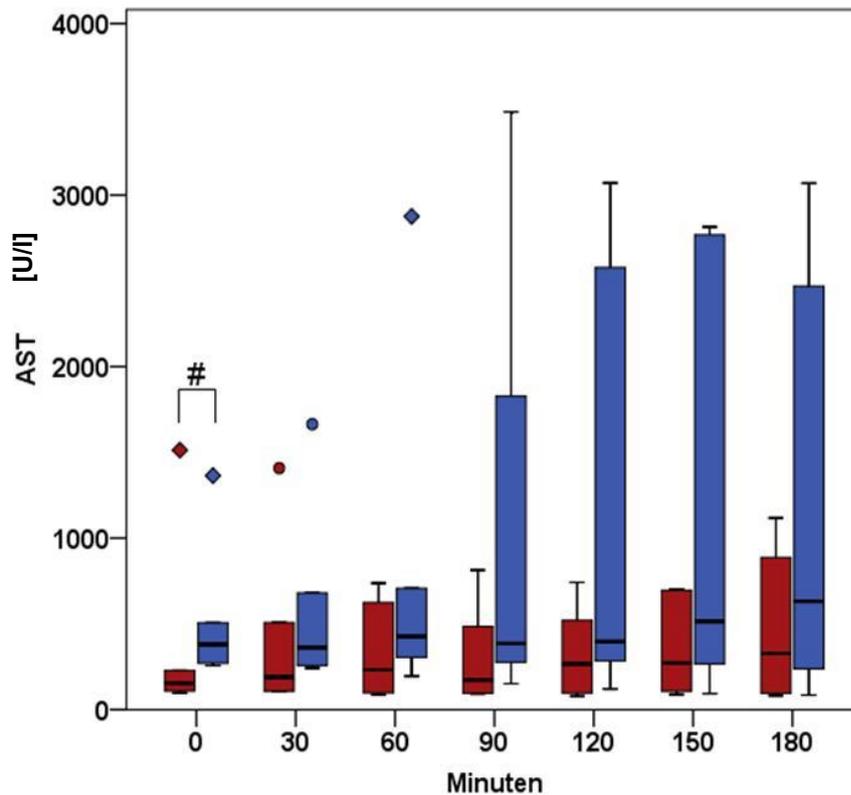


Abb. 7: Vergleichende Darstellung der AST-Aktivität im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) – blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; $p < 0.1$], Ausreisser [◇], Extremwerte [◻]

In Abb. 7 sind die Werte (Median) während der 180-minütigen Reperfusion aufgezeigt. Der Messbeginn erfolgte nach der 14 stündigen Kaltischämie und Konservierung in Biseko- bzw. UW-Lösung.

5.1.2 GLDH

Zu Beginn der Perfusionsphase mit der Biseko-Lösung lag der GLDH Wert höher als bei Verwendung der UW-Lösung. Auch kam es hier zu einem Anstieg innerhalb der ersten 30 Minuten der Perfusion. Allerdings war auch ein Ansteigen und Abfallen des Enzymwertes zu beobachten (Tabelle 9 im Anhang).

Nach der Kaltkonservierung mit UW-Lösung lag der GLDH Wert zu Beginn der Perfusion (0 min) bei 1,6 U/l. Insgesamt stieg der GLDH Wert innerhalb der ersten 30 min dreifach, um dann im Verlauf der restlichen 180-minütigen Perfusion wieder zu sinken (Tabelle 10 im Anhang).

Im Verlauf zwischen dem Zeitpunkt 0 (Beginn der Perfusion) und der Messung beim Zeitpunkt 30 min kam es bei den Lebern, die mit UW-Lösung konserviert wurden, zu einer tendenziellen Erhöhung. Hier ergab sich der Wert $p = 0,063$.

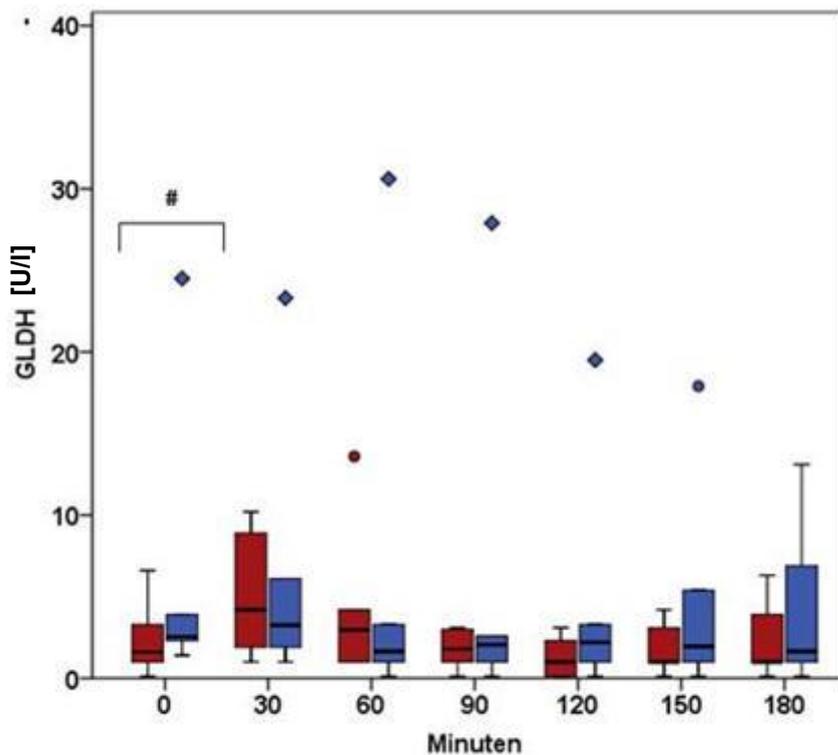


Abb. 8 Vergleichende Darstellung der GLDH-Aktivität im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; $n = 6$ Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; $p < 0.1$], Ausreisser [◇], Extremwerte [◻]

In Abb. 8 sind die Werte (Median) während der 180-minütigen Reperfusion aufgezeigt. Der Messbeginn erfolgte nach der 14 stündigen Kaltischämie und Konservierung in Biseko- bzw. UW-Lösung.

5.1.3 LDH

Zu Beginn der Perfusionsphase war bei den in Biseko-Lösung konservierten Lebern der LDH-Wert mit 525 U/l noch höher als bei den mit UW-Lösung konservierten Lebern. Auch hier sank der Wert im Laufe der Perfusion ab, um am Ende wieder anzusteigen. Der am Ende der Perfusion gemessene Wert lag noch höher als der am Anfang gemessene Wert (Tabelle 11 im Anhang).

Nach der Kaltkonservierung mit UW-Lösung war die Enzymaktivität in der Untersuchung zu Beginn der Perfusion ($t = 0$ min) hoch. Während der Perfusion war ein anfängliches Sinken der Enzymaktivität zu beobachten. Ab dem Zeitpunkt $t = 90$ min kam es wieder zu einem Anstieg. Der zuletzt gemessene Wert bei $t = 180$ min lag mit 419 U/l unter den von mit Biseko-Lösung konservierten Lebern.

Während der Perfusion lag der gemessene Enzymwert von den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern, zu keinem Zeitpunkt, unter dem von mit UW-Lösung konservierten Lebern.

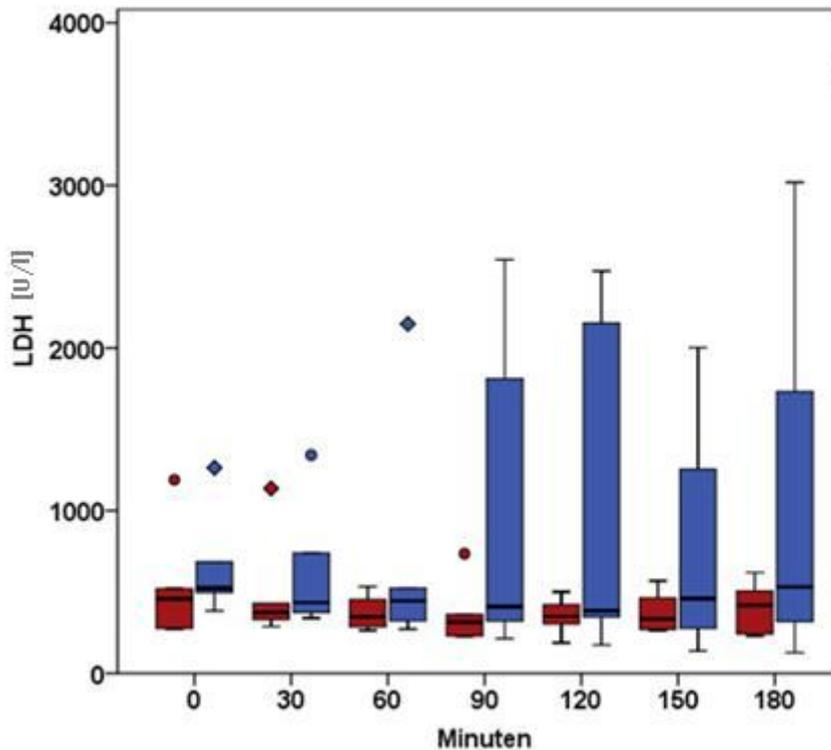


Abb. 9: Vergleichende Darstellung der LDH-Aktivität im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe; Ausreisser [\diamond], Extremwerte [\square]

In Abb. 9 sind die Werte (Median) während der 180-minütigen Reperfusion aufgezeigt. Der Messbeginn erfolgte nach der 14 stündigen Kaltischämie und Konservierung in Biseko- bzw. UW-Lösung.

5.1.4 Laktat

Zu Beginn der Perfusionsphase nach der Konservierung mit Biseko-Lösung lag der Laktatwert bei $t = 30$ min mit 1,35 U/l nur bei rund 30 % des Wertes der mit UW-Lösung konservierten Lebern. Im zeitlichen Verlauf der Perfusion stieg der Laktatwert an, blieb aber nach Beendigung der Perfusion trotzdem unter dem Wert der Lebern, die mit UW-Lösung konserviert wurden (Tabelle 13 im Anhang).

In der Untersuchung zeigte der Laktatwert nach der Kaltkonservierung mit UW-Lösung, abgesehen von einem kurzfristigen Abfallen der Enzymaktivität bei $t = 60$ um über die Hälfte zum gemessenen Wert bei $t = 30$, eine Tendenz zum Steigen (Tabelle 14 im Anhang).

Zum Zeitpunkt 30 min lag der Laktatwert bei Verwendung der Biseko-Lösung signifikant niedriger als bei Einsatz der UW-Lösung ($p=0,016$). Im Verlauf zwischen 30 min und 60 min kam es bei den Lebern, die mit Biseko Lösung konserviert wurden, zu einer tendenziellen Erhöhung ($p=0,063$).

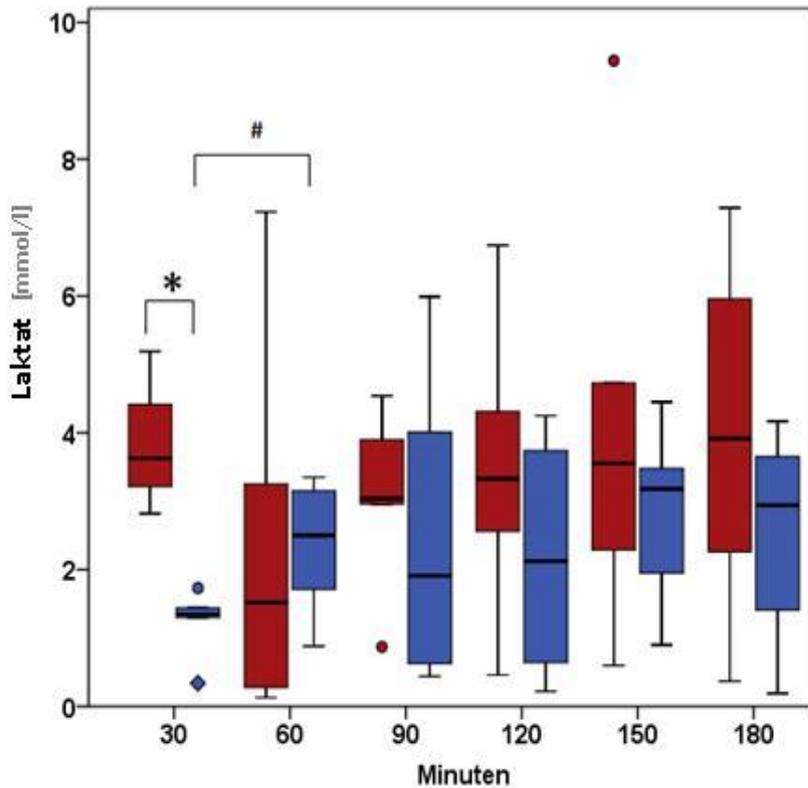


Abb. 10: Vergleichende Darstellung der Laktatkonzentrationen im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; $n = 6$ Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; $p < 0.1$], Signifikanzen [#; $p < 0.05$], Ausreisser [\diamond], Extremwerte [\circ]

In Abb. 10 sind die Werte (Median) während der 180-minütigen Reperfusion aufgezeigt. Der Abstand der Probenentnahmen betrug 30 min. Der Messbeginn erfolgte nach der 14 stündigen Kaltischämie und Konservierung in Biseko bzw. UW-Lösung.

5.1.5 AP

Zu Beginn der Perfusionsphase mit Biseko-Lösung lag der AP-Wert höher als bei den in UW-Lösung konservierten Lebern, sank aber im zeitlichen Verlauf der Perfusion schneller ab und erreichte am Ende des Untersuchungszeitraums mit den gemessenen 13 U/l sogar nur 58% der gemessenen Enzymaktivität bei den mit UW konservierten Lebern (Tabelle 15 im Anhang).

In der hier durchgeführten Studie lag der AP-Wert nach der Kaltkonservierung mit UW-Lösung zu Beginn der Perfusion mit 38,5 U/l 14% unter dem bei den mit Biseko konservierten Lebern gemessenen Wert. Insgesamt sank er im Verlauf der 180-minütigen Perfusion weiter ab. Der am Ende des Untersuchungszeitraumes gemessene Wert von 22,5 U/l war aber höher als der zuletzt gemessene Wert von den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern.

Im zeitlichen Verlauf der Perfusion (0 min–180 min) war bei den in UW-Lösung konservierten Lebern ein deutliches Absinken zu verzeichnen ($p = 0,063$). Bei den in Biseko-Lösung konservierten Lebern war im zeitlichen Verlauf der Perfusion ebenso eine signifikante Reduzierung zu konstatieren ($p = 0,031$). Weiterhin gab es bei den in Biseko-Lösung konservierten Lebern einen signifikanten Rückgang innerhalb der ersten 30 min (0 min–30 min) ($p = 0,031$), dann zwischen 60 und 90 min ($p = 0,031$), bei 90–120 min ($p=0,031$) und bei 150–180 min ($p = 0,031$).

Zum Zeitpunkt 120 min lag der AP-Wert bei Verwendung von den mit UW-Lösung konservierten Lebern tendenziell höher als bei den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern ($p=0,065$). Gleiches gilt für den Zeitpunkt 180 min ($p = 0,061$).

