

Aus der Chirurgischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung und Evaluation eines Modells für die duale
normotherme *ex-vivo*-Perfusion von Rattenlebern

Development and evaluation of a dual vessel normothermic *ex vivo*
perfusion model for rat liver grafts

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Johannes Claussen

aus Hamburg

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	3
2. Abstract (Deutsch)	4
3. Abstract (English)	5
4. Einführung	6
5. Methoden	9
5.1. <i>Perfusionskreislauf</i>	9
5.1.1. <i>Entwicklung des grundlegenden sNEVLP-Kreislaufs</i>	9
5.1.2. <i>Finaler sNEVLP-Aufbau</i>	10
5.1.3. <i>Weiterentwicklung zum dNEVLP-Kreislauf</i>	11
5.2. <i>Versuchstiere und Gruppen</i>	12
5.3. <i>Organentnahme</i>	13
5.4. <i>Ablauf der Perfusion</i>	15
5.5. <i>Zusammensetzung des Perfusats</i>	15
5.6. <i>Messung biochemischer Parameter und Blutgasanalyse</i>	16
5.7. <i>Berechnung des Sauerstoffverbrauchs</i>	16
5.8. <i>Histopathologische Aufarbeitung</i>	17
5.9. <i>Gallengangsanalytik</i>	17
5.10. <i>Statistische Auswertung</i>	18
6. Ergebnisse	18
6.1. <i>Allgemeine Versuchs- und Perfusionsbedingungen</i>	18
6.2. <i>Etablierung der dualen Perfusion und der Vasodilatation mittels Metamizol</i>	19
6.2.1. <i>Perfusionsdruck</i>	19
6.2.2. <i>Leberfunktion</i>	20
6.2.3. <i>Leberschaden und Histopathologie</i>	21
6.2.4. <i>Gallengangsanalytik</i>	21
6.3. <i>Vergleich von optimierter dNEVLP und sNEVLP</i>	22
6.3.1. <i>Perfusionsdruck und Leberfunktion</i>	22
6.3.2. <i>Leberschaden und Histopathologie des Lebergewebes</i>	23
6.3.3. <i>Gallengangsanalytik</i>	23
7. Diskussion	24
8. Literaturverzeichnis	30
9. Eidesstattliche Versicherung	34
10. Ausführliche Anteilserklärung	35
11. Auszug aus der Journal Summary List	36
12. Exemplar der ausgewählten Publikation	40
13. Anhang mit Originaldaten	56
14. Lebenslauf	60
15. Publikationsliste	61
16. Danksagung	62

1. Abkürzungsverzeichnis

NEVLP	Normotherme <i>ex vivo</i> Leberperfusion
sNEVLP	portalvenöse (<i>single vessel</i>) normotherme <i>ex vivo</i> Leberperfusion
dNEVLP	duale (<i>dual vessel</i>) normotherme <i>ex vivo</i> Leberperfusion
ECD	Spender/-innen mit erweiterten Spenderkriterien (<i>extended criteria donors</i>)
SCS	statische Kaltlagerung (<i>static cold storage</i>)
ALT	Alaninaminotransferase
AST	Aspartataminotransferase
GGT	Gammaglutamyltransferase
LDH	Laktatdehydrogenase
HE	Hämatoxylin und Eosin
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotid transferase dUTP nick end labeling</i>

2. Abstract (Deutsch)

Die normotherme *ex vivo* Perfusion von Lebertransplantaten (normothermic *ex vivo* liver perfusion, NEVLP) ist eine vielversprechende Strategie zur Erweiterung des Spenderpools in der Lebertransplantation. Der Mangel an verfügbaren Spenderlebern macht immer häufiger die Transplantation qualitativ grenzwertiger Organe von Spender/-innen, die sogenannte erweiterte Spenderkriterien erfüllen, notwendig. Die Transplantation solcher Organe führt allerdings häufig zu schwerwiegenden Komplikationen. Die normotherme *ex vivo* Perfusion ermöglicht hier eine optimierte Organpräservierung und damit ein verbessertes Transplantationsoutcome. Darüber hinaus bietet sie die Möglichkeit, das metabolisch aktive Organ zu evaluieren und es sogar metabolisch zu reconditionieren. Um die Möglichkeiten der NEVLP erforschen zu können, sind funktionierende Kleintiermodelle notwendig. Gängige in der Literatur zu findende Kleintiermodelle setzen fast ausschließlich auf die alleinige Perfusion der Leber durch die Pfortader (single vessel normothermic *ex vivo* liver perfusion, sNEVLP). Nur wenige Arbeiten untersuchen die duale Perfusion durch Pfortader und Leberarterie (dual vessel normothermic *ex vivo* liver perfusion, dNEVLP). Arbeiten, die eine prolongierte dNEVLP ($\geq 6h$) realisieren und adäquate Vergleiche der beiden Strategien finden sich in der Literatur nicht.

Für diese Arbeit wurde ein miniaturisiertes Perfusionssystem für die dNEVLP von Rattenlebern entwickelt. In vier Gruppen wurden Lebern männlicher Wistarratten für sechs Stunden bei 37°C normotherm perfundiert. In drei Gruppen wurde die dNEVLP mit verschiedenen Protokollen zur Vasodilatation und arteriellen Druckkontrolle mittels Metamizol untersucht. In der vierten Gruppe wurde für den Vergleich von dNEVLP und sNEVLP die konventionelle sNEVLP durchgeführt. Während der Perfusion wurden kontinuierlich Flussraten und Perfusionsdrücke und in regelmäßigen Abständen Blutgase, Sauerstoffverbrauch, Transaminasen, Galleproduktion und Konzentrationen von LDH und GGT in der Galle gemessen. Nach Perfusionsende wurde das Leber- und Gallengangsgewebe histopathologisch untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die suffiziente Vasodilatation mittels Metamizol während der dNEVLP zu niedrigeren Konzentrationen von Transaminasen im Perfusat, höherer Galleproduktion und weniger Nekrose in Leber- und Gallengangsgewebe führte. Der Vergleich von dNEVLP und sNEVLP zeigte niedrigere Konzentrationen von Transaminasen, mehr Galleproduktion, niedrigere Konzentrationen von LDH und GGT in der Galle und weniger Nekrose in Leber- und Gallengangsgewebe nach dNEVLP.