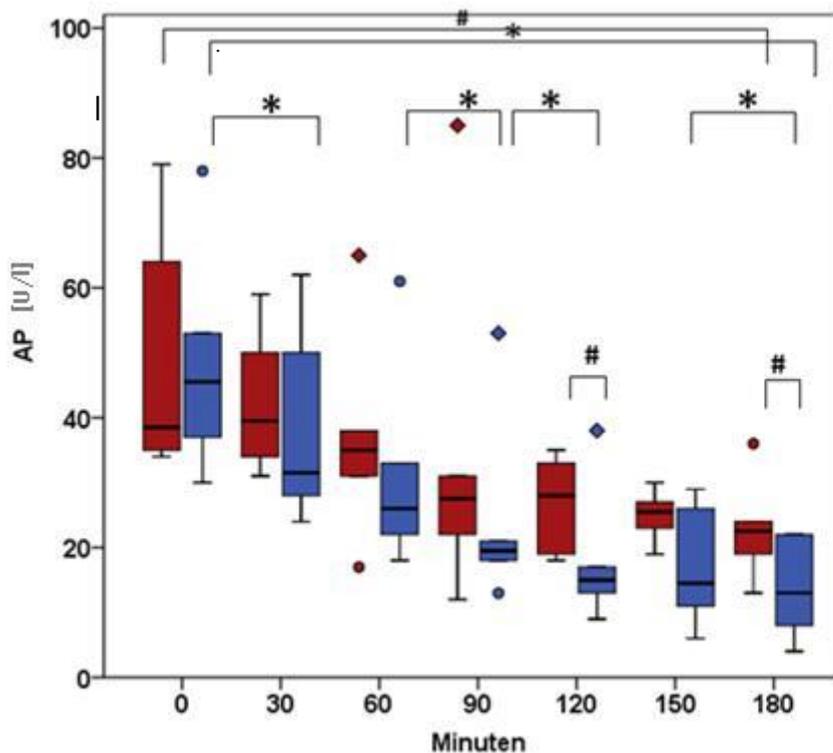


Abb. 11: Vergleichende Darstellung der AP-Aktivitäten im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; p<0.1], Signifikanzen [#; p<0.05], Ausreisser [◇], Extremwerte [○]

In Abb. 11 sind die Werte (Median) während der 180-minütigen Reperfusion aufgezeigt. Der Abstand der Probenentnahmen beträgt 30 min. Der Messbeginn erfolgte nach der 14 stündigen Kaltischämie und Konservierung in Biseko bzw. UW-Lösung.

5.1.6 GGT

Zu Beginn der Perfusionsphase mit den in Biseko-Lösung konservierten Lebern lag der GGT-Wert bei 41 U/l, nahm aber im Laufe der 180-minütigen Perfusion um die Hälfte ab (Tabelle 17 im Anhang).

Nach der Kaltkonservierung mit UW-Lösung lag der GGT-Wert in der Untersuchung zu Beginn der Perfusion (0 min) in einem vergleichbar messbaren Bereich zu den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern. Im Laufe der Perfusion sank die Enzymaktivität um fast um ein Drittel ab (Tabelle 18 im Anhang).

Während der gesamten Perfusion (0 min–180 min) sank die Enzymaktivität bei den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern signifikant ab ($p = 0,031$). Während der ersten 30 min der Perfusion (0 min–30 min) kam es zu einem tendenziellen Absinken der Enzymaktivität bei den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern ($p = 0,063$), ebenso im Zeitintervall zwischen 90 und 120 min ($p = 0,063$).

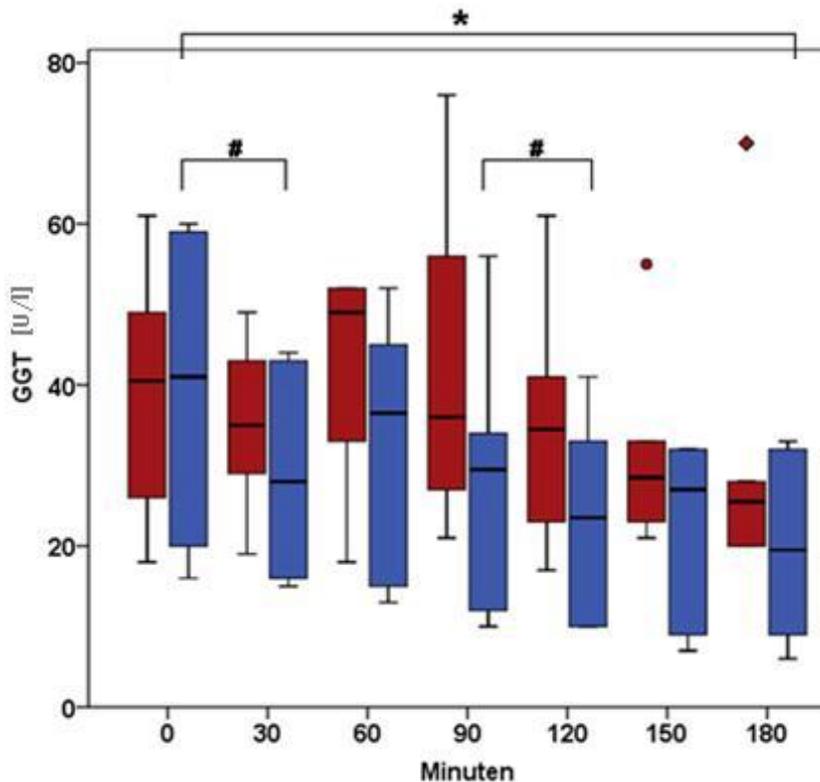


Abb. 12: Vergleichende Darstellung der GGT-Aktivität im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; $n = 6$ Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; $p < 0.1$], Signifikanzen [#; $p < 0.05$], Ausreisser [◇], Extremwerte [◻]

In Abb. 12 sind die Werte (Median) während der 180-minütigen Reperfusion aufgezeigt. Der Abstand der Probenentnahmen betrug 30 min. Der Messbeginn erfolgte nach der 14 stündigen Kaltischämie und Konservierung in Biseko bzw. UW-Lösung.

5.1.7 Gallenproduktion

Bei der Messung der Gallenproduktion nach 60-minütiger Perfusion zeigen die Analysen, dass mehr Galle pro Gramm Leber in den mit UW-Lösung konservierten Lebern produziert wurde.

Zum Zeitpunkt 60 min lag die Gallenproduktion bei den mit UW-Lösung konservierten Lebern deutlich höher als bei jenen, die mit Biseko-Lösung konserviert wurden ($p=0,052$) (Tabelle 19 und Tabelle 20 im Anhang).

5.2 Lichtmikroskopie

Von den Biopsien wurden lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Da nur eine begrenzte Anzahl von histologischen Präparaten zur Verfügung stand, erfolgte eine qualitative Auswertung der Schnitte und ein Vergleich zwischen den Versuchsgruppen A (Biseko-Lösung) und B (UW-Lösung). Es galt zu beurteilen, inwiefern sich das Lebergewebe durch die Konservierung mit anschließender Perfusion verändert. Vor allem war wichtig zu untersuchen, ob die neue Konservierungslösung Biseko zu einer Verminderung der Ischämie- und Reperfusionsschäden führt.

Sowohl nach der 14 stündigen Kaltkonservierung (= vor der Reperfusion (V)) als auch nach Abschluss der Reperfusion (N) wurde jeweils eine Biopsieprobe untersucht. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, um etwaige Unterschiede zwischen Schäden, die durch die Kaltischämie, sowie Schäden, die erst nach der Reperfusion entstehen, analysieren zu können.

Als Beurteilungskriterien wurden folgende Punkte ausgewählt (Tabelle 6): hepatozelluläre Schwellungen, Sinusdilataion, Trabekelbrüche, Einblutungen, Endothelschäden und Nekroseumfang. Dies sind mögliche Formen der Zell- und Gewebeschädigungen, die die Funktionstüchtigkeit der Leber beeinflussen. Sie treten u.a. infolge einer zu langen Ischämiezeit und im Gefolge von bei der Reperfusion entstehenden Störungen in der Mikrozirkulation auf.

Aufgeführt sind exemplarische Abbildungen zu dem Vergleich des Ausmaßes der Gewebeschädigung direkt nach der Konservierung sowie nach der Perfusion, jeweils für beide Konservierungslösungen.

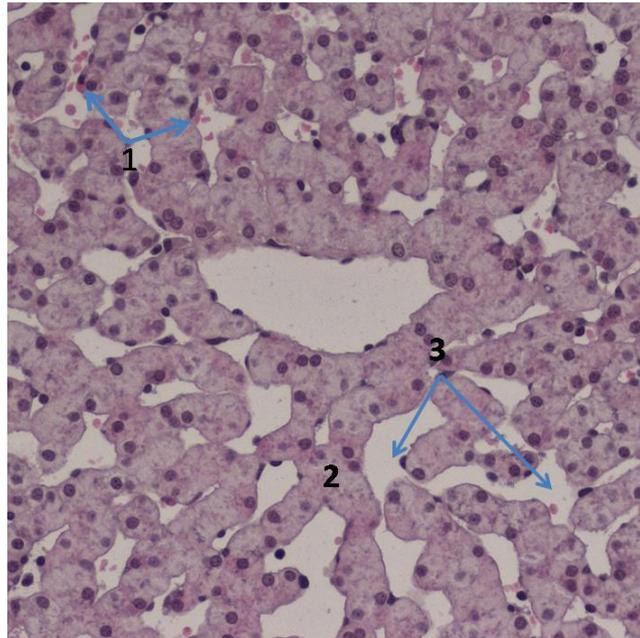


Abb. 13: Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, **1:** Blutzellen, **2:** Leberzelltrabekel, **3:** Sinusdilatation (OV x400)

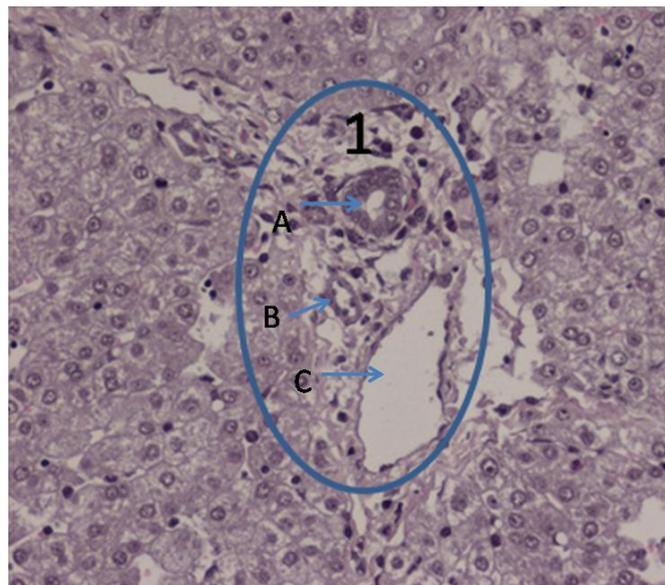


Abb. 14: Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, **1:** Glisson-Trias mit **A:** Gallengang, **B:** Arterie, **C:** Vene (OV x400)

Abb. 13 zeigt die Erythrozyten (1) im geweiteten Sinusraum (3), welches auf Einblutungen hinweist. Die Struktur der Leberzelltrabekel ist intakt (2). In Abb. 14 ist das Glisson-Trias mit unbeschädigten Gallengang, Arterie und Vene erkennbar.

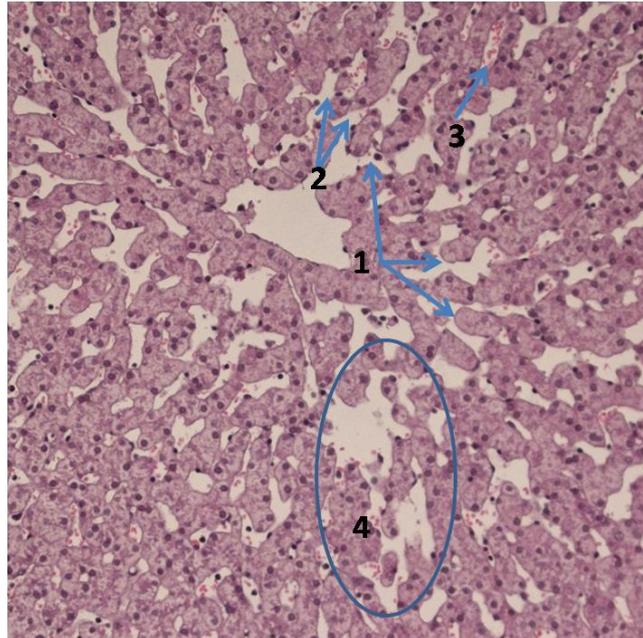


Abb. 15: Leber 11, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, **1:** Trabekelbrüche, **2:** Sinusdilatation, **3:** Erythrozyten, **4:** Zellnekrosen (OV x200)

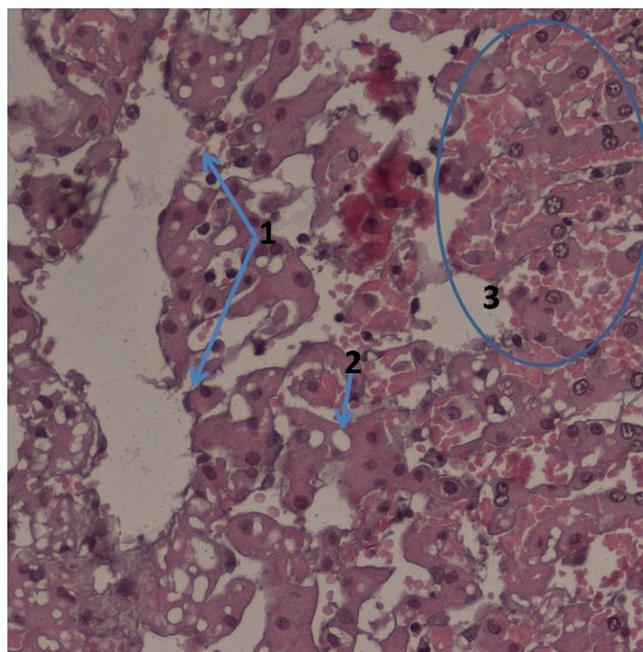


Abb. 16: Leber 11, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, **1:** Endothelschäden, **2:** Lipidtropfen, **3:** Einblutungen (OV x400)

Abb. 15 zeigt umschriebene Trabekelbrüche (1) und sinusoidale Dilatation (2). Es sind sowohl Blutstauungen (3) im Lebersinus erkennbar, als auch Gruppenzellnekrosen (4). Abb. 16 macht deutlich, dass die Zentralvenole Endothelschäden (1) aufweist und dass es zu

Zellverfettungen (2) gekommen ist. Es sind Zellauflösungen mit Blutseen (Erythrostase) (3) zu erkennen.

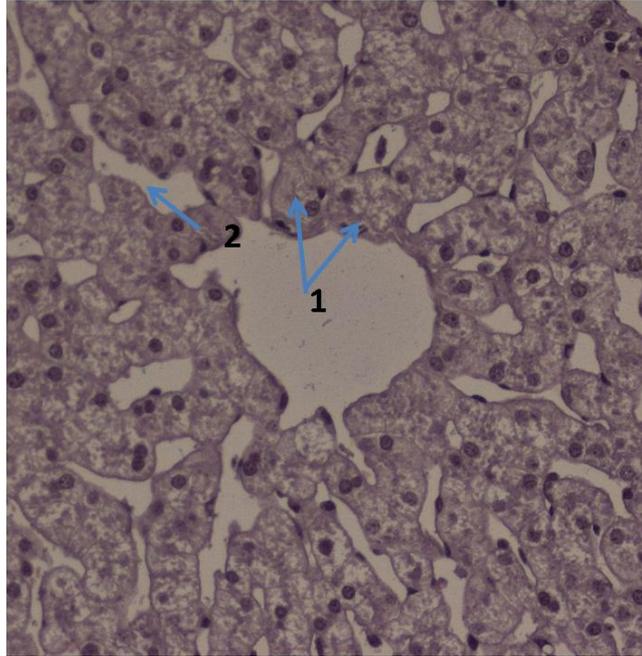


Abb. 17: Leber 1, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit UW-Lösung, 1: Zellschwellungen, 2: Sinusdilataion (OV x 400)

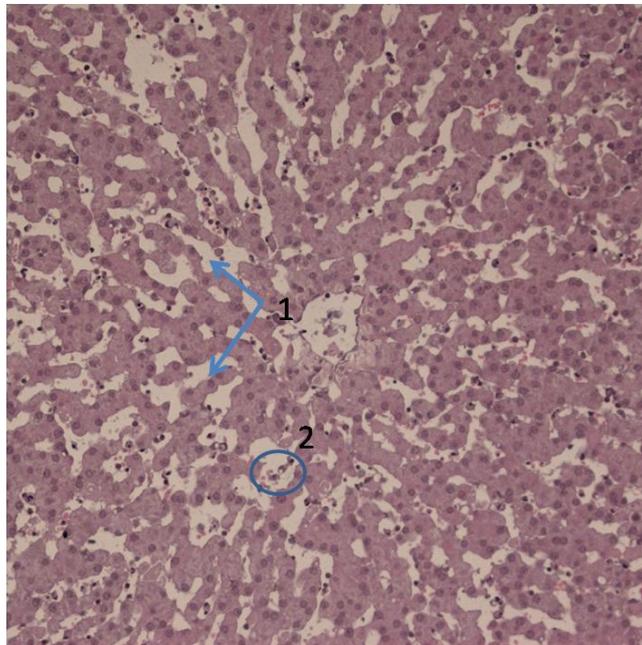


Abb. 18: Leber 1, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit UW-Lösung, 1: Sinusdilataion, 2: Zelltrümmer (OV x200)

In Abb. 17 sind ebenfalls starke Zellschwellungen erkennbar (1), allerdings ist hier auch eine Erweiterung der Sinusoide feststellbar (2). In Abb. 18 sind die Lebersinusoide ebenfalls dilatiert (1) und intrasinusoidale Zelltrümmer (2) nachweisbar.

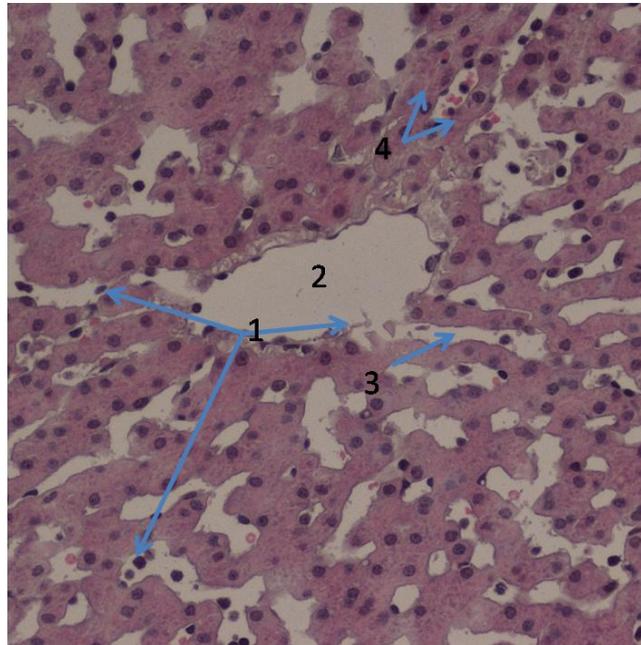


Abb. 19: Leber 14, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit UW-Lösung, 1: Zelltrümmer, 2: Vene, 3: Sinus, 4: Leberzelltrabekel (OV x400)

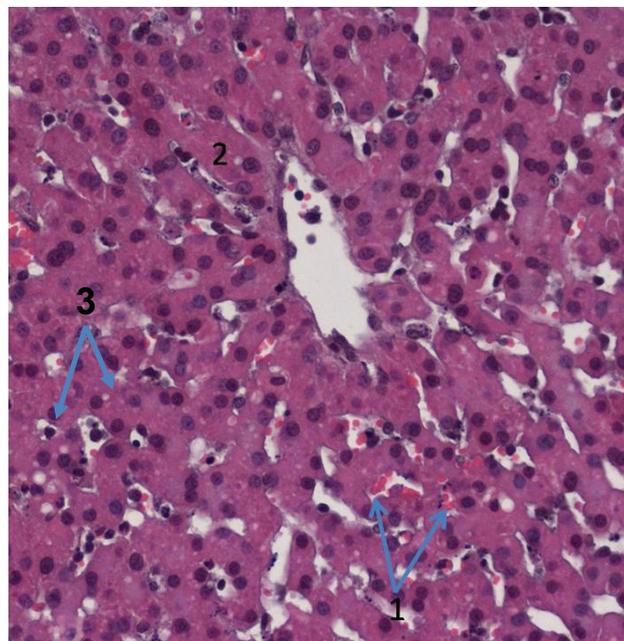


Abb. 20: Leber 14, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit UW-Lösung, 1: Blutzellen, 2: Leberzelltrabekel, 3: Zellschwellungen (OV x400)

In Abb. 19 sind abgestoßene Epithelien und Residuen von Einzelzelluntergängen erkennbar (1). Eine intakte Vene (2), erhaltene Leberzelltrabekel (4) und ein perivenulärer Sinus (3) sind ebenfalls vorhanden. In Abb. 20 sind Leberzellschwellungen (3) erkennbar sowie Einblutungen in den Lebersinusoiden (1). Die Struktur der Leberzelltrabekel ist intakt (2).

Im Zuge der Auswertung der Bilder kann festgestellt werden, dass beim Vergleich zwischen Ischämieschäden und Reperfusionsschäden Letztere deutlich überwiegen. Der Vergleich zwischen den Auswirkungen der Anwendung beider Konservierungslösungen lässt erkennen, dass die Ischämieschäden bei beiden Konservierungslösungen nahe zu identisch sind. Jedoch sind geringfügig mehr Reperfusionsschäden bei der Anwendung der UW-Lösung vorhanden.

Tabelle 6: Darstellung der untersuchten Merkmale der lichtmikroskopischen Bilder von Gruppe A (konserviert mit Biseko-Lösung) und Gruppe B (konserviert mit UW-Lösung). Untersuchte Zeitpunkte sind „Vor Perfusion“ und „Nach Perfusion“. Auswertung erfolgt nach der Einteilung: Geringgradig + (0-25%), mittelgradig ++ (25-50%) und hochgradig +++(>50%)

Gruppe A (Biseko)	Zeitpunkt der Untersuchung	Zellschwellungen	Sinus- dilatation	Trabekelbrüche	Einblutungen	Endothelschäden	Zelltrümmer	Nekrosen
Leber 3	Vor Perfusion	+	++	+	+		+	
	Nach Perfusion	++			+			
Leber 11	Vor Perfusion		++	++	+			+
	Nach Perfusion		++	++	+++	++	++	++
Gruppe B (UW)	Zeitpunkt der Untersuchung	Zellschwellungen	Sinus- dilatation	Trabekelbrüche	Einblutungen	Endothelschäden	Zelltrümmer	Nekrosen
Leber 1:	Vor Perfusion	+++	++			+		
	Nach Perfusion	+	++	++	++	++	++	+
Leber 14	Vor Perfusion	++	++	+	+	+	+	
	Nach Perfusion	++	+	+	++	+		

5.3 Elektronenmikroskopie

Für eine zusätzliche Analyse der pathologischen Veränderungen wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Diese wurden zusätzlich zu den lichtmikroskopischen Aufnahmen hinzugezogen, da bestimmte Zellstrukturen bzw. deren Veränderungen – z.B. der Mitochondrien, des Zellkerns und des Endoplasmatischen Retikulums – nur hierdurch beurteilt werden können. Die gewählten Zeitpunkte lagen direkt nach der 14 stündigen Kaltkonservierung und nach Abschluss der Reperfusion.

Bei der Untersuchung wurde geprüft, ob die Zellstrukturen der Leberzellen erhalten sind oder nicht.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen vor der Reperfusion und nach der Reperfusion zeigen gegebenenfalls die Abweichungen der ischämischen Schäden von den Reperfusionsschäden. Zudem wurden jeweils von den mit UW-Lösung und den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern Aufnahmen erstellt, um auch hier eine Differenzierung zwischen den Konservierungslösungen bzw. deren Konservierungseigenschaften vornehmen zu können.

Anhand der Untersuchung der folgenden Zellmerkmale wurde eine Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder durchgeführt:

- Aussehen des Zellkerns
- Aussehen der Mitochondrien
- Aussehen des Endoplasmatisches Reticulum
- Vorhandensein von Fetteinlagerungen

Anzeichen für Ischämie- und Reperfusionsschäden sind: Ein piknotischer Zellkern, geschwollene Mitochondrien, Ablösung der Cristae, aufgelöstes Endoplasmatisches Reticulum und Vakuolisierung.

Unten aufgeführt sind jeweils exemplarische Bilder jenes Lebergewebes, welches in Biseko- bzw. UW-Lösung konserviert wurde. Die gewählten Zeitpunkte lagen hier direkt nach der Kaltkonservierung und nach der Reperfusion.

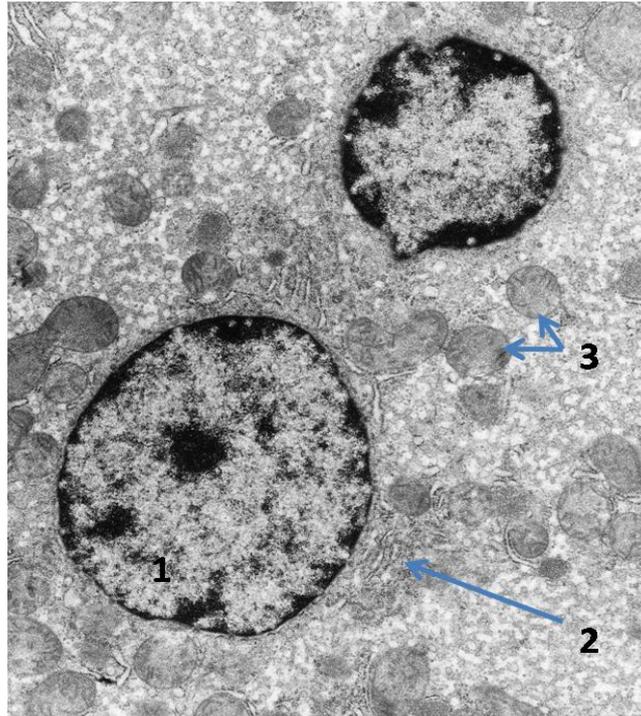


Abb. 21: Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, 1: Zellkern, 2: Endoplasmatisches Reticulum (ER), 3: Mitochondrien (OV x5274)

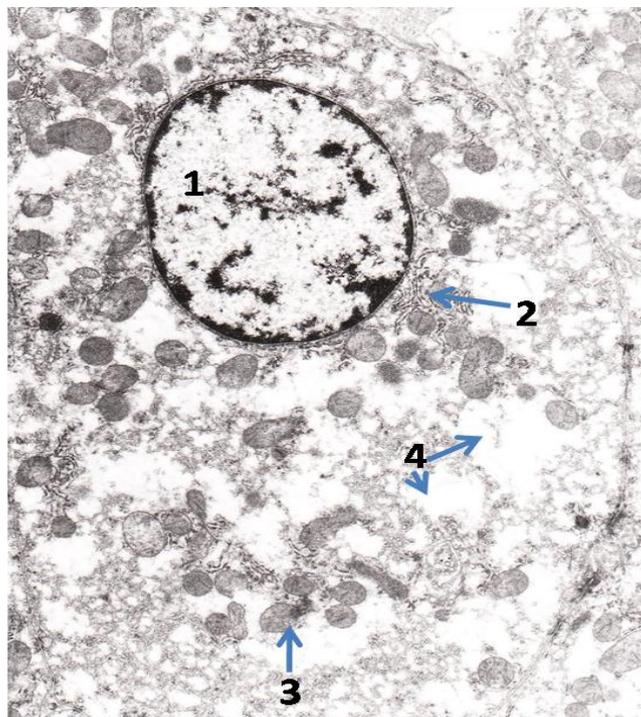


Abb. 22: Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, 1: Zellkern, 2: Endoplasmatisches Reticulum, 3: Mitochondrien, 4: Wassereinlagerungen (OV x 4136)

Abb. 21 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Leberbiopsie, konserviert in Biseko-Lösung. Der Zeitpunkt der Aufnahme liegt direkt nach der 14-stündigen Kaltkonservierung. Es ist ein intakter runder Kern (nicht pyknotisch) zu sehen (1). Die Leberstruktur ist noch klar erkennbar und das Endoplasmatische Reticulum (2) ist sichtbar. Die Mitochondrien sind hydropisch (3).

Die elektronenmikroskopische Aufnahme in Abb. 22 zeigt eine Leberbiopsie, die mit Biseko-Lösung konserviert wurde. Der Zeitpunkt der Aufnahme lag nach der Kaltkonservierung mit anschließender Reperfusion. Nach der Perfusion mit Biseko-Lösung ist die Leberstruktur deutlich gestört, der Kern aber nach wie vor intakt (1); das Endoplasmatische Reticulum (2) ist nicht unversehrt darstellbar. Die Mitochondrien (3) sind blasig und es sind Wassereinlagerungen (4) erkennbar.

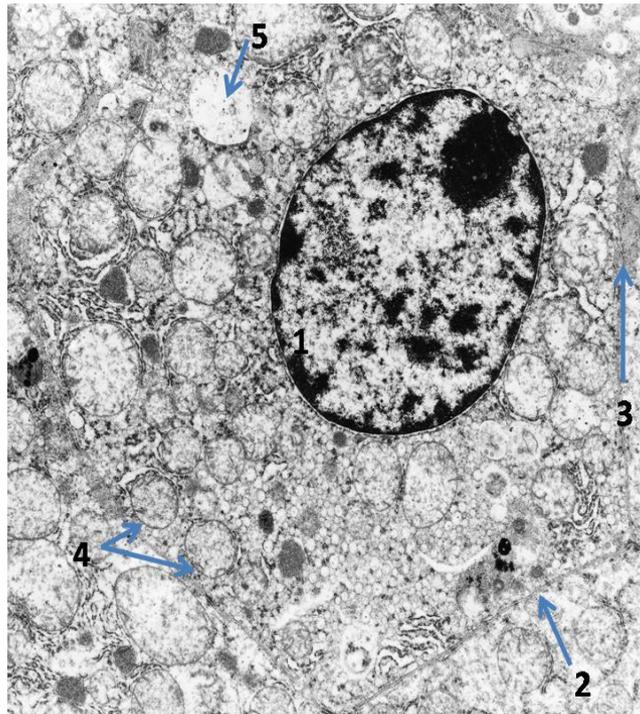


Abb. 23: Leber 11, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, 1: Zellkern, 2: Zellrand, 3: Gallenkapillare, 4: Mitochondrien 5: ER, (OV x 5011)

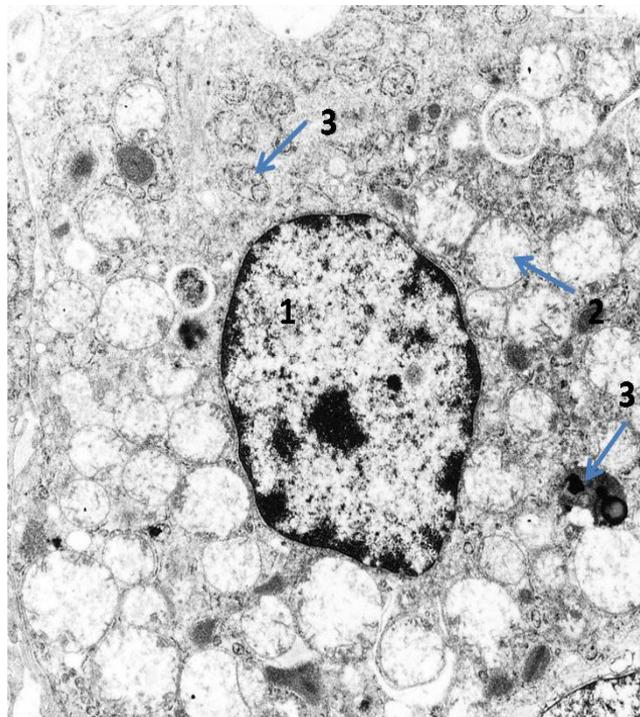


Abb. 24: Leber 11, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, 1: Zellkern, 2: Mitochondrien, 3: Zelleinschlüsse, (OV x4031)

Die elektronenmikroskopische Aufnahme in Abb. 23 präsentiert eine Leberbiopsie, die ebenfalls mit Biseko-Lösung konserviert wurde. Der Zeitpunkt der Aufnahme war nach der Kaltkonservierung. Der Zellkern ist noch intakt (1). Der Zellrand (2) ist ebenfalls nicht geschädigt und eine Gallenkapillare (3) ist erkennbar. Es sind geschwollene Mitochondrien (4) vorhanden. Eine teilweise Auflösung des Endoplasmatischen Reticulums (5) ist sichtbar.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme der Leber in Abb. 24 zeigt eine Leberbiopsie nach 14 stündiger Kaltischämiezeit und Reperfusion. Die Konservierung wurde mit Biseko-Lösung durchgeführt. Es ist ebenfalls eine Lyse des Karyoplasmas zu sehen. Der Kern wirkt ansatzweise pyknotisch (1) und die Mitochondrien sind geschwollen (2). Unterschiedliche Zelleinschlüsse sind vorhanden (3).