In dieser Arbeit präsentieren wir ein funktionsfähiges Modell für die duale *ex vivo* Perfusion der Rattenleber (dNEVLP). Wir zeigen, dass die suffiziente Vasodilatation Voraussetzung für die erfolgreiche dNEVLP über sechs Stunden ist. Wir zeigen außerdem, dass die dNEVLP im Vergleich mit der sNEVLP eine bessere Organpräservierung ermöglicht.

3. Abstract (English)

The mismatch between the demand for donor organs and the grafts available for liver transplantation has become a significant problem in recent years. The severe organ shortage makes the use of marginal organs from extended criteria donors (ECD) necessary more and more often. However, transplanting such organs leads to considerably higher rates of severe complications and organ failure. Normothermic *ex vivo* liver perfusion (NEVLP) could help solving this problem. NEVLP enables better organ preservation and thus improves transplantation outcome, especially for ECD grafts. Furthermore, it can provide the opportunity to evaluate and even recondition the metabolically active organ. In order to further investigate the preservation, evaluation and reconditioning of liver grafts using NEVLP, small animal models are needed. Commonly used small animal NEVLP models mostly employ single vessel NEVLP (sNEVLP) through the portal vein alone. Only very few models use the hepatic artery as an additional perfusion route and perform dual vessel NEVLP (dNEVLP). Studies that realize prolonged dNEVLP (≥ 6 h) and comparisons of the two strategies can currently not be found in the literature available.

For this work, we developed a perfusion circuit for dNEVLP. In that circuit four groups of livers procured from male Wistar rats were perfused for six hours at 37°C. In three groups dNEVLP was performed investigating different protocols for vasodilatation using metamizole to control arterial perfusion pressures. In one group common sNEVLP was performed in order to compare the two strategies. Throughout perfusion, flow rates and perfusion pressure were continuously monitored. Perfusate transaminases, blood gases, bile production and levels of LDH and GGT in the bile were measured regularly. After perfusion, samples of liver and bile duct tissue were analyzed histopathologically.

Our results show that sufficient vasodilatation using metamizole lead to lower levels of perfusate transaminases, higher bile production and less necrosis in both liver and bile duct tissue. The comparison between dNEVLP and sNEVLP showed that dNEVLP lead to lower levels of transaminases, higher bile production, lower levels of LDH and GGT in the bile and less damage to liver and bile duct tissue.

In this work, we present a model for six hours of dNEVLP. We show that sufficient vasodilatation is necessary to successfully conduct six hours of dNEVLP. Furthermore, we show that dNEVLP leads to improved organ preservation when compared to sNEVLP.

Abstract in Anlehnung an die Publikation “*Dual versus single vessel normothermic ex vivo perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation*“(1).

4. Einführung

Der folgende Manteltext ist eine ausführliche Darstellung des wissenschaftlichen Hintergrunds, der zugrundeliegenden Fragestellungen, der verwendeten Methoden und erzielten Ergebnisse, sowie eine eingehende Diskussion des wissenschaftlichen Erkenntnisgewinns aus der Entwicklung und Evaluation eines Modells für die duale normotherme *ex vivo* Perfusion der Rattenleber. Dies wurde in kürzerer Form bereits im Juli 2020 in der Publikation "*Dual versus single vessel normothermic ex vivo perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation*" in dem Fachjournal *Plos One* veröffentlicht (1).

Die Lebertransplantation ist nach wie vor die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit für eine Vielzahl von Lebererkrankungen. Hierzu gehören zum Beispiel die ethyltoxische und virale Leberzirrhose, autoimmune Lebererkrankungen, wie die primär sklerosierende und die primär biliäre Cholangitis, und gewisse Stadien des hepatozellulären Karzinoms. Es besteht jedoch eine deutliche Diskrepanz zwischen der Anzahl der für eine Lebertransplantation gelisteten Patienten/-innen und dem Angebot an verfügbaren Organen (2). In Deutschland sind die Gründe hierfür vielfältig. Neben gesellschaftlich-kulturell bedingten Ursachen hat die Organspendebereitschaft auch aufgrund des Organspendeskandals im Jahre 2012 deutlich abgenommen. Hinzu kommt, dass die deutsche Gesetzgebung, trotz jüngerer Reformversuche, die aktive Einwilligung des/der Organspenders/-in oder einer/s direkten Verwandten verlangt. Sie verbietet außerdem, anders als in anderen europäischen Ländern, die Entnahme und Transplantation von Organen nach dem Tod durch Kreislaufstillstand. Zuletzt verringern auch Fortschritte in Intensivmedizin und Neurochirurgie und die sich stetig verbessernde palliativmedizinische Versorgung die Anzahl potenzieller Organspender/-innen (3). Zusätzlich verschärft wird diese Situation durch das stetig steigende Durchschnittsalter und die steigende Prävalenz von Adipositas und *Steatosis hepatis* in der Bevölkerung der westlichen Industrienationen (4, 5). Als Folge steigt der Anteil qualitativ grenzwertiger Spenderorgane, die von Spender/-innen stammen, die s.g. erweiterte Spenderkriterien erfüllen (*extended criteria donors, ECDs*) (6-8). Erweiterte Spenderkriterien sind vor allem hohes Alter und eine ausgeprägte *Steatosis hepatis*, aber auch erhöhte laborchemische Parameter für einen Leberschaden, hämodynamische Instabilität, Alkoholkonsum, Infektionsgeschehen (hier insbesondere virale Hepatitiden), Hyponatriämie und die Organentnahme nach Kreislaufstillstand (9). Daten des *United Network for Organ Sharing (UNOS)* zeigen insbesondere eine steigende Zahl an Organspender/-innen, die älter als 65 Jahre sind und/oder einen BMI von über 30 kg/m² und damit ein deutlich erhöhtes Risiko für eine *Steatosis hepatis* aufweisen (10). Tatsächlich erfüllen in Deutschland bis zu 75% der transplantierten Lebern wenigstens ein erweitertes Spenderkriterium (11). Die Transplantation solcher „marginaler“ Organe ist jedoch nicht unproblematisch. Sie erzielt deutlich schlechtere Resultate als die Transplantation von Organen fitter Spender/-innen. *ECD*-Lebern zeigen deutlich häufiger schwerwiegende Komplikationen und Organdysfunktionen nach