Bei dieser Vergleichsprobe sind keine deutlichen Unterschiede zwischen reinen ischämischen Schäden und Perfusionsschäden zu erkennen. Es ist aber deutlich erkennbar, dass das Lebergewebe durch die Konservierung und Perfusion in seiner Zellstruktur geschädigt wurde.

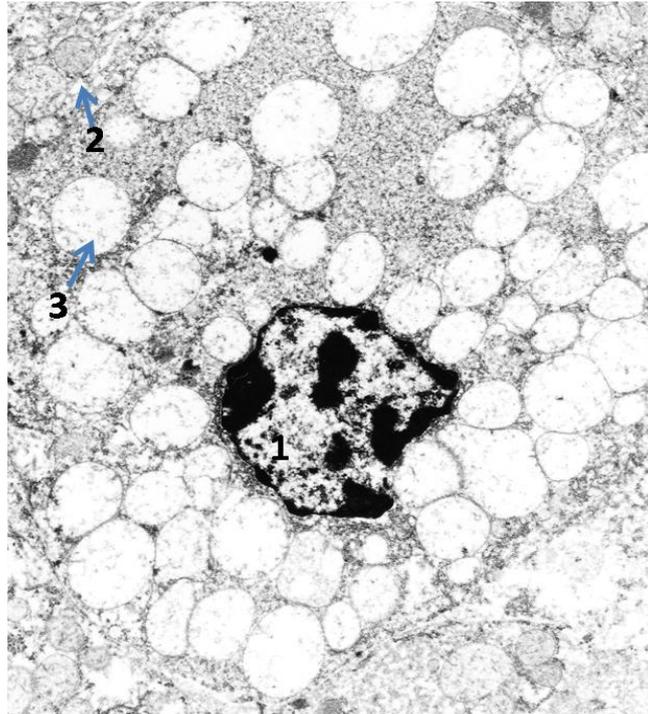


Abb. 25: Leber 1, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit UW-Lösung, 1: Zellkern, 2: Mitochondrien, 3: ER, (OV x 3597)

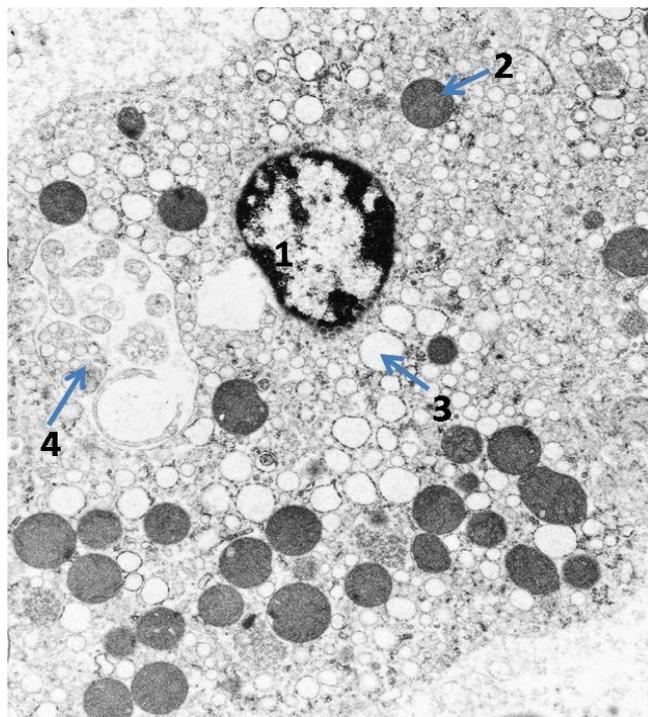


Abb. 26: Leber 1, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit UW-Lösung, 1: Zellkern, 2: Mitochondrien, 3: ER, 4: Zelleinschlüsse, (OV x 6000)

In Abb. 25 ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Leber zu sehen. Die Biopsieentnahme erfolgte nach 14 stündiger Kaltischämiezeit und Konservierung mit UW-Lösung.

Es ist deutlich ein pyknotischer Kern (1) zu sehen. Zudem sind die Mitochondrien (2) geschwollen. Vakuolisierte Anschnitte des ER (3) sind sichtbar.

Zum Vergleich bietet Abb. 26 eine elektronenmikroskopische Aufnahme einer Leberbiopsie nach 14 stündiger Kaltischämie mit anschließender Reperfusion. Die Konservierung erfolgte ebenfalls mit UW-Lösung.

Die Aufnahme gibt ein pyknotischen Kern (1), geschwollene Mitochondrien (2) und ebenfalls vakuolisiertes Endoplasmatisches Reticulum (3) wieder. Zudem ist ein multivesikulärer Einschluss (4) vorhanden.

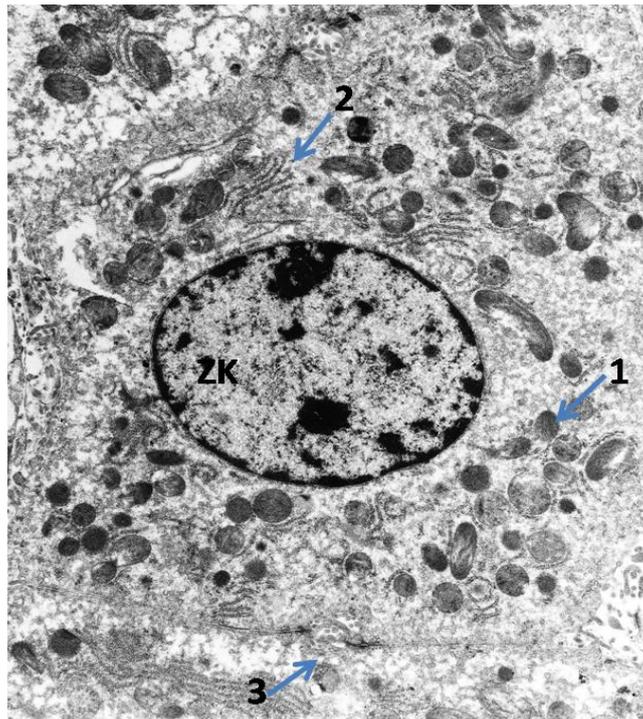


Abb. 27: Leber 14, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit UW-Lösung, 1: Mitochondrien, 2: ER, 3: Gallenkapillare, (OV x 4768)

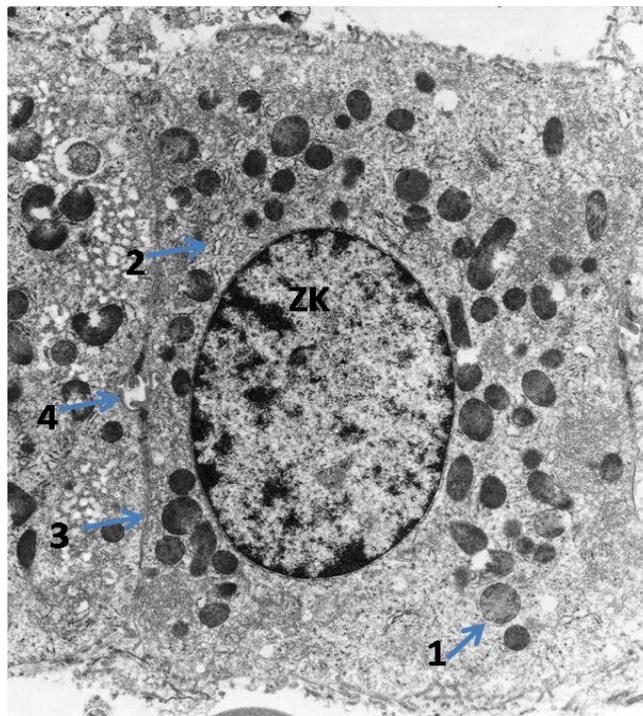


Abb. 28: Leber 14, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit UW-Lösung, 1: Mitochondrien, 2: ER 3: Zellgrenzen, 4: Gallenkapillare, (OV x 4136)

Abb. 27 zeigt intaktes Lebergewebe. Diese Aufnahme stammt ebenfalls von einer Leberbiopsie, die mit UW-Lösung konserviert wurde. Zeitpunkt der Aufnahme war nach der 14 stündigen Kaltkonservierung. Die Mitochondrien (1) sind nicht geschädigt. Das Endoplasmatische Reticulum (2) ist unauffällig. Des Weiteren ist die gesamte Zellstruktur gut erhalten, IR-Schäden sind nicht erkennbar. Ein weiteres Merkmal für das intakte Lebergewebe ist die abgebildete Gallenkapillare (3).

Die Abb. 28 zeigt ebenfalls eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Leber, die mit UW-Lösung konserviert wurde. Die Aufnahme wurde nach der Konservierung mit anschließender Reperfusion aufgenommen. Hier ist ebenfalls erkennbar, dass die Mitochondrien (1) unauffällig sind. Das Endoplasmatische Reticulum (2) weist keine Strukturverluste auf. Die Zellgrenzen sind erkennbar (3), die Gallenkapillare (4) ist intakt.

Grundsätzlich ist anhand dieses Beispiels keine Differenzierung zwischen ischämie- und Reperfusionsschäden möglich.

Es ist keine eindeutige Verbesserung des Gewebes nach der Reperfusion im Vergleich zum Zeitpunkt nach der Konservierung im Bild nachzuweisen. Dies gilt sowohl für die Leberbiopsien, welche mit UW-Lösung konserviert wurden, als auch für jene, die mit Biseko-Lösung konserviert wurden.

6 Diskussion

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte sind unterschiedliche Operationsverfahren für Lebertransplantationen (SLT, RSLT, LDLT) entwickelt worden. Auch die Operationstechniken wurden optimiert, um z.B. den Blutverlust zu minimieren und OP-Zeiten zu verkürzen. Obwohl bei der Konservierung, sowohl hinsichtlich der Konservierungszeit als auch der Konservierungslösung, große Fortschritte gemacht wurden, stellt die Konservierung immer noch ein Problem bei der Lebertransplantation dar. Nach wie vor ist die Konservierungszeit begrenzt. Darüber hinaus stellen die Ischämie- und Reperfusionsschäden auch weiterhin ein Problem dar. Eine Optimierung der Konservierungslösung sollte dazu führen, die bestehenden Konservierungszeiten zu verlängern und die durch die Konservierung entstehenden Schäden zu minimieren.

In dieser Studie galt es, die Biseko-Lösung (Gruppe A) zu testen und sowohl eine Blutanalyse durchzuführen, als auch lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch Biopsien zu untersuchen. Als Vergleichsmaßstab wurde die als „Goldstandard“ geltende UW-Lösung (Gruppe B) eingesetzt.

Während der Studie gab es unterschiedliche Untersuchungszeitpunkte und -rhythmen: direkt nach der 14 stündigen Konservierungszeit, um die ischämiebedingten Schäden zu analysieren, sowie alle 30 min während der dreistündigen maschinellen Reperfusion (Simulation der Wiederdurchblutung im Organismus nach der Transplantation), um die Funktionstüchtigkeit der Leber zu überprüfen.

6.1 Perfusat Untersuchungsergebnisse

Ein Abweichen der Werte von den physiologischen Referenzwerten, gemessen im Blut von lebenden Schweinen ist durchaus zu erwarten, wenn das Gewebe einer Ischämiezeit unterliegt. Aufgrund der fehlenden Durchblutung des Gewebes kommt es nicht nur zu einem Sauerstoffmangel, sondern auch zur fehlenden Bereitstellung anderer Substrate sowie zu fehlendem Abtransport von gewebeschädlichen Stoffen. Die Leber stellt sich auf eine anaerobe Stoffwechselsituation um, wodurch es zu einer vermehrten Laktatbildung kommt. Die Folgen sind Zellpermeabilitätsstörungen, und im weiteren Verlauf eine erhöhte Freisetzung von Enzymen, z.B. AST. Bei fortschreitender Zellschädigung kommt es zu einer Schädigung der Mitochondrien und in der Folge wiederum zu einer vermehrten Freisetzung von z.B. GLDH. Die Zellen sind aber in der Lage, diese Schädigungen einige Zeit ohne Funktionsverlust zu tolerieren.

6.1.1 AST

AST ist ein Enzymwert, der aussagekräftig ist, bezogen auf den hepatozellulären Schaden, welcher während der Konservierung verursacht wird. Dieser Wert verändert sich schon bei leichten Gewebeschädigungen. Je höher der nekrotische Schaden der Leberzellen ist, desto höher ist der AST-Wert (Bao et al. 1994; Rauen et al. 1994).

Direkt nach der Konservierung (Zeitpunkt $t = 0$ bei der Perfusion) war der AST-Wert bei den Lebern, die in Biseko-Lösung konserviert wurden, mehr als doppelt so hoch wie bei jenen, die in UW-Lösung konserviert wurden. Während der gesamten Perfusionszeit blieben die AST-Werte in Gruppe A fast doppelt so hoch wie die in Gruppe B. Hinzu kommt, dass die AST-Werte im gesamten Perfusionsverlauf bei beiden Gruppen einen kontinuierlichen Anstieg zeigten.

Da der AST-Wert ein etablierter Marker für ischämische Schäden an Zellen ist und zudem ein Zusammenhang zwischen der erhöhten Enzymaktivität und dem Ausmaß der Schädigung besteht (Iu et al. 1987), deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass infolge der langen Konservierungszeit eine Schädigung an den Zellmembranen der Leberzellen entstanden ist. Der Anstieg ist zugleich ein Hinweis auf durch die Reperfusion weiter entstehende zelluläre Schäden.

Allerdings wurde in einer klinischen Studie von Katz et al. deutlich, dass auch Lebern mit hohen AST-Werten erfolgreich transplantiert werden können (Katz et al. 1994).

Zum analysierten AST-Wert ist festzuhalten, dass weder die mit Biseko-Lösung noch die mit UW-Lösung konservierten Lebern unversehrte Leberzellen zeigten. In beiden Fällen waren die Ischämieschäden nicht zu verhindern.

6.1.2 GLDH

GLDH ist ein leberspezifisches Enzym, das allerdings erst bei erheblichen Gewebeschädigungen messbar sein sollte, da es sich in den Mitochondrien befindet.

Zu jedem Zeitpunkt während der Reperfusion war die gemessene Enzymaktivität relativ niedrig, und zwar sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B. Die beobachteten Werte waren aber auch in diesem Fall in den meisten Messungen in Gruppe A höher. Zudem war in Gruppe B festzustellen, dass sich der GLDH-Wert ab 120 min auf einen konstanten Wert einpendelte.