Transplantation als nicht-marginale Lebern (12-15). Als wichtiger Grund hierfür gilt die erhöhte Anfälligkeit alter und verfetteter Lebern für den Ischämie-Reperfusionsschaden nach statischer Kaltlagerung (SCS) und konsekutiver warmer Reperfusion (15, 16). Über verschiedene molekulare Mechanismen entstehen durch die kalte Lagerung zwischen Organentnahme und Implantation und die anschließende warme Reperfusion zelluläre Schäden. Im Falle verfetteter Lebern sind dies unter anderem die Störung der Mikrozirkulation und des hepatischen Blutflusses durch erhöhte Zellvolumina und eine verstärkte inflammatorische Immunantwort mit einer gesteigerten Aktivität neutrophiler Granulozyten sowie einer gesteigerten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumornekrosefaktor- α und Interleukin-1 (17). In alten Lebern wurden insbesondere die gesteigerte Freisetzung intrazellulärer Oxidantien und eine gestörte mitochondriale Funktion der Hepatozyten als Ursache für einen verstärkten Ischämie-Reperfusionsschaden identifiziert (18, 19).

Die Notwendigkeit, *ECD*-Organe zu transplantieren, und die resultierenden Komplikationen erfordern die Entwicklung neuer Strategien und Methoden zur Organpräservierung im Zuge der Transplantation. Als vielversprechende Alternative zur statischen Kaltlagerung auf Eis gilt seit einiger Zeit das Konzept der extrakorporalen Maschinenperfusion (20). Hier wird die Leber zwischen Organentnahme und Implantation in einem artifiziellen Kreislauf maschinell perfundiert. In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Strategien für die extrakorporale Maschinenperfusion der Leber entwickelt, mit unterschiedlichen Herangehensweisen in Bezug auf die Wahl des Perfusionsmediums, den genauen Zeitpunkt und Zeitraum der Maschinenperfusion und vor allem die Wahl der Perfusionstemperatur (21). Letztere ist einer der meist diskutierten Aspekte der extrakorporalen Maschinenperfusion der Leber. Bereits klinisch erprobte Perfusionstemperaturen reichen von hypotherm (4°C) bis hin zu normotherm (37°C) (22, 23). Während die hypotherme Maschinenperfusion vor allem die Verlangsamung des Stoffwechsels und die Elimination potenziell toxischer Metabolite zum Ziel hat, setzt man bei der normothermen Maschinenperfusion auf die Aufrechterhaltung eines aktiven Metabolismus und nahezu physiologischer Bedingungen. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass die normotherme extrakorporale Leberperfusion (auch: normotherme *ex vivo* Leberperfusion, NEVLP) die Präservierung sowohl marginaler als auch nicht-marginaler Lebern im Vergleich zur statischen Kaltlagerung verbessert (24-26). Im Gegensatz zur hypothermen Maschinenperfusion bietet die NEVLP darüber hinaus die Möglichkeit der metabolischen Evaluation des zu transplantierenden Organs während der Phase der Perfusion. Auch Strategien zur pharmakologischen Intervention und metabolischen Rekonditionierung der Leber im Zuge der Transplantation könnten mittels NEVLP realisiert werden (27, 28). Solche Strategien, wie beispielsweise die Entfettung steatotischer Organe oder auch die metabolische Verjüngung alter Organe, sind auf einen aktiven Metabolismus angewiesen, wie er nur unter normothermen Bedingungen aufrecht zu erhalten ist. Organe, die aufgrund hohen Alters oder Verfettungsgrades als nicht transplantabel eingestuft und folglich nicht transplantiert

würden, könnten mittels solcher Methoden wieder dem Pool der transplantablen Organe zugeführt und dieser somit deutlich vergrößert werden.

Verschiedene klinische Studien haben gezeigt, dass die normotherme *ex vivo* Leberperfusion eine sichere und sinnvolle Alternative zur statischen Kaltlagerung darstellt (22, 29). Ihre Implementierung in den klinischen Alltag befindet sich jedoch, insbesondere in Deutschland, noch in einem sehr frühen Stadium.

Um Grundlagenforschung zur normothermen *ex vivo* Leberperfusion betreiben zu können und insbesondere, um Strategien zur Organrekonditionierung mittels NEVLP zu entwickeln, werden weiterhin Tiermodelle benötigt. Da Großtiermodelle kostenintensiv sind und eine hochentwickelte Infrastruktur benötigen, erscheinen Kleintiermodelle, obwohl technisch anspruchsvoller, hierzu besser geeignet. In den letzten Jahren wurden verschiedene Modelle für die normotherme *ex vivo* Perfusion von Rattenlebern entwickelt und vorgestellt. Die meisten dieser Modelle beschränken sich auf die singuläre Perfusion der Leber durch die Pfortader (single vessel normothermic *ex vivo* liver perfusion, sNEVLP), eine Strategie, die sich als funktional und technisch einfach erwiesen hat (30). Auch in unserer Arbeitsgruppe haben wir ein solches sNEVLP-System etabliert (31, 32). Führt man sich jedoch die physiologische Versorgung der Leber vor Augen, erscheint eine duale Perfusion durch beide Lebergefäße, die Pfortader und die Leberarterie, sinnvoller. Auch würde eine duale Perfusionsstrategie die Vergleichbarkeit zu klinischen Perfusionssystemen erhöhen, die überwiegend auf die duale Leberperfusion setzen (22, 29, 33). Trotzdem wurden bisher nur wenige Modelle zur dualen normothermen *ex vivo* Perfusion der Rattenleber entwickelt. Vergleichende Arbeiten, die die Gleichwertigkeit beider Strategien oder sogar die Überlegenheit einer der beiden Methoden zeigen, sind in der Literatur nicht verfügbar.

In dieser Arbeit beschreibe ich die Entwicklung eines Modells zur dualen normothermen *ex vivo* Perfusion der Rattenleber (dual vessel normothermic *ex vivo* liver perfusion, dNEVLP). Es stellt eine Weiterentwicklung und Optimierung eines sNEVLP-Modells dar, an dessen Entwicklung ich beteiligt war. Ich gehe insbesondere auf die Etablierung einer suffizienten Vasodilatation mittels Metamizol als essentiellen Schritt in der Entwicklung des dNEVLP-Modells ein. Aus Modellen für die normotherme *ex vivo* Perfusion von porcinen und humanen Lebern ist bekannt, dass die duale Leberperfusion, im Gegensatz zur rein portalvenösen Perfusion, eine suffiziente Vasodilatation notwendig macht (29, 34). Wir postulierten, dass dies auch für die duale Perfusion der Rattenlebern gelten würde. Für die humanen und porcinen Modelle wurden zu diesem Zweck bereits erfolgreich verschiedene Vasodilatoren erprobt (34). Für die duale Perfusion der Rattenleber finden sich keine solchen Daten. Im Zuge der Suche nach einem gut verfügbaren, sicheren und potenten Vasodilatator stießen wir auf Metamizol. Metamizol ist ein Analgetikum mit bekannten spasmolytischen und vasodilatorischen Eigenschaften. *Kaya et al.* konnten zeigen, dass Vasospasmen der Rattenleberarterie durch die topische Applikation von Metamizol effektiv behandelt werden können (35). Wir untersuchten, ob die Applikation von Metamizol in die Leberarterie eine suffiziente Vasodilatation und Kontrolle des arteriellen Perfusionsdrucks erreichen würde.

Ich beschreibe außerdem den zur Evaluation unseres neu entwickelten dNEVLP-Modells durchgeführten Vergleich mit unserem bereits erfolgreich etablierten sNEVLP-Modell (32).

5. Methoden

5.1. Perfusionskreislauf

5.1.1. Entwicklung des grundlegenden sNEVLP-Kreislaufs

In mehreren Schritten wurde in unserer Arbeitsgruppe der grundlegende Aufbau des sNEVLP-Kreislaufs, wie bei *Nösser et al.* beschrieben, entwickelt (31). In Anlehnung an den Perfusionskreislauf von *Tolboom et al.* setzte sich unser Aufbau zunächst aus einer gläsernen Perfusionskammer, einem Oxygenator, einer Blasenfalle und einer Rollerpumpe zusammen. Nachdem erfolglos verschiedene Behältnisse, wie Petrischalen u.a., als Perfusionskammer erprobt worden waren, konzipierten wir einen Glasreaktor mit verschiedenen Ein- und Auslässen, der hierfür eigens angefertigt wurde (Gaßner Glastechnik GmbH, München, Deutschland). Ein wichtiger Zwischenschritt in der Entwicklung dieses Reaktors war die Untersuchung der optimalen Position der Leber darin. Einem in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll zur Leberdezellularisierung folgend begannen wir, unsere Etablierungsversuche mit hängenden Lebern. Diese Position stellte sich jedoch schnell als problematisch heraus. Insbesondere der Gallefluss wurde durch den sich immer wieder verdrehenden und abknickenden *Ductus hepaticus communis* entscheidend behindert. Als beste Position erwies sich im Folgenden die Lage der Leber auf der apikalen, zwerchfellnahen Seite, sodass der Hilus nach oben hin exponiert lag. In dieser Position konnte eine stabile Lage der Lebergefäße erreicht und so eine sichere Perfusion und ein ungehinderter Galleabfluss erreicht werden.

Ziel der nächsten Entwicklungsschritte war die Miniaturisierung des Kreislaufs. Diese war unerlässlich, um eine Reduktion der für jeden Versuch notwendigen Ressourcen, insbesondere der notwendigen Erythrozyten, und einen ausreichenden Hämatokrit im Perfusat zu erreichen. Das Füllvolumen des Oxygenators wurde in mehreren Schritten von 31 ml (Oxygenator „Kids“, Sorin Group, Mailand, Italien) auf 10 ml (Silikonmembranoxygenator, Radnoti, Dublin, Irland) reduziert. Die Blasenfalle wurde ebenfalls sukzessive verkleinert. Außerdem wurde der Durchmesser der als Verbindungsschläuche genutzten Heidelberger Verlängerungen (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) von 3 mm auf 1,2 mm verkleinert. Das Gesamtvolumen des Perfusionskreislaufs konnte so in mehreren Schritten von ursprünglich 100 ml auf 50 ml reduziert werden.

Als letzten Schritt der Entwicklung des sNEVLP-Kreislaufs erweiterten wir den Aufbau um einen Dialysekreislauf, wie bei *Gassner et al.* beschrieben (32). Hierfür wurde der Kreislauf um eine Rollerpumpe und eine Dialysekartusche erweitert. Durch die Verwendung einer Kartusche mit einem Füllvolumen von lediglich 2 ml konnte das Gesamtvolumen von 50 ml beibehalten werden.

Mein Anteil an der Entwicklung und Etablierung des sNEVLP-Kreislaufs lag insbesondere in der Etablierung des von Joseph Gassner, Max Nösser und Simon Moosburner entworfenen grundlegenden sNEVLP-Kreislaufs. Ich führte viele der

Perfusionsversuche selbst durch und entnahm für andere die Organe. Die Asservierung von Proben und Evaluation derselben wurde ebenfalls zu großen Teilen von mir durchgeführt. Das Konzept des Dialysekreislaufs entwickelte ich zusammen mit Joseph Gassner und David Wyrwal. Die Versuche zur Etablierung desselben führte ich ebenfalls zusammen mit Joseph Gassner und David Wyrwal durch.