Aus der gemessenen GLDH-Aktivität lässt sich schließen, dass es während der Konservierung zu keinen Zellnekrosen kam. Da der GLDH-Wert während der Reperfusion nicht erheblich stieg, kann vermutet werden, dass die Leber durch die Ischämie nicht irreparabel geschädigt wurde bzw. zumindest keine weiteren Reperfusionsschäden hinzugekommen sind.

Allerdings bleibt auch hier die Biseko-Lösung hinter der UW-Lösung zurück. Vor allem scheint sich die Leber beim Einsatz der UW-Lösung zu regenerieren.

6.1.3 LDH und Laktat

Bei der Betrachtung der LDH-Werte erscheint es sinnvoll auch die Laktatwerte einzubeziehen. Bei Betrachtung beider Werte könnte der Schluss gezogen werden, dass das Ergebnis des Laktatwertes verfälscht ist, da es aufgrund der hohen LDH-Aktivität zu höheren Laktatwerten gekommen ist, weil das aufgrund der Hypoxie entstandene Laktat durch LDH erhöht wird, da Pyruvat mittels LDH zu Laktat umgewandelt wird. Die LDH-Aktivität in Gruppe B war höher, die Laktatwerte waren niedriger als in Gruppe A.

LDH

Hypoxieauswirkungen, Membranschäden und eine anaerobe Stoffwechsellage können über den LDH-Wert der Leber überprüft werden. Die in den Versuchen gemessene LDH-Aktivität war in beiden Gruppen sehr hoch.

Sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B kam es im Laufe der Perfusion zuerst zu einem Abfallen der Enzymkonzentration, am Ende wieder zu einem Anstieg. Im Fall von mit Biseko-Lösung konservierten Lebern überstieg der $t = 180$ Wert sogar den Anfangswert.

Laktat

Laktat erhöht sich, wenn der Stoffwechsel in einem anaeroben Zustand ist. Daher ist zu vermuten, dass der Laktatwert zum Zeitpunkt 0 (unmittelbar nach der Kaltischämie) relativ hoch sein müsste, sich aber im Verlauf der Perfusion verringert, da durch die Zuführung von Blut dem Organ Sauerstoff zugeführt wird und diese sich wieder auf eine aerobe Stoffwechsellage umstellt.

Der gemessene Wert bei $t = 30$ und auch bei den anderen Probenahmen deuten darauf hin, dass entweder die anaerobe Stoffwechsellage keine große Auswirkung hatte oder sehr zügig (innerhalb von 30 min) mit Beginn der Reperfusion aufgehoben wurde. Der Laktatwert in Gruppe B war aber zu jedem Zeitpunkt (bis auf $t = 60$) höher als der in Gruppe A, sodass

hier ein Parameter zu finden ist, bei dem die Biseko-Lösung gegenüber der UW-Lösung einen Vorteil aufweist. Außerdem liegt in Gruppe A zum Zeitpunkt $t = 30$ ein signifikant niedrigerer Wert im Vergleich zu den in Gruppe B ($p = 0,016$) vor.

Zusätzlich ist zu erkennen, dass es im Laufe der Perfusion in Gruppe B im Gegensatz zum erwarteten Ergebnis zu einem Anstieg der Laktatwerte kam. Die Laktatwerte in Gruppe A sind niedriger; wobei aber keine Verlaufstendenz ersichtlich ist. Auch hier kam es im Zeitablauf zwischen 30 min und 60 min bei den in Biseko-Lösung konservierten Lebern zu einer deutlichen Erhöhung ($p = 0,063$) des Laktatwertes.

Bei den gemessenen Laktatwerten konnten bessere Ergebnisse (niedrigere Werte) bei den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern beobachtet werden. Dies könnte eventuell ein Hinweis darauf sein, dass es zu einem geringeren anaeroben Stoffwechsel gekommen ist. Im Gegensatz hierzu stehen die hohen LDH-Werte. LDH ist ein Schlüsselenzym, welches Pyruvat zu Laktat umwandelt. Eigentlich würde man bei den beobachteten hohen LDH-Werten einen höheren Laktatwert vermuten. Jedoch deuten hohe LDH Werte meist auch auf eine Membranschädigung hin, welche u.a. zu den Ischämieschäden zählt (Cassidy et al. 1994; Kotoh et al. 2008).

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte wiederum sein, dass es durch die Reperfusion zu weiteren Schädigungen gekommen ist und dass die Zellen sich tendenziell wieder auf einen anaeroben Stoffwechsel umstellen. Um hier eine endgültige Aussage treffen zu können, wäre es sinnvoll, den Verlauf nach längerer Reperfusion zu beobachten, um ein Ansteigen oder Absinken der LDH-Konzentration zu beurteilen, v.a. da LDH normalerweise schnell abgebaut wird. Weiterhin wäre es somit auch möglich, die Geschwindigkeit des LDH-Abbaus zu beurteilen. Wie eine Studie belegt, ist die Überlebensrate umso schlechter, je langsamer das LDH abgebaut wird (Cassidy et al. 1994; Kotoh et al. 2008)

Zu dem ist aus der Literatur bekannt, dass, abgesehen von einer initialen Abstoßungsreaktion nach der Transplantation, oft auch Funktionsmängel erst nach einiger Zeit auftreten (Ploeg et al. 1993).

6.1.4 AP, GGT und Gallenproduktion

Da die Zellen der Gallengänge bei der Transplantation durch eintretende Ischämie bzw. Reperfusion geschädigt werden, erscheint es wichtig, die Enzymwerte, die auch als Parameter für die Funktionstüchtigkeit der Gallenproduktion bzw. des Gallenabflusses gelten, zu überprüfen.

AP

Die Alkalische Phosphatase (AP) ist ein Enzym, welches sich u.a in den Gallengangsepithelien befindet und daher auf intakte Leberstrukturen angewiesen ist. Eine Erhöhung des AP-Wertes kann ein Hinweis auf Störungen in der Gallenproduktion bzw. Gallenabfluss sein (Bowers et al. 1987; Almada et al. 2003). Allerdings ist die Aussagekraft nur im Zusammenhang mit GGT vorhanden (Neumeister 2009).

Während der Perfusionszeit kam es in unserer Versuchsanordnung zwischen den AP-Ausgangswert ($t=0$) und dem zu letzt gemessen Wert ($t=180$) sogar zu einem weiteren Absinken der Enzymaktivität. Überraschend ist, dass es während der Perfusion in Gruppe A zu einer Differenz in Höhe von -71% zwischen dem Anfangswert zum Zeitpunkt $t = 0$ und dem Endwert zum Zeitpunkt $t = 180$ kam; in Gruppe B kam es zu einer Abweichung in Höhe von -42 %.

Der geringe Ausgangswert ist evtl. auf den hypothermiebedingten verminderten Zellstoffwechsel während der Kaltlagerung (Konservierung) zurückzuführen. Da es aber im Laufe der Perfusion nicht zu einer Erholung kam, bleibt die Überlegung, ob es infolge der Konservierung zu einer Zellschädigung gekommen ist, bei der kein neues AP produziert werden konnte. Die vorhandene AP wurde verstoffwechselt. Es gibt allerdings auch diverse Studien, in deren Verlauf ein niedriger AP-Wert gemessen wurde, beispielsweise bei Bypass-Operationen, Atemstillstand und Hypothermie während herzchirurgischen Eingriffen. Die Hypothermie könnte also auch hier zur Erklärung der niedrigeren Werte dienen, zudem die Vorgehensweise bei der Transplantation, da, wie auch bei der Bypass-Operation, hier die Gefäße abgebunden und somit auch die Durchblutung des Organs unterbunden wird. Weiterhin wurden niedrige AP-Werte oft im Zusammenhang mit niedrigeren Magnesium- und Phosphatwerten gefunden (Lum et al. 1989).

GGT

Gamma-Glutamyl-Transferase ist ein membranständiges Enzym, welches ein Anzeichen für eine Schädigung der Leberzellen sein kann. Es wird als sensitiver Parameter, jedoch nicht als sehr spezifischer Parameter, betrachtet. Eine bessere Aussagekraft ist nur im Zusammenhang mit den AP-Werten möglich (Aragon et al. 2010).

GGT ist ein wichtiger Parameter, da es nach Lebertransplantationen oft zu biliären Komplikationen kommt, welche im schlimmsten Fall zu einem Versagen des Spenderorgans führen (Graziadei et al. 2006).

In dem durchgeführten Versuch, sank die GGT-Aktivität sukzessive im Verlauf der Perfusion ab. In Gruppe A kam es zu einem Absinken um 52%. In Gruppe B kam es zu einem Absinken um 37%.

Dies könnte ebenfalls damit zusammenhängen, dass es während der Reperfusion zu keiner weiteren Produktion von GGT gekommen ist. Auch hier wäre eine weitere Verlaufsuntersuchung der Reperfusion sinnvoll, um zu prüfen, ob die GGT-Konzentration weiter sinkt. Bei den gemessenen Werten, lag die Aktivität der GGT am Anfang der Reperfusion (UW-Lösung: 41,4 U/l; Bisek-Lösung 40 U/l), als auch am Ende der Reperfusion ((UW-Lösung: 25,5 U/l; Biseko-Lösung 19,5 U/l) in einem Bereich, der auch im Blut von lebenden Schweinen gemessen werden kann.

Hier ist anzumerken, dass die gemessenen gallenspezifischen Enzymwerte von AP und GGT in Gruppe A im Vergleich zu Gruppe B grundsätzlich niedriger waren. Dies lässt eine geringere Schädigung an den Gallengangszellen vermuten. Es kann aber auch ein Hinweis dafür sein, dass zwar die Biseko-Lösung im Rahmen der Leberkonservierung hinsichtlich der den Gallengang auskleidenden Zellen durchaus protektive Eigenschaften besitzt, diese dann jedoch nicht mehr während der Reperfusion aufrechterhalten werden können. So lässt sich folgern, dass bei der Betrachtung der Perfusatuntersuchungsergebnisse die Biseko-Lösung zwar bezogen auf die Leberzellen nicht die erwarteten Ergebnisse erzielt hat, aber hinsichtlich der protektiven Eigenschaften gegenüber den sensiblen und anfälligen Gallengangszellen bezogen auf Ischämie- bzw. Reperfusionsschäden erfolgreich war.

Galle

Schon in der Vergangenheit wurde festgestellt, dass die Gallenproduktion ein geeignetes Kriterium für die Bewertung der Vitalität hinsichtlich der Stoffwechsellistung der Leber ist (Abouna 1968). Es gibt immer mehr Studien, die aufzeigen, dass die Gallenproduktion bzw. die Gallenzusammensetzung ein weiterer Parameter für die Funktionstüchtigkeit des Lebertransplantats ist (Azer et al. 1994; Janssen et al. 2001; Kebis et al. 2007; Hedaya et al. 2009). Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass die Gallenzusammensetzung bzw. die Sezernierung der Gallenflüssigkeit abhängig ist von intakten Mitochondrial- und Zellmembranen (Bowers et al. 1987). In dieser Studie wurde die Gallenzusammensetzung nicht gemessen, allerdings die Gallenproduktion während der Perfusion. Es sollte überprüft werden, wie hoch die Gallenproduktion am Anfang der Perfusion ($t=0$, entspricht dem Zustand der reinen Ischämiezeit) liegt und wie sie sich im Laufe der Perfusion einpendelt. Da die Biseko-Lösung einen positiven Einfluss auf die Mikrozirkulation besitzt (Maier et al. 2004), wurde vermutet, dass die empfindlichen Zellen, die die Gallengänge auskleiden,

weniger geschädigt würden. Es wurde nur der t=60 Zeitpunkt betrachtet, da es interessant war, inwiefern sich hier schon eine Regeneration ausgewirkt hat, da aus früheren Studien mit Schäden gerechnet werden musste.

Der t=60-Wert zeigte eine deutlich höhere Gallenproduktion in Gruppe B als in Gruppe A. Dieses Ergebnis widerspricht der Vermutung dieser Studie, dass die Anwendung der Biseko-Lösung zu besseren Ergebnissen führt. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die Gallenproduktion in diesem Versuch bei Anwendung der UW-Lösung weniger durch die Konservierung beeinträchtigt wurde als in Gruppe A.

Die zum Ende der Reperfusionzeit festgestellte und bei der Konservierung mit Biseko-Lösung stärker ausgeprägte Reduzierung des Gallenflusses deutet auf eine Cholestase hin, die bei der Konservierung mit UW-Lösung weniger zum Tragen kam. Das Abfallen des Gallenflusses ist mit der Schädigung der Na⁺/K⁺ ATPase zu erklären, die von den Schädigungen an der Zellmembran betroffen ist.

Nach Analyse aller Ergebnisse können folgende Rückschlüsse gezogen werden:

In dieser Studie konnten positive Eigenschaften der Biseko-Lösung bei der Konservierung beobachtet werden, aber auch Aspekte die negativ im Vergleich mit der UW-Lösung waren. Um genauere und entscheidungsrelevante Aussagen über die Vor- und Nachteile einer Anwendung der Biseko-Lösung treffen zu können und die Ergebnisse dieser Studie zu bestätigen, werden jedoch weitere Prüfungen benötigt. Diese sollten insbesondere einen größeren Pool an Proben umfassen, um insbesondere die tierindividuellen Unterschiede zu berücksichtigen. Weiterhin sollten die Versuchsabläufe verlängert werden, um gewisse Trends bezüglich steigender oder sinkender Enzymaktivität besser erfassen zu können. Aus der Literatur (Ploeg et al. 1993) ist bekannt, dass viele funktionale Beeinträchtigungen erst nach einiger Zeit auftreten. Um bessere Ergebnisse zu erzielen, könnte die Konservierungslösung vor der Reperfusion ausgespült werden (Abdennebi et al. 1998). Hierdurch können Reaktionen zwischen der Konservierungslösung und dem Blut im Rahmen der Reperfusion mit den daraus resultierenden Schäden ausgeschlossen werden.

Diese Studie kommt auf Basis der durchgeführten Messungen und Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass die Biseko-Lösung keine Alternative zu dem „Goldstandard“ der UW-Lösung ist. Ein mögliches Feld für weitere Studien könnte neben der Erweiterung der Proben sowie Verlängerung der Versuchsabläufe auch die Prüfung der Konservierungseigenschaften der Biseko-Lösung bei anderen Organen bzw. bei kürzeren Konservierungszeiten sein.

6.2 Histologische Untersuchungsergebnisse

Sinusdilatation ist oft eine der ersten pathologischen Veränderungen, die bei einer Funktionsstörung der Leber auftreten. Aufgrund einer Leberstauung kommt es zu einem sistierenden Durchströmen des Blutes in den Gefäßen und somit zu einer Blutüberfüllung der Gefäße, welche zur Dilatation führt. Aufgrund dessen strömt kein neuer Sauerstoff zu und Hypoxie tritt auf. Diese oben aufgeführten ersten Veränderungen sind auf den lichtmikroskopischen Bildern sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B zu beobachten.

Im nächsten Schritt ist eine Atrophie der Hepatozytenbalken zu verzeichnen, die im weiteren Verlauf dissoziiert aussehen, da die Hepatozyten teilweise absterben. Übrig bleiben Zelltrümmer, die intrasinusoidal zu finden sind. All diese Veränderungen sind ebenfalls anhand der lichtmikroskopischen Bilder zu erkennen. Sie sind, je nach untersuchter Leber, jedoch unabhängig von der Verwendung von Biseko- oder UW-Lösung, unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies ist nachvollziehbar, da die Lebereigenschaften individuell verschieden sein können (negative Beeinflussung durch lokale oder systemische Erkrankungen der Tiere).