5.1.2. Finaler sNEVLP-Aufbau

Der aus der oben beschriebenen Entwicklung hervorgegangene finale sNEVLP-Kreislauf setzte sich im Detail aus folgenden Komponenten zusammen (Abbildung 1A): Der maßgefertigten Perfusionskammer mit verschiedenen Ein- und Auslässen für die Verbindung der Lebergefäße und des Gallengangs mit dem Perfusionskreislauf, einer flussgesteuerten Rollerpumpe, einem Oxygenator (Radnoti, Dublin, Irland) und einer gläsernen Blasenfalle zur Verhinderung von Luftembolien. Die Windkesselfunktion der Blasenfalle absorbierte die durch die Rollerpumpe verursachten Druckschwankungen und sorgte für einen laminaren Fluss über die Pfortader. Der Oxygenator hatte ein Füllvolumen von 10 ml. Durch die kontinuierliche Insufflation eines Gasgemischs aus 95% Sauerstoff, und 0% Kohlenstoffdioxid wurde über eine Silikonmembran ein suffizienter Gasaustausch sichergestellt. Eine weitere Rollerpumpe führte mit einer Laufrate von 10 ml/min

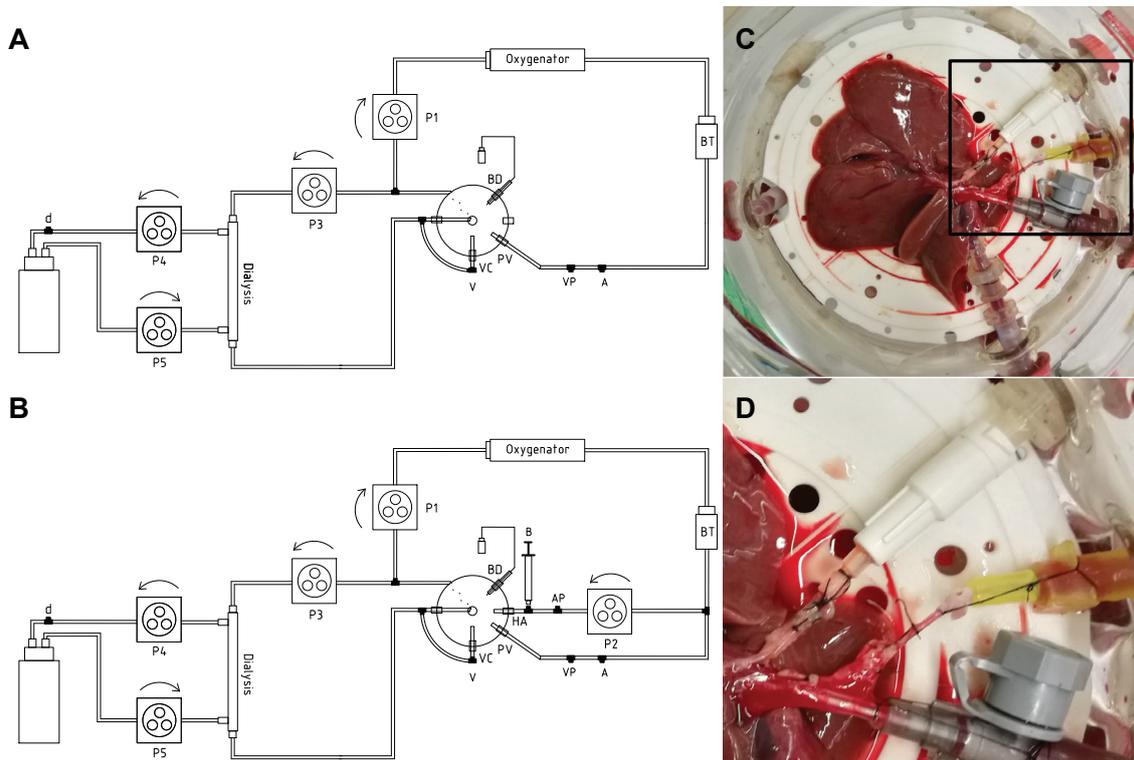


Abbildung 1: **Finale Perfusionskreisläufe für sNEVLP und dNEVLP**

A Technische Zeichnung des sNEVLP-Kreislaufs bestehend aus der Perfusionskammer mit Einlass für die Portalkvene (PV) und Auslässen für die Vena cava (VC) und den Gallengang (BD), dem Oxygenator, der Blasenfalle (BT), dem Dialysekreislauf, vier Rollerpumpen (P1, P3-5), den Auslässen für die arterielle (A), venöse (V) und Dialysatprobenentnahme (d) und die Messung des portalvenösen Perfusionsdrucks (VP). **B** Technische Zeichnung des dNEVLP-Kreislaufs mit einem zusätzlichen Einlass für die Leberarterie (HA), einer fünften Rollerpumpe (P2) und zwei zusätzlichen Auslässen für die Metamizolapplikation (B) und die Messung des arteriellen Perfusionsdrucks (AP). **C** Leber in der Perfusionskammer in der Draufsicht mit kannüliertem Gallengang, Leberarterie, Portalkvene und Vena cava (in dieser Reihenfolge von oben nach unten). **D** Nahaufnahme der kannülierten Leberarterie mit dem Aortenpatch (gelbe Kanüle). Quelle: *Claussen et al. (1)*

Perfusat aus dem venösen Ausfluss der Leber der Dialysekartusche (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) zu. Der Dialysatfluss wurde von zwei Rollerpumpen erzeugt, jeweils der Dialysekartusche vor- und nachgeschaltet, um Volumenverschiebungen ausgleichen zu können. Die Dialysekartusche hatte ein Füllvolumen von 2 ml und eine Membranoberfläche von 115 cm². Als Dialysat wurden 500 ml mit 12 mM Glycin versetzten Ci-Ca-Dialysats K2 (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Der Pfortaderfluss betrug 1 ml/min/g Lebergewicht. Über einen Drucksensor wurde der Pfortaderdruck kontinuierlich gemessen und mittels des Programms BDAS 2.0 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) aufgezeichnet. Der durchschnittliche initiale Pfortaderdruck betrug 5.65 mmHg, Pfortaderdrücke von bis 9 mmHg wurden als physiologisch angesehen. Über einen *Perfusor*® (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) wurden kontinuierlich 1000 IE/h Heparin und 500 µl/h 1,2 M Glycin infundiert.