Die lichtmikroskopische Auswertung der entnommenen Leberbiopsien verweist auf keinen eindeutigen Vorteil beim Einsatz der getesteten Biseko-Lösung im Vergleich zur UW-Lösung.

Die Auswertung des angewendeten Auswertungsbogens (Tabelle 6) zeigt keine Unterschiede hinsichtlich der Ischämieschäden, allerdings fielen die Reperfusionsschäden beim Einsatz der UW-Lösung etwas höher aus. Diese Abweichungen sind allerdings nicht signifikant. Für beide Lösungen wurde im Zuge der Studie deutlich, dass die in der Kaltischämie auftretenden Schäden während der hier eingesetzten Reperfusion bestehen bleiben. Eine einsetzende Regeneration des Gewebes könnte durch eine Veränderung des Versuchsablaufes unterstützt werden, indem z.B. vor Beginn der Perfusion die Konservierungsflüssigkeit ausgespült wird.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die erhofften zellprotektiven Eigenschaften der Biseko-Lösung bei der Leberkonservierung nicht zum Tragen kommen. Da die Konservierungszeit einen erheblichen Einfluss auf die Lebererhaltung hat (McKeown et al. 1988; Ploeg et al. 1993; Quintana et al. 2005), könnte eine Änderung der Konservierungszeit eindeutige Hinweise auf die zellprotektiven Eigenschaften ergeben.

Grundsätzlich sind keine erheblichen Unterschiede zwischen dem Leberzustand nach der Kaltischämiezeit zu jenem nach der Reperfusion zu konstatieren. Die Leberbiopsien, bei denen das Lebergewebe nach der 14-stündigen Kaltkonservierung in der histologischen

Auswertung als „gut“ beurteilt wurde, zeigten nach der Reperfusion keine deutliche Veränderung.

Die Gewebeschnitte, die nach der kalten Konservierung schon deutliche Veränderungen aufwiesen – was mit einer Funktionsbeeinträchtigung einherging – zeigten auch nach der Reperfusion ähnlich schlechte Ergebnisse. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass sich bei der 14-stündigen Konservierung die Reperfusionsschäden nicht von den ischämischen Folgen abheben. Die positiven Eigenschaften hinsichtlich der Mikrozirkulation, wie von Maier beschrieben (Maier et al. 2004), konnten bei unserer Studie mit der gewählten Konservierungszeit nicht bestätigt werden.

Um eine genauere Prüfung der Ischämie- und Reperfusionsschäden durchführen zu können, wurden elektronenmikroskopische Bilder der Gewebeproben angefertigt. So war eine präzisere Darstellung der Zellmorphologie gegeben. Bei dieser Untersuchung standen vor allem die Morphologie der Mitochondrien, des Endoplasmatischen Retikulums und des Zellkerns im Vordergrund. Im Allgemeinen wiesen die Lebern, die mit Biseko-Lösung konserviert wurden, gemäß der elektronenmikroskopischen Untersuchung größere Schäden auf als jene, die mit UW-Lösung behandelt wurden. Generell ist jedoch festzuhalten, dass bei Zusammenfassung aller pathologischen Ergebnisse, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Erhaltung der Leberzellen in ihrer Funktion bestehen.

Die im Vorfeld dieser Studie angenommene zellprotektive Wirkung der Biseko-Konservierungslösung konnte nicht bestätigt werden. Betrachtet man die Schädigungsparameter (pathologisch-histologische Untersuchungen) und die Vitalitätskriterien (klinisch-chemische Parameter) als Gesamtheit, wird deutlich, dass die in Gruppe B befindlichen Lebern geringere hepatozelluläre Schäden aufweisen als die in Gruppe A. Hinsichtlich der biliären Enzyme in Gruppe A wurden jedoch niedrigere Werte gemessen. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis auf eine geringere Schädigung der Gallengangszellen sein.

Die Annahme, dass die Biseko-Lösung aufgrund ihrer bekannten zellprotektiven Wirkung bei Mikrozirkulationsstörungen (Maier et al. 2004) eine geeignetere Konservierungslösung darstellt, welche wesentliche Vorteile gegenüber der UW-Lösung bringt, konnte anhand der Ergebnisse nicht bestätigt werden. Auch wenn in einigen Untersuchungspunkten die Biseko-Lösung leicht bessere Ergebnisse zeigte, waren diese nicht so deutlich, dass ein Wechsel

begründbar wird. Insgesamt kann somit festgehalten werden, dass die Konservierung mit der Biseko-Lösung nicht die erwarteten Ergebnisse hervorbrachte.

7 Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchung der Leberkonservierung mit Biseko- und mit UW-Lösung im Modell der normotherm hämoperfundierte Schweineleber

Das Ziel dieser Studie bestand darin, anhand der isolierten Organperfusion eine neue Konservierungslösung, Biseko-Lösung, im Vergleich zur UW-Lösung zu testen.

Es galt zwischen den ischämischen Schäden und Reperfusionsschäden zu unterscheiden. Mithilfe der Perfusionsapparatur konnte das zu untersuchende Organ isoliert unter physiologischen Perfusionsverhältnissen ohne Beeinträchtigung durch andere Organe betrachtet werden.

Die Lebern wurden von Schweinen entnommen. Zur Datenerhebung wurden 6 Versuche mit der etablierten UW-Lösung und 6 Versuche mit der zu testenden Biseko-Lösung durchgeführt. Die Konservierungszeit war bei allen Lebern 14 Stunden, die Reperfusionsdauer 180 Minuten. Um ein genaueres Bild der Enzymaktivitäten zu erhalten, wurde während der dreistündigen Perfusion alle 30 Minuten eine Blutprobe entnommen.

Die histologische Auswertung durch den pathologischen Score ergab geringere ischämische Schäden als Reperfusionsschäden. Die histologischen Ergebnisse bei den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern waren besser. Die ausgewerteten elektronenmikroskopischen Bilder wiesen keine deutlichen Unterschiede zwischen den mit UW-Lösung und den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern auf. Eine klare Aussage über Vor- und Nachteile der Biseko- gegenüber der UW-Lösung lässt sich anhand der licht- und elektronenmikroskopischen Bilder in Bezug auf die I/R-Schädigungen des Gewebes nicht treffen. Diese Art der Untersuchung liefert nur punktuelle Ergebnisse, da nur einige Leberbiopsien vorgenommen wurden. So ist es nicht auszuschließen, dass eine Biopsie von Lebergewebe vorlag, welche von der Konservierung weniger angegriffen worden war.

Die ermittelten Stoffwechselfparameter bei den mit Biseko-Lösung konservierten Lebern, im Vergleich zu den mit UW-Lösung konservierten Lebern, waren schlechter.

Die über die isolierte Organperfusion gewonnenen Erkenntnisse zur hepatischen Stoffwechsellage sprechen nicht eindeutig für bessere Ergebnisse beim Einsatz der Biseko-Konservierungslösung. Insgesamt zeigten die Daten, dass die beiden eingesetzten Konservierungslösungen in dem hier angewandten Versuchsaufbau zu I/R-Schäden der Leber führen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bezüglich Vitalität und Funktion der Leber, die Konservierung mit Biseko-Lösung nicht die erwarteten Ergebnisse aufweist. Jedoch sollte die Biseko-Lösung aufgrund der bekannten positiven Eigenschaften bei der Aufrechterhaltung der Mikroperfusion weiter untersucht werden. Die hier erzielten Untersuchungsergebnisse unterstützen die Aussage, dass die UW-Lösung zurzeit gebräuchlich bei der Lebertransplantation ist. Die Ergebnisse dieser Studie lassen zwar die Biseko-Lösung als nicht am geeignetsten für die Leberkonservierung erscheinen, aufgrund der bekannten Eigenschaften der Biseko-Lösung wären Tests und Studien an anderen Organen jedoch durchaus sinnvoll.

8 Summary

A Study of liver preservation comparing Biseko solution to UW- Preservation solution using the model of normothermic isolated autologue hemoperfused pig liver

The aim of this study was to test a new preservation solution, “Biseko”, compared to the “gold-standard” “University of Wisconsin”. This comparative study was performed using isolated organ perfusion.

We wanted to investigate the differences between the ischemic,- and the reperfusion impairments using the excorporeal perfusion system. This system has the great advantage that the isolated organ can be examined under physiological conditions, without being influenced by other organs.

The livers that were used for these experiments were from pigs. The data ascertainment consisted of perfusing six livers with the established “University of Wisconsin” Solution, and a perfusing of further six livers with the trial preservation solution “Biseko”. The preservation times for all twelve livers were fourteen hours, and the reperfusion time was 180 minutes. Samples were taken every thirty minutes during the three hours of reperfusion in order to gain a precise picture of the enzyme activity.

Using the pathology score the histological analysis indicated less ischemic impairments than reperfusion impairments. Further better results were acquired using the Biseko preservation solution compared to preservation with the UW-solution. The evaluated electron microscopic images showed no distinctive differences between the trial preservation solution Biseko and the established preservation solution “University of Wisconsin”. Using the light,- and electron microscopic images a definite statement concerning the advantages and disadvantages of Biseko compared to the “University of Wisconsin” preservation solution cannot be made regarding the ischemic,- and reperfusion impairments to the cell tissue. As only a few liver biopsies were obtained, this kind of examination provided only selective results. It is possible that certain liver biopsies taken showed a higher level of damage caused by preservation than others.

The acquired parameters of the metabolism were generally worse in livers preserved with Biseko, compared to the livers preserved in “University of Wisconsin” solution.

The gained knowledge through the isolated hemoperfused pig livers regarding the hepatic metabolism does not necessarily indicate for better results by using the “Biseko” preservation

solution. Generally the data showed that both preservation solutions used in this test set-up lead, both to ischemic and reperfusion impairments to the liver.

In conclusion it can be stated, that regarding vitality and function of the organ the pure preservation with Biseko did not yield the expected success.

However, due to the known positive qualities of Biseko regarding the microcirculation this preservative should not be discarded completely. The findings gained support the fact that "University of Wisconsin" is momentarily the "gold-standard" in liver transplantation. According to our results while "Biseko" is not the most suitable preservative for livers, it could very well make sense to test this preservative on other organs due to its known qualities.

9 Literaturverzeichnis

Anonymous.(1996). "Alternatives in animal testing." *Environ Health Perspect* 104(3): 250-252.

Abbasoglu, O. (2008). "Liver transplantation: yesterday, today and tomorrow." *World J Gastroenterol* 14(20): 3117-3122.

Abdennebi, H. B., Steghens, J. P., Margonari, J., Ramella-Virieux, S., Barbieux, A. und Boillot, O. (1998). "Evaluation of parenchymal and nonparenchymal cell injury after different conditions of storage and reperfusion." *Transpl Int* 11(5): 365-372.

Abouna, G. M. (1968). "Pig liver perfusion with human blood. The effect of preparing and flushing the liver with various balanced solutions on its subsequent viability and function." *Br J Surg* 55(10): 761-768.

Abouna, G. M. (1973). "Simultaneous liver hemoperfusion and hemodialysis for treatment of hepatic coma and hepatorenal failure." *Surgery* 73(4): 541-549.

Almada, L. L., Scandizzi, A. L., Guibert, E. E., Furno, G. und Rodriguez, J. V. (2003). "Biliary inorganic phosphate as a tool for assessing cold preservation-reperfusion injury: a study in the isolated perfused rat liver model." *Liver Transpl* 9(2): 160-169.

Aragon, G. und Younossi, Z. M. (2010). "When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients." *Cleve Clin J Med* 77(3): 195-204.

Azer, S. A., McCaughan, G. W. und Stacey, N. H. (1994). "Daily determination of individual serum bile acids allows early detection of hepatic allograft dysfunction." *Hepatology* 20(6): 1458-1464.

Bao, Y. M., Adam, R., Samuel, D., Castaing, D. und Bismuth, H. (1994). "Influence of high aminotransferase levels on rejection in liver transplantation." *Transplant Proc* 26(1): 259-260.

Belzer, F. O. und Southard, J. H. (1988). "Principles of solid-organ preservation by cold storage." *Transplantation* 45(4): 673-676.

Bessems, M., Doorschodt, B. M., van Marle, J., Vreeling, H., Meijer, A. J. und van Gulik, T. M. (2005). "Improved machine perfusion preservation of the non-heart-beating donor rat liver using Polysol: a new machine perfusion preservation solution." *Liver Transpl* 11(11): 1379-1388.

Bowers, B. A., Branum, G. D., Rotolo, F. S., Watters, C. R. und Meyers, W. C. (1987). "Bile flow-an index of ischemic injury." *J Surg Res* 42(5): 565-569.

Breuch, G. S., und Servos, W.. *Dialyse für Einsteiger*. 2. Auflage, Elsevier Verlag, München 2010. S. 74-80.

Broelsch, C. E., Emond, J. C., Thistlethwaite, J. R., Whittington, P. F., Zucker, A. R., Baker, A. L., Aran, P. F., Rouch, D. A. und Lichtor, J. L. (1988). "Liver transplantation, including the concept of reduced-size liver transplants in children." *Ann Surg* 208(4): 410-420.

Brosnan, J. T., Krebs, H. A. und Williamson, D. H. (1970). "Effects of ischaemia on metabolite concentrations in rat liver." *Biochem J* 117(1): 91-96.

Burkschat, M., Cramer, E., und Kamps, U. *Beschreibende Statistik: Grundlegende Methoden*. Springer Verlag, Berlin 2004. S. 106-114.

Busuttil, R. W. und Goss, J. A. (1999). "Split liver transplantation." *Ann Surg* 229(3): 313-321.

Calne, R. (2004). "Cyclosporine as a milestone in immunosuppression." *Transplant Proc* 36(2 Suppl): 13S-15S.

Calne, R. Y. (1968). "The present position and future prospects of organ transplantation." *Ann R Coll Surg Engl* 42(5): 283-306.

Cannon, J. A. (1956). "Brief Report." *Transplant Bull.* 3(7).

Cassidy, W. M. und Reynolds, T. B. (1994). "Serum lactic dehydrogenase in the differential diagnosis of acute hepatocellular injury." *J Clin Gastroenterol* 19(2): 118-121.

Chan, S. C. und Fan, S. T. (2008). "Historical perspective of living donor liver transplantation." *World J Gastroenterol* 14(1): 15-21.

Clavien, P. A., Harvey, P. R. und Strasberg, S. M. (1992). "Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies." *Transplantation* 53(5): 957-978.

Corder, G. und Foreman, D.. *Nonparametric Statistics for Non-Statisticians: A Step-by-Step Approach*. John Wiley & Sons, New Jersey (USA) 2009. S.38-50; 57-71.

Dahme , E. und Weiss, E.. (Hrsg). *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. 5. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart 1999. S. 197-200.

Dancygier, H.. Klinische Hepatologie. Springer Verlag, Berlin 2003. S. 54-58, 129-130.

Den Toom, R., De Jong, M., Krenning, E. P., Van der Hoek, H. J., Ten Kate, F. J., Hennemann, G. und Terpstra, O. T. (1991). "Euro-Collins solution versus UW-solution for long-term liver preservation in the isolated rat-liver perfusion model." *HPB Surg* 4(4): 313-320.

Denk, H.. Pathologie der Leber und Gallenwege. Springer Verlag, Berlin 2000. S. 13-20; 73-76

Drews, G., Deckert, F., Witzigmann, H., Hauss, J. und Spiegel, H. U. (1998). "[Effect of forced organ cooling on microperfusion of donor livers]." *Zentralbl Chir* 123(3): 280-284.

Dutkowski, P., de Rougemont, O. und Clavien, P. A. (2008). "Machine perfusion for 'marginal' liver grafts." *Am J Transplant* 8(5): 917-924.

Erhard, J. (1999). "Organ transplantation and quality of life." *Zentralbl Chir* 124(2): 73.

Erhard, J., Lange, R., Scherer, R., Kox, W. J., Bretschneider, H. J., Gebhard, M. M. und Eigler, F. W. (1994). "Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation. A prospective, randomized study." *Transpl Int* 7(3): 177-181.

Feng, L., Zhao, N., Yao, X., Sun, X., Du, L., Diao, X., Li, S. und Li, Y. (2007). "Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: a systematic review." *Liver Transpl* 13(8): 1125-1136.

Feng, X. N., Xu, X. und Zheng, S. S. (2006). "Current status and perspective of liver preservation solutions." *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 5(4): 490-494.

Fenwick, N., Griffin, G. und Gauthier, C. (2009). "The welfare of animals used in science: how the "Three Rs" ethic guides improvements." *Can Vet J* 50(5): 523-530.

Fluckiger, M., Althaus, U. und Strebel, H. M. (1977). "[Enzyme activities in the serum and organs of young pigs. 2. Enzyme activities in the serum after experimental organ lesions]." *Zentralbl Veterinarmed A* 24(6): 496-502.

Frodin, L. (1975). "Renal transplantation in the rat. II. In Vitro perfusion of rat kidney before transplantation." *Scand J Clin Lab Invest* 35: 455-462.

Fujita, S., Rosen, C., Reed, A., Langham, M. R., Jr., Howard, R. J., Lauwers, G. Y. und Scornik, J. C. (1997). "Significance of preformed anti-donor antibodies in liver transplantation." *Transplantation* 63(1): 84-88.

Gagianiss, D.. *Biochemie in Frage und Antwort*. Elsevier Urban & Fischer, München 2007. S. 63-65.

Giannini, E. G., Testa, R. und Savarino, V. (2005). "Liver enzyme alteration: a guide for clinicians." *CMAJ* 172(3): 367-379.

Graziadei, I. W., Schwaighofer, H., Koch, R., Nachbaur, K., Koenigsrainer, A., Margreiter, R. und Vogel, W. (2006). "Long-term outcome of endoscopic treatment of biliary strictures after liver transplantation." *Liver Transpl* 12(5): 718-725.

Gregor, G. (1979). "[Hematologic and biochemical studies on MINI-LEWE miniature swine. 2. Electrolytes and enzymes]." *Z Versuchstierkd* 21(3): 125-135.

Groneberg, D. A., Grosse-Siestrup, C. und Fischer, A. (2002). "In vitro models to study hepatotoxicity." *Toxicol Pathol* 30(3): 394-399.

Grosse-Siestrup, C., Pfeffer, J., Unger, V., Nagel, S., Witt, C., Fischer, A. und Groneberg, D. A. (2002). "Isolated hemoperfused slaughterhouse livers as a valid model to study hepatotoxicity." *Toxicol Pathol* 30(6): 749-754.

Hagemann, O. (2010). *Labor lexikon*. E-journal für Labormedizin.

Hedaya, M. S., El Moghazy, W. M., Yasutomo, Y., Kiyoshi, T., Kaido, T., Egawa, H., Uemoto, S. und Takada, Y. (2009). "Is biliary bile acid a good predictor for acute cellular rejection in living donor liver transplantation?" *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 8(5): 474-478.

Hermanns, W. (E.Dahme und E. Weiss (Hrsg)). *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. 5. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart 1999. S. 197-232.

Ikeda, T., Yanaga, K., Kishikawa, K., Kakizoe, S., Shimada, M. und Sugimachi, K. (1992). "Ischemic injury in liver transplantation: difference in injury sites between warm and cold ischemia in rats." *Hepatology* 16(2): 454-461.

Ikeda, T., Yanaga, K., Lebeau, G., Higashi, H., Kakizoe, S. und Starzl, T. E. (1990). "Hemodynamic and biochemical changes during normothermic and hypothermic sanguinous perfusion of the porcine hepatic graft." *Transplantation* 50(4): 564-567.

Iu, S., Harvey, P. R., Makowka, L., Petrunka, C. N., Ilson, R. G. und Strasberg, S. M. (1987). "Markers of allograft viability in the rat. Relationship between transplantation viability and liver function in the isolated perfused liver." *Transplantation* 44(4): 562-569.

Jaeschke, H. (1998). "Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver." *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5(4): 402-408.

Janssen, H., Janssen, P. H. und Broelsch, C. E. (2004). "UW is superior to Celsior and HTK in the protection of human liver endothelial cells against preservation injury." *Liver Transpl* 10(12): 1514-1523.

Janssen, H., Lange, R., Erhard, J., Testa, G., Malago, M., Janssen, P., Eigler, F. W. und Broelsch, C. E. (2001). "Serum bile acids in liver transplantation--early indicator for acute rejection and monitor for antirejection therapy." *Transpl Int* 14(6): 429-437.

Kakar, S., Batts, K. P., Poterucha, J. J. und Burgart, L. J. (2004). "Histologic changes mimicking biliary disease in liver biopsies with venous outflow impairment." *Mod Pathol* 17(7): 874-878.

Kalayoglu, M., Hoffmann, R. M., D'Alessandro, A. M., Pirsch, J. D., Sollinger, H. W. und Belzer, F. O. (1989). "Results of extended preservation of the liver for clinical transplantation." *Transplant Proc* 21(3): 3487-3488.

Kannerup, A. S., Gronbaek, H., Funch-Jensen, P., Jorgensen, R. L. und Mortensen, F. V. (2009). "The influence of preconditioning on metabolic changes in the pig liver before, during, and after warm liver ischemia measured by microdialysis." *Hepatol Int* 3(1): 310-315.

Katz, E., Mor, E., Schwartz, M. E., Theise, N., Patel, T. und Miller, C. M. (1994). "Preservation injury in clinical liver transplantation: incidence and effect on rejection and survival." *Clin Transplant* 8(5): 492-496.

Kebis, A., Kukan, M., Grancic, P. und Jakubovsky, J. (2007). "A novel way of liver preservation improves rat liver viability upon reperfusion." *J Zhejiang Univ Sci B* 8(5): 289-295.

König, HE. und Liebich, HG.. *Anatomie der Haussäugetiere*. 4.Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart 2009. S.358 (Abb. 7-100).

Kotitschke, R. und Stephan, W. (1985). "[Inhibitory and immunological profile of therapeutic serum protein solutions]." *Infusionsther Klin Ernahr* 12(1): 48-53.

- Kotoh, K., Enjoji, M., Kato, M., Kohjima, M., Nakamuta, M. und Takayanagi, R. (2008). "A new parameter using serum lactate dehydrogenase and alanine aminotransferase level is useful for predicting the prognosis of patients at an early stage of acute liver injury: a retrospective study." *Comp Hepatol* 7: 6.
- Kraft, W. und Dürr, U.. *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 6 Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart 2005. S. 152, 154-157.
- Kvitsinskaia, E. A., Krivulis, D. B. und Sorokin lu, A. (1978). "[Effect of hypothermia on metabolism in the liver during its preservation]." *Biull Eksp Biol Med* 86(8): 179-182.
- Lobo, S. M., Orrico, S. R., Queiroz, M. M., Contrim, L. M. und Cury, P. M. (2008). "Comparison of the effects of lactated Ringer solution with and without hydroxyethyl starch fluid resuscitation on gut edema during severe splanchnic ischemia." *Braz J Med Biol Res* 41(7): 634-639.
- Lüllmann-Rauch, R.. *Taschenlehrbuch Histologie*. 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2006. S. 387-394.
- Lum, G., Marquardt, C. und Khuri, S. F. (1989). "Hypomagnesemia and low alkaline phosphatase activity in patients' serum after cardiac surgery." *Clin Chem* 35(4): 664-667.
- Maier, M., Wackerle, M., Herzog, C. und Marzi, I. (2004). "Supplementary administration of serum protein solution during shock resuscitation in the rat." *European journal of trauma* 30(5): 289-295.
- Marzi, I., Walcher, F., Menger, M., Buhren, V., Harbauer, G. und Trentz, O. (1991). "Microcirculatory disturbances and leucocyte adherence in transplanted livers after cold storage in Euro-Collins, UW and HTK solutions." *Transpl Int* 4(1): 45-50.
- McKeown, C. M., Edwards, V., Phillips, M. J., Harvey, P. R., Petrunka, C. N. und Strasberg, S. M. (1988). "Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat." *Transplantation* 46(2): 178-191.
- Mimeault, R., Grant, D., Ghent, C., Duff, J. und Wall, W. (1989). "Analysis of donor and recipient variables and early graft function after orthotopic liver transplantation." *Transplant Proc* 21(2): 3355.
- Moers, C., Smits, J. M., Maathuis, M. H., Treckmann, J., van Gelder, F., Napieralski, B. P., van Kasterop-Kutz, M., van der Heide, J. J., Squifflet, J. P., van Heurn, E., Kirste, G. R., Rahmel, A., Leuvenink, H. G., Paul, A., Pirenne, J. und Ploeg, R. J. (2009). "Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation." *N Engl J Med* 360(1): 7-19.

Montalvo-Jave, E. E., Pina, E., Montalvo-Arenas, C., Urrutia, R., Benavente-Chenhalls, L., Pena-Sanchez, J. und Geller, D. A. (2009). "Role of ischemic preconditioning in liver surgery and hepatic transplantation." *J Gastrointest Surg* 13(11): 2074-2083.

Mosimann, W. und Kohler, T.. *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie der Haustiere*. Parey Verlag, Stuttgart 1990. S. 177-181.

Nadalin, S., Bockhorn, M., Malago, M., Valentin-Gamazo, C., Frilling, A. und Broelsch, C. E. (2006). "Living donor liver transplantation." *HPB (Oxford)* 8(1): 10-21.

Nagayama, M., Katsuramaki, T., Kimura, H., Isobe, M., Meguro, M., Matsuno, T., Nui, A. und Hirata, K. (2002). "Prediction of graft viability from non-heart-beating donor pigs using hepatic microdialysate hypoxanthine levels." *J Surg Res* 107(2): 210-218.

Nelson, D. und Cox, M.. *Lehninger Biochemie*. 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin 2001. S. 942-943.

Neumeister, B., Besenthal, I., und Böhm, B.O.. *Klinikleitfaden Labordiagnostik*. 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München 2008. S.95-98.

Nickel, R., Schummer, A. und Seiferle, E.. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*. Band II, Eingeweide. 9 Auflage, Parey Verlag, Stuttgart 2004. S.130-137; 157-167.

Nowak, G., Ungerstedt, J., Wernerman, J., Ungerstedt, U. und Ericzon, B. G. (2002). "Metabolic changes in the liver graft monitored continuously with microdialysis during liver transplantation in a pig model." *Liver Transpl* 8(5): 424-432.

Pegg, D. E. (1986). "Organ preservation." *Surg Clin North Am* 66(3): 617-632.

Pienaar, B. H., Lindell, S. L., Van Gulik, T., Southard, J. H. und Belzer, F. O. (1990). "Seventy-two-hour preservation of the canine liver by machine perfusion." *Transplantation* 49(2): 258-260.

Ploeg, R. J., D'Alessandro, A. M., Knechtle, S. J., Stegall, M. D., Pirsch, J. D., Hoffmann, R. M., Sasaki, T., Sollinger, H. W., Belzer, F. O. und Kalayoglu, M. (1993). "Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis." *Transplantation* 55(4): 807-813.

Probst, M. (1985). "Perioperative blood component therapy." *Fortschr Med* 103(13): 351-354.

Quintana, A. B., Guibert, E. E. und Rodriguez, J. V. (2005). "Effect of cold preservation/reperfusion on glycogen content of liver. Concise review." *Ann Hepatol* 4(1): 25-31.

Raymond, S.L., Pert, J., und Dodds, WJ. (1975). "Evaluation of platelet cryopreservation techniques by isolated kidney perfusion." *Transfusion* 15:219-225.

Rauen, U., Erhard, J., Kuhnhenrich, P., Lange, R., Moissidis, M., Eigler, F. W. und de Groot, H. (1994). "Nonparenchymal cell and hepatocellular injury to human liver grafts assessed by enzyme-release into the perfusate." *Langenbecks Arch Chir* 379(4): 241-247.

Schon, M. R., Kollmar, O., Wolf, S., Schrem, H., Matthes, M., Akkoc, N., Schnoy, N. C. und Neuhaus, P. (2001). "Liver transplantation after organ preservation with normothermic extracorporeal perfusion." *Ann Surg* 233(1): 114-123.

Silbernagl, S. und Klinke, R. (Hrsg). *Lehrbuch der Physiologie*.3 Auflage, Thiemeverlag, Stuttgart 2001. S. 425-430; 433-437.

Starzl, T. E. (2003). "The co-development of liver and kidney transplantation (1955-1967)." *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 34(2): 238-241.

Steininger, R., Roth, E., Holzmüller, P., Reckendorfer, H., Grunberger, T., Sperlich, M., Burgmann, H., Moser, E., Feigl, W. und Muhlbacher, F. (1992). "Comparison of HTK- and UW-solution for liver preservation tested in an orthotopic liver transplantation model in the pig." *Transpl Int* 5 Suppl 1: S.403-407.

Stephan, W. (1982). "Activity and storage stability of proteins in a hepatitis-free human serum preparation." *Arzneimittelforschung* 32(8): 802-806.

Studzinski, A., Scheinichen, D., Stenger, K., Weissig, A., Becker, T. und Juettner, B. (2008). "The role of portal vein clamping for cytokine release and neutrophils activity during liver resection and transplant." *Exp Clin Transplant* 6(4): 254-260.

Szolnoky, J., Ambrus, N., Szabo-Biczok, A., Bogats, G., Papp, J. G., Varro, A. und Pataricza, J. (2009). "Biseko colloidal solution diminishes the vasoreactivity of human isolated radial arteries." *Eur J Cardiothorac Surg* 36(1): 143-147.

Tanaka, K. (2003). "Progress and future in living donor liver transplantation." *Keio J Med* 52(2): 73-79.

Tapuria, N., Junnarkar, S. P., Dutt, N., Abu-Amara, M., Fuller, B., Seifalian, A. M. und Davidson, B. R. (2009). "Effect of remote ischemic preconditioning on hepatic

microcirculation and function in a rat model of hepatic ischemia reperfusion injury." *HPB (Oxford)* 11(2): 108-117.

Thewes, S., Reed, H. K., Grosse-Siestrup, C., Groneberg, D. A., Meissler, M., Schaller, M. und Hube, B. (2007). "Haemoperfused liver as an ex vivo model for organ invasion of *Candida albicans*." *J Med Microbiol* 56(Pt 2): 266-270.

Tiede, M. und Voß, W.. *Schließen mit Statistik - Verstehen*. Oldenbourg Wissenschaftsverlag, München 2000. S.185-192, 195-204.

Tolboom, H., Milwid, J. M., Izamis, M. L., Uygun, K., Berthiaume, F. und Yarmush, M. L. (2008). "Sequential cold storage and normothermic perfusion of the ischemic rat liver." *Transplant Proc* 40(5): 1306-1309.

Toledo-Pereyra, L. H. (1987). "Definition of reperfusion injury in transplantation." *Transplantation* 43(6): 931-932.

Uhlmann, D., Gabel, G., Ludwig, S., Armann, B., Hess, J., Pietsch, U. C., Tannapfel, A., Fiedler, M., Kratzsch, J., Hass, J. und Witzigmann, H. (2005). "Effects of ET(A) receptor antagonism on proinflammatory gene expression and microcirculation following hepatic ischemia/reperfusion." *Microcirculation* 12(5): 405-419.

Vekemans, K., Liu, Q., Pirenne, J. und Monbaliu, D. (2008). "Artificial circulation of the liver: machine perfusion as a preservation method in liver transplantation." *Anat Rec (Hoboken)* 291(6): 735-740.