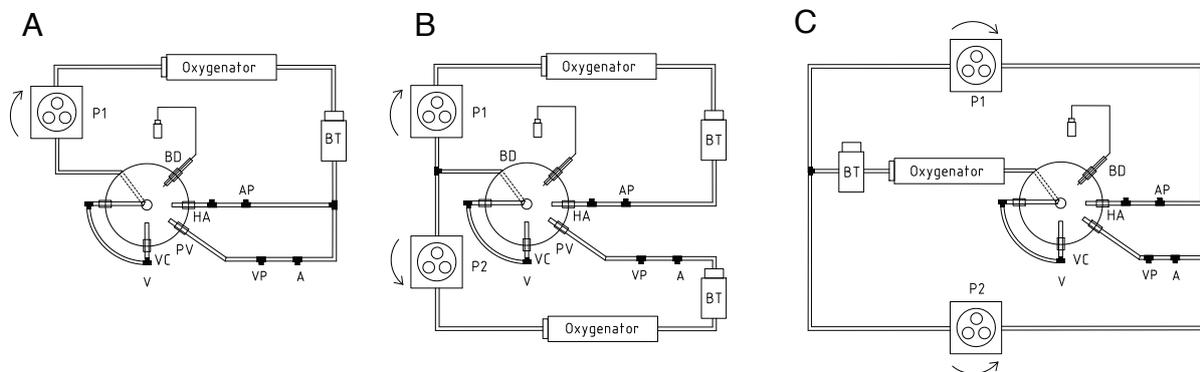


Abbildung 2: **Entwicklungsstufen des dualen Perfusionskreislaufs**

A Aufteilung des Gesamtkreislaufs in den arteriellen und portalvenösen Schenkel hinter der Blasenfalle (BT) mit einer gemeinsamen Pumpe (P1). **B** Aufteilung direkt nach dem venösen Ausfluss aus der Perfusionskammer in zwei komplett getrennte Kreisläufe mit jeweils einer Pumpe (P1, P2), einem Oxygenator und einer Blasenfalle (BT). **C** Aufteilung des Gesamtkreislaufs hinter einer gemeinsamen Blasenfalle (BT) und einem gemeinsamen Oxygenator mit zwei Pumpen (P1, P2).
 Quelle: Eigens von Felix Claussen für diese Dissertation angefertigt.

5.1.3. Weiterentwicklung zum dNEVLP-Kreislauf

Für die duale Perfusion konzipierte ich eine Erweiterung des sNEVLP-Kreislaufs um einen Teil für die Perfusion der Leberarterie. Hierzu untersuchte ich verschiedene Konzepte. Den Perfusatfluss einfach nach der Blasenfalle in zwei Schenkel zu teilen hatte zur Folge, dass Leberarterie und Pfortader jeweils die Hälfte des Gesamtflusses zugeführt wurde (Abbildung 2A). Die angestrebten Flussraten für die beiden Gefäße konnten so nicht erreicht werden, da Pfortader- und Leberarterienfluss nicht unabhängig voneinander eingestellt werden konnten. Die naheliegendste Strategie, dies zu erreichen, lag in der Konstruktion zweier weitestgehend separater Kreisläufe, die nach dem venösen Ausfluss der Leber getrennt wurden und erst in den Lebersinusoiden wieder zusammenliefen (Abbildung 2B). Diese Strategie erreichte zwar vollständig unabhängig einzustellende Flüsse über die beiden Lebergefäße, war jedoch mit einem ungleich höheren Materialaufwand verbunden. Jeder Teilkreislauf musste mit einem Oxygenator und einer Blasenfalle bestückt werden, die jeweils in Flussrichtung hinter der jeweiligen Rollerpumpe installiert werden mussten. Zwei Oxygenatoren und zwei Blasenfallen hätten das im Zuge der oben beschriebenen Miniaturisierung reduzierte Volumen des Kreislaufs jedoch wieder annähernd verdoppelt. Dies hätte, bei gleichem

angestrebten Hämatokrit, auch eine Verdopplung der notwendigen Erythrozyten und damit der für die Blutgewinnung zu euthanasierenden Tiere bedeutet. Aus Tierschutz- und Kostengründen verfolgte ich dieses Konzept nicht weiter. Die Pumpen in Flussrichtung nach einem gemeinsamen Oxygenator und einer gemeinsamen Blasenfalle zu installieren und das Perfusat somit gewissermaßen durch diese hindurchzuziehen, resultierte im Kollaps der Verbindungsschläuche und des Silikonschlauchs im Oxygenator und war somit auch keine valide Option (Abbildung 2C). Als beste Strategie erwies sich der finale dNEVLP-Aufbau, wie er in Abbildung 1B gezeigt ist. Hier zweigte eine zweite Rollerpumpe, der ersten Pumpe, dem Oxygenator und der Blasenfalle nachgeschaltet, eine definierte Menge des Perfusats aus dem Hauptkreislauf ab und erzeugte einen kontinuierlichen Fluss über die Leberarterie. Durch die Positionierung der arteriellen Pumpe in Flussrichtung hinter der Blasenfalle wurde deren Windkesselfunktion umgangen und so der pulsatile Fluss der Rollerpumpe direkt in die Leberarterie weitergeleitet. Es wurde so eine Druckamplitude von ca. 25 mmHg erreicht und die physiologische arterielle Perfusion der Leber nachempfunden. Die Flussrate der ersten Rollerpumpe wurde in den dNEVLP-Gruppen auf 1,1 ml/min/g Lebergewicht erhöht und für die zweite, arterielle Rollerpumpe ein Fluss von 0,1 ml/min/g Lebergewicht festgesetzt. Insgesamt wurde so ein laminarer Fluss von 1 ml/min/g Lebergewicht über die Pfortader und ein pulsatiler Fluss von 0,1 ml/min/g Lebergewicht über die Leberarterie erreicht. Ein zweiter Drucksensor ermöglichte die kontinuierliche Messung des arteriellen Perfusionsdrucks. Der durchschnittliche initiale mittlere arterielle Druck lag bei 48,8 mmHg. Arterielle Spitzendrücke bis zu 110 mmHg wurden als physiologisch angesehen. Der Rest des Perfusionskreislaufs unterschied sich nicht von dem für sNEVLP beschriebenen.