Von Engelhardt, W. und Breves, G (Hrsg). *Physiologie der Haustiere*. 1 Auflage, Enke Verlag, Stuttgart 2000. S. 374-377, 388, 422-434

Voss, H. und Herrlinger, R.. *Taschenbuch der Anatomie*. Band 2. 11. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1962: S.100.

Walter, J., Burdelski, M. und Broring, D. C. (2008). "Chances and risks in living donor liver transplantation." *Dtsch Arztebl Int* 105(6): 101-107.

Welch, C. (1955). "A note on transplantation of the whole liver in dogs." *Transplant Bull.* 2.

Winblad, A., Sandstrom, P., Olsson, H., Svanvik, J. und Gullstrand, P. (2009). "Segmental ischemia of the liver - microdialysis in a novel porcine model." *Eur Surg Res* 43(3): 276-285.

Zurlo, J., Rudacille, D. und Goldberg, A. M. (1996). "The three Rs: the way forward." *Environ Health Perspect* 104(8): 878-880.

10 Anhang

10.1 Tabellen mit gemessenen Enzymaktivität

Tabelle 7: Verlauf der AST-Aktivität (U/l) für die mit Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	380,50	362,50	427,00	386,00	396,50	514,50	631,50
25%	266,75	253,25	277,75	245,75	243,25	223,50	199,75
75%	720,50	926,00	1250,00	2241,00	2700,00	2779,50	2619,00
Min	257,00	242,00	196,00	152,00	121,00	93,00	85,00
Max	1364,00	1664,00	2876,00	3485,00	3070,00	2814,00	3069,00

Tabelle 8: Verlauf der AST-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	154,00	190,00	232,00	173,00	267,00	272,00	327,50
25%	105,50	106,75	96,50	94,25	92,50	102,25	92,00
75%	550,00	732,25	652,25	567,25	576,25	697,75	945,25
Min	98,00	106,00	88,00	92,00	79,00	88,00	81,00
Max	1513,00	1408,00	737,00	814,00	742,00	703,00	1117,00

Tabelle 9: Verlauf der GLDH-Aktivität (U/l) für die mit Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	2,55	3,25	1,65	2,05	2,20	1,95	1,65
25%	2,08	1,68	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
75%	9,05	10,40	10,13	8,92	7,31	8,52	8,45
Min	1,40	1,00	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Max	24,50	23,30	30,60	27,90	19,50	17,90	13,10

Tabelle 10: Verlauf der GLDH-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	1,60	4,20	2,95	1,80	1,00	1,00	1,00
25%	0,78	1,68	1,00	0,78	2,50	0,78	0,78
75%	4,00	9,23	6,55	3,03	1,98	3,38	4,50
Min	0,10	1,00	1,00	0,10	0,10	0,10	0,10
Max	6,60	10,20	13,60	3,10	2,50	4,20	6,30

Tabelle 11: Verlauf der LDH-Aktivität (U/l) für die mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	525,50	435,50	446,00	410,00	385,00	460,50	531,00
25%	469,50	366,25	297,50	295,00	304,75	207,25	271,25
75%	829,75	889,75	1335,50	1994,25	2233,25	1628,75	2054,50
min	384,00	340,00	272,00	214,00	175,00	138,00	128,00
max	1264,00	1342,00	2148,00	2544,00	2474,00	2003,00	3019,00

Tabelle 12: Verlauf der LDH-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	458,00	376,00	347,50	315,50	349,50	333,00	419,00
25%	275,75	320,50	280,25	229,50	275,00	268,75	239,50
75%	688,25	606,75	473,75	455,50	442,50	490,25	534,50
min	272,00	289,00	263,00	228,00	188,00	262,00	229,00
max	1190,00	1137,00	533,00	736,00	501,00	569,00	620,00

Tabelle 13: Verlauf der Laktat-Aktivität (mmol/l) für die mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.)

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median		1,35	2,50	1,91	2,13	3,18	2,94
25%		0,82	1,30	0,58	0,54	1,43	0,80
75%		1,58	3,25	4,50	3,87	3,97	3,91
min		0,34	0,88	0,44	0,22	0,90	0,19
max		1,73	3,35	5,99	4,25	4,45	4,17

Tabelle 14: Verlauf der Laktat-Aktivität (mmol/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median		3,63	1,52	3,04	3,33	3,56	3,92
25%		3,02	0,21	1,92	2,04	1,87	1,79
75%		4,80	5,24	4,22	4,92	5,91	6,29
min		2,82	0,13	0,87	0,46	0,60	0,37
max		5,19	7,23	4,54	6,74	9,44	7,29

Tabelle 15: Verlauf der AP-Aktivität (U/l) für die mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	45,50	31,50	26,00	19,50	15,00	14,50	13,00
25%	35,25	27,00	21,00	16,75	12,00	9,75	7,00
75%	59,25	53,00	40,00	29,00	22,25	26,75	22,00
min	30,00	24,00	18,00	13,00	9,00	6,00	4,00
max	78,00	62,00	61,00	53,00	38,00	29,00	22,00

Tabelle 16: Verlauf der AP-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	38,50	39,50	35,00	27,50	28,00	25,50	22,50
25%	34,75	33,25	27,50	19,50	18,75	22,00	17,50
75%	67,75	52,25	44,75	44,50	33,50	27,75	27,00
min	34,00	31,00	17,00	12,00	18,00	19,00	13,00
max	79,00	59,00	65,00	85,00	35,00	30,00	36,00

Tabelle 17: Verlauf der GGT Aktivität (U/l) für die mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.)

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	41,00	28,00	36,50	29,50	23,50	27,00	19,50
25%	19,00	15,50	14,50	11,50	10,00	8,50	8,25
75%	59,25	43,50	46,75	39,50	35,00	32,00	32,25
min	16,00	15,00	13,00	10,00	10,00	7,00	6,00
max	60,00	44,00	52,00	56,00	41,00	32,00	33,00

Tabelle 18: Verlauf der GGT-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

t_perf	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
Median	40,50	35,00	49,00	36,00	34,50	28,50	25,50
25%	24,00	24,00	25,50	25,50	21,50	22,50	20,00
75%	52,00	46,00	52,00	61,00	46,00	38,50	38,50
min	18,00	19,00	18,00	21,00	17,00	21,00	20,00
max	61,00	49,00	52,00	76,00	61,00	55,00	70,00

Tabelle 19: Gallenproduktion ($\mu\text{l/g}$ Lebergewicht) der mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern zum Zeitpunkt $t=60\text{min}$ mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

median	1,46
25%	0,62
75%	2,61
min	0,52
max	4,78

Tabelle 20: Gallenproduktion ($\mu\text{l/g}$ Lebergewicht) der mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern zum Zeitpunkt $t=60\text{min}$ mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.

median	2,50
25%	2,21
75%	5,73
min	2,02
max	7,71

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schweineleber und humane Leber im Vergleich	13
Abb. 2:	Übersicht der Anatomie der Schweineleber (Liebich 2009).....	14
Abb. 3:	Mikroskopische Abbildung der Schweineleber, Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, 1: Gallengang, 2: Vene, 3: Arterie, 4: Hepatozyten mit Zellkern (OV x400).....	17
Abb. 4:	Die Darstellung gibt die zeitliche Dauer an und stellt die Zeitpunkte der Biopsieentnahme (vor und nach der Perfusion) sowie die durchgeführten Untersuchungen dar.	36
Abb. 5:	Leberperfusionsapparatur mit ihren wesentlichen Bestandteilen.....	40
Abb. 6:	Graphische Darstellung der Leberperfusionsapparatur (Dialysem modul nach H. von Bayer)	41
Abb. 7:	Vergleichende Darstellung der AST-Aktivität im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) – blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; p<0.1], Ausreisser [◇], Extremwerte [○]	47
Abb. 8	Vergleichende Darstellung der GLDH-Aktivität im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; p<0.1], Ausreisser [◇], Extremwerte [○]	48
Abb. 9:	Vergleichende Darstellung der LDH-Aktivität im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe; Ausreisser [◇], Extremwerte [○]	50
Abb. 10:	Vergleichende Darstellung der Laktatkonzentrationen im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; p<0.1], Signifikanzen [#; p<0.05], Ausreisser [◇], Extremwerte [○]	51
Abb. 11:	Vergleichende Darstellung der AP-Aktivitäten im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; p<0.1], Signifikanzen [#; p<0.05], Ausreisser [◇], Extremwerte [○]	53
Abb. 12:	Vergleichende Darstellung der GGT-Aktivität im Verlauf der isolierten Leberperfusion; Versuch A (Konservierung mit Biseko-Lösung) - blaue Boxen, Versuch B (Konservierung mit UW-Lösung) - rote Boxen; n = 6 Tiere pro Versuchsgruppe, Trends [#; p<0.1], Signifikanzen [#; p<0.05], Ausreisser [◇], Extremwerte [○]	54
Abb. 13:	Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit Biseko-Lösung, 1: Blutzellen, 2: Leberzelltrabekel, 3: Sinusdilataion (OV x400).....	57

Abb. 14: Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-
Lösung, **1:** Glisson-Trias mit **A:** Gallengang, **B:** Arterie, **C:** Vene (OV x400).....57

Abb. 15: Leber 11, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit Biseko-
Lösung, **1:** Trabekelbrüche, **2:** Sinusdilataion, **3:** Erythrozyten, **4:** Zellnekrosen (OV x200)58

Abb. 16: Leber 11, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-
Lösung, **1:** Endothelschäden, **2:** Lipidtropfen, **3:** Einblutungen (OV x400).....58

Abb. 17: Leber 1, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit UW-
Lösung, **1:** Zellschwellungen, **2:** Sinusdilataion (OV x 400).....59

Abb. 18: Leber 1, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit UW-
Lösung, **1:** Sinusdilataion, **2:** Zelltrümmer (OV x200)59

Abb. 19: Leber 14, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit UW-
Lösung, **1:** Zelltrümmer, **2:** Vene, **3:** Sinus, **4:** Leberzelltrabekel (OV x400)60

Abb. 20: Leber 14, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit UW-
Lösung, **1:** Blutzellen, **2:** Leberzelltrabekel, **3:** Zellschwellungen (OV x400).....60

Abb. 21: Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit Biseko-
Lösung, **1:** Zellkern, **2:** Endoplasmatisches Reticulum (ER), **3:** Mitochondrien (OV x5274)..64

Abb. 22: Leber 3, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-
Lösung, **1:** Zellkern, **2:** Endoplasmatisches Reticulum, **3:** Mitochondrien, **4:**
Wassereinlagerungen (OV x 4136).....64

Abb. 23: Leber 11, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit Biseko-
Lösung, **1:** Zellkern, **2:** Zellrand, **3:** Gallenkapillare, **4:** Mitochondrien **5:** ER, (OV x 5011) ..66

Abb. 24: Leber 11, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit Biseko-
Lösung, **1:** Zellkern, **2:** Mitochondrien, **3:** Zelleinschlüsse, (OV x4031)66

Abb. 25: Leber 1, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit UW-
Lösung, **1:** Zellkern, **2:** Mitochondrien, **3:**ER, (OV x 3597)68

Abb. 26: Leber 1, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit UW-
Lösung, **1:** Zellkern, **2:** Mitochondrien, **3:** ER, **4:** Zelleinschlüsse, (OV x 6000)68

Abb. 27: Leber 14, Zeitpunkt der Entnahme vor der Reperfusion, konserviert mit UW-
Lösung, **1:** Mitochondrien, **2:** ER, **3:** Gallenkapillare, (OV x 4768).....70

Abb. 28: Leber 14, Zeitpunkt der Entnahme nach der Reperfusion, konserviert mit UW-
Lösung, **1:** Mitochondrien, **2:** ER **3:** Zellgrenzen, **4:** Gallenkapillare, (OV x 4136)70

10.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungen.....	6
Tabelle 2: Meilensteine in der Lebertransplantation.....	25
Tabelle 3: Gruppeneinteilung.....	33
Tabelle 4: Zusammensetzung des Dialysats.....	34
Tabelle 5: Zusammensetzung Standard UW-Lösung; pH = 7,4; Osmolalität 320mosmol/l...39	
Tabelle 6: Darstellung der untersuchten Merkmale der lichtmikroskopischen Bilder von Gruppe A (konserviert mit Biseko-Lösung) und Gruppe B (konserviert mit UW-Lösung). Untersuchte Zeitpunkte sind „Vor Perfusion“ und „Nach Perfusion“. Auswertung erfolgt nach der Einteilung: Geringgradig + (0-25%), mittelgradig ++ (25-50%) und hochgradig +++(>50%)	62
Tabelle 7: Verlauf der AST-Aktivität (U/l) für die mit Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.	95
Tabelle 8: Verlauf der AST-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.	95
Tabelle 9: Verlauf der GLDH-Aktivität (U/l) für die mit Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.	95
Tabelle 10: Verlauf der GLDH-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.	95
Tabelle 11: Verlauf der LDH-Aktivität (U/l) für die mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.	96
Tabelle 12: Verlauf der LDH-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.	96
Tabelle 13: Verlauf der Laktat-Aktivität (mmol/l) für die mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.)	96
Tabelle 14: Verlauf der Laktat-Aktivität (mmol/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.	96

Tabelle 15: Verlauf der AP-Aktivität (U/l) für die mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.97

Tabelle 16: Verlauf der AP-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.97

Tabelle 17: Verlauf der GGT Aktivität (U/l) für die mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.)97

Tabelle 18: Verlauf der GGT-Aktivität (U/l) für die mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern über den untersuchten Zeitverlauf (0-180 min) mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.97

Tabelle 19: Gallenproduktion (μ l/g Lebergewicht) der mit der Biseko Konservierungslösung perfundierten Lebern zum Zeitpunkt t=60min mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.98

Tabelle 20: Gallenproduktion (μ l/g Lebergewicht) der mit der UW Konservierungslösung perfundierten Lebern zum Zeitpunkt t=60min mit Angabe der Mediane, 25 – 75 Perzentile, Minimumwert und Maximumwert.98

11 Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Christian Grosse-Siestrup, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Nicht nur der fachliche Rat sondern auch seine Geduld, Vertrauen und motivierenden Worte waren wertvoll und halfen diese Doktorarbeit fertig zu stellen.

Herrn Dr. Frank Ulrich danke ich für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen. Vor allem der Durchführung der notwendigen Operationen mit seinem Team gebührt ein großes Dankeschön. Weiterhin gilt mein Dank meinen Mitdoktorandinen Sandra Höfer und Andrea Preuß, den Medizinisch Technischen Assistenten der Tierexperimentellen Einrichtungen der Charité und den Tierpflegern für das Mitwirken am praktischen Teil dieser Arbeit.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Freundin und Kollegin Frau Dr. Katharina Schmidt-Bleek bedanken. Ihr Zuspruch, ihre wertvollen Ratschläge, und die Zeit, die sie verwendet hat, um diese Arbeit durchzulesen, waren mir sehr wichtig.

Frau Dr. B. Rudolf, für die gute Zusammenarbeit: Herzlichen Dank für die unterstützende Hilfe bei dem Analysieren der lichtmikroskopischen Bilder und dem Erstellen des Auswertungsbogens.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Bachmann, für seine fachliche Unterstützung bei der Auswertung der elektronmikroskopischen Bilder bedanken.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Petra Schrade bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und immer ein aufmunterndes Wort übrig hatte. Vielen Dank für die Unterstützung!

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Michael Höppenstein für das Aufbringen von Geduld und Hilfsbereitschaft bei computertechnischen Fragen. Dank Dir war der Frust über Formatierungsfragen nur von kurzer Dauer.

12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Hannah Freund, die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Vergleichende Untersuchung der Leberkonservierung mit Biseko- und mit UW -Lösung im Modell der normotherm hämoperfundierte Schweineleber“ eigenständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, angefertigt zu haben. Alle öffentlichen Quellen sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation habe ich noch nicht einem anderen Prüfungsausschuss an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt.

Bonn, den 24.6.2010

Hannah Freund