In den dNEVLP-Gruppen mit Metamizolapplikation applizierte ich entweder stündlich oder ab einem arteriellen Druck von 110 mmHg Boli von 100 mg Metamizol-Natrium (Winthrop Arzneimittel GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) in den arteriellen Schenkel des Perfusionskreislaufs. Alle Perfusionsversuche wurden in einem Wärmeschrank bei 37° C durchgeführt.

Das Konzept des dNEVLP-Kreislaufs als Erweiterung des sNEVLP-Kreislaufs wurde von mir entwickelt und von mir mit der Hilfe von David Wyrwal, Simon Moosburner und Joseph Gassner etabliert.

5.2. Versuchstiere und Gruppen

Als Versuchstiere wurden männliche Wistarratten von *Janvier* (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Haltung und Prozeduren wurden in enger Abstimmung mit der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité (FEM) und dem Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin (LaGeSo, Organentnahmeanzeige O0365/11) geplant und durchgeführt. Die Tiere wurden zur Gewöhnung an die neue Umgebung mindestens eine Woche in Gruppengrößen von 2-5 Tieren und einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Futter und Wasser waren *ad libitum* verfügbar. Die Organentnahme wurde frühestens nach einer Woche und mit einem Gewicht von 280-350 g durchgeführt. Die Tiere wurden von mir zufällig in vier Gruppen (n = 4), drei dNEVLP- und eine sNEVLP-Gruppe, eingeteilt (Tab. 1). In der

dNEVLP^M-Gruppe wurde die duale Perfusion ohne Vasodilatation durchgeführt. In der dNEVLP^{MH}-Gruppe wurde ab der zweiten Stunde der Perfusion stündlich ein Bolus Metamizol appliziert. In der dNEVLP^{MP}-Gruppe fand die Applikation des Metamizolbolus bei Bedarf ab einem Druckgrenzwert von 110 mmHg statt. In der sNEVLP-Gruppe wurden die Lebern rein portalvenös und ohne Vasodilatation perfundiert.

dNEVLP^M Duale Perfusion, keine Vasodilatation	dNEVLP^{MH} Duale Perfusion, Metamizol stündlich
dNEVLP^{MP} Duale Perfusion, Metamizol bei Bedarf	sNEVLP Portalvenöse Perfusion, keine Vasodilatation

Tabelle 1: **Versuchsgruppen.** Quelle: Eigens von Felix Claussen für diese Dissertation angefertigt

5.3. Organentnahme

Für die Leberentnahme wurden die Tiere mittels Isofluran-Inhalation und subkutaner Injektion von 100 mg/kg Metamizol (Winthrop Arzneimittel GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 12 mg/kg Ketamin (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) in Allgemeinanästhesie versetzt. Nach Prüfung der Narkosetiefe durch mehrfaches Setzen eines Schmerzreizes wurde die Bauchhöhle eröffnet. Die Ligg. falciforme und coronarium wurden durchtrennt, alle Leberlappen mobilisiert und nach kranial umgeklappt. Die Vv. oesophageales wurden ligiert. Zur optimalen Exposition des Leberhilus wurde der Darm mobilisiert und seitlich aus der Bauchhöhle ausgelagert. Die A. und V. *pancreaticoduodenalis* wurden ligiert und der *Ductus hepaticus communis* über eine Fischmaulinzision mittels einer eigens angefertigten Gallengangsdrainage katheterisiert. Der Truncus coeliacus wurde aufgesucht und die Aa. *gastrica sinistra* und *splenica* ligiert. Nach Präparation der V. *cava inferior* und *Aorta abdominalis* wurden 500 IE Heparin in 1 ml Ringer-Laktat-Lösung diluiert und in die V. *cava inferior* injiziert. Anschließend wurde die *Aorta abdominalis* zur Blutentnahme kanüliert. Durch den vollständigen Blutentzug und die Durchtrennung der intrathorakalen V. *cava inferior* kam der Kreislauf vollständig zum Erliegen. Die Kanüle wurde in der *Aorta* belassen, diese intrathorakal abgeklemmt und mit 20 ml 4° C kalter HTK-Lösung (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Deutschland), versetzt mit Glycin in einer Konzentration von 12 mM, gespült. Nun erfolgte die Kanülierung der Pfortader über eine Fischmaulinzision mittels einer herkömmlichen 16 G Vasofix® Safety Kanüle (B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland) und die Spülung der Leber mit 20 ml kalter glycinhaltiger HTK-Lösung. Die Zeit zwischen Blutentnahme und kalter Spülung der Leber (warme Ischämiezeit) betrug maximal 15 Minuten. Die infrahepatische V. *cava inferior* wurde mittels einer eigens angefertigten Plastikkanüle kanüliert und die suprahepatische V. *cava inferior* ligiert.

Für die duale Leberperfusion erfolgte nun die Kanülierung der A. *hepatica communis*. Hier untersuchten wir verschiedene Methoden. Die direkte Kanülierung der A.

hepatica communis erwies sich schnell als technisch sehr schwierig und zeitaufwändig, was die kalte Ischämiezeit in der Regel deutlich verlängerte (Abbildung 3B). Ein pragmatischerer Ansatz war, die im Verlauf der Operation ohnehin bereits kanülierte *Aorta abdominalis* mit zu entnehmen und die *A. hepatica communis* über selbige zu perfundieren (Abbildung 3A). Hier ergaben sich in der Praxis allerdings zwei Probleme: Einerseits kam es immer wieder zu Undichtigkeiten und Perfusatsverlust aus den ligierten abdominellen Abgängen der Aorta und andererseits neigten Aorta und Leberarterie nach Einbau in den Perfusionskreislauf aufgrund der Länge der Gefäßstrecke dazu, abzuknicken. Als praktikabler Mittelweg erwies sich schließlich die Kanülierung des *Truncus coeliacus* über einen aus der Aorta ausgeschnittenen Gefäßpatch (Abbildung 1D). Hierbei wurde die verwendete 24 G BD Neoflon™ Kanüle (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) bis jenseits der ligierten Abgänge der *Aa. gastrica sinistra* und *splenica* in die *A. hepatica communis* vorgeschoben und hier mittels einer Ligatur befestigt (Abbildung 3C). Dieses Vorgehen ermöglichte die schnelle Kanülierung und eine sichere Handhabung der Leberarterie beim Einbau in den Perfusionskreislauf. Zuletzt wurden alle ligierten Gefäße durchtrennt, die Leber final mobilisiert und in einen vorgewogenen Behälter mit kalter glycinhaltiger HTK-Lösung gelegt.

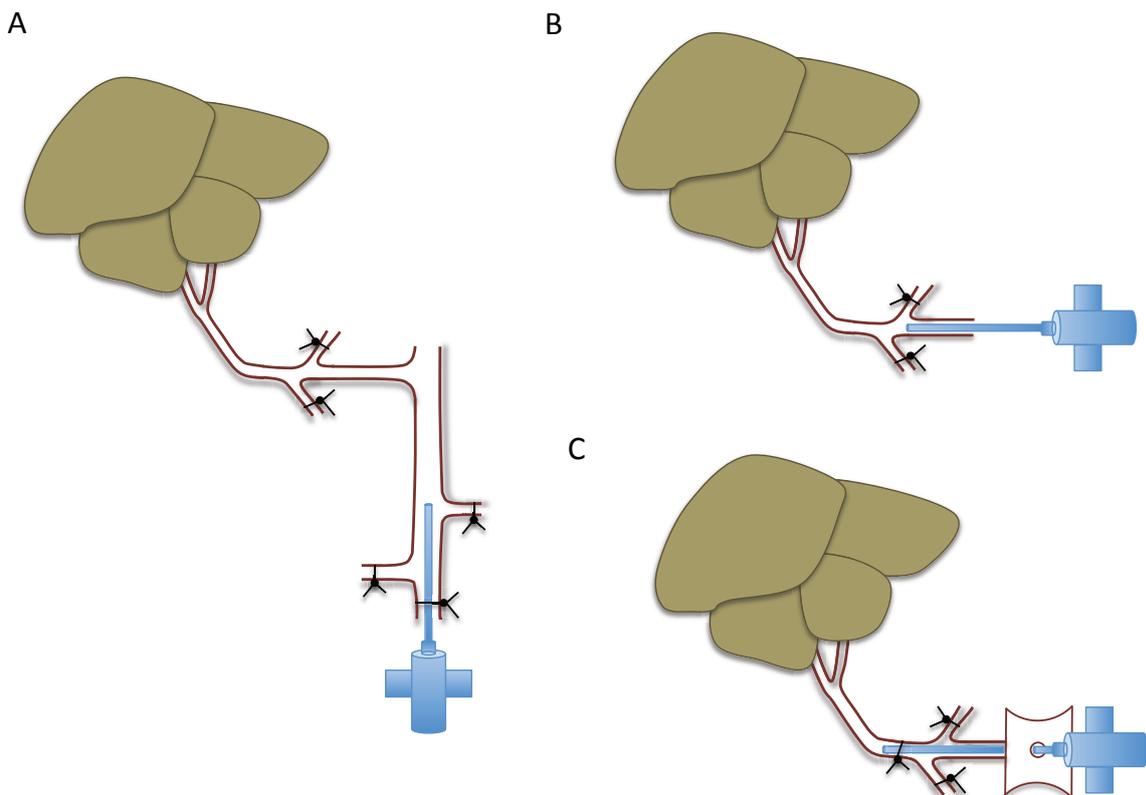


Abbildung 3: **Schematische arteriellen Gefäßpräparation.**

A Kanülierung der Aorta abdominalis mit Ligatur unterhalb des Abgangs der A. renalis dextra. **B** Direkte Kanülierung des Truncus coeliacus nach seinem Abgang aus der Aorta abdominalis. **C** Kanülierung der A. hepatica propria durch einen Aortenpatch mit Ligatur distal der Abgänge von A. lienalis und A. gastrica sinistra. Quelle: Eigens von Felix Claussen für diese Dissertation angefertigt.

5.4. Ablauf der Perfusion

Der Perfusionskreislauf wurde vor oder während der Organentnahme unter sterilen Bedingungen aufgebaut und bereits mit dem angemischtem Perfusat befüllt. Alle Rollerpumpen wurden im Vorfeld geeicht und die Drucksensoren genullt. Vor Einbau in den Perfusionskreislauf wurde das Lebergewicht durch erneutes Wiegen des Transportbehälters und Subtraktion des Vorwertes sowie des kumulativen Gewichts aller Kanülen ermittelt. Die Spülung der Leber wurde makroskopisch mit einem Wert von 1 (makroskopisch keine Spülung) bis 10 (makroskopisch vollständige Spülung) bewertet. Die HTK-Lösung wurde mit 20 ml Ringer-Laktat-Lösung über die Pfortader aus der Leber gespült. Um Druckschäden im arteriellen Stromgebiet zu vermeiden wurde sich hier auf die retrograde Spülung beschränkt. Etwaige Luftblasen, die sich in den Kanülen gefangen hatten, wurden mittels einer feinen Hohnadel entfernt. Die Leber wurde daraufhin so auf einer Silikonmatte in der Mitte der Perfusionskammer platziert, dass der Leberhilus nach oben hin exponiert lag. Für die dNEVLP wurde zuerst die Leberarterie mit dem Kreislauf konnektiert. Der arterielle Fluss wurde vorsichtig gesteigert und die makroskopische arterielle Reperfusion sowie der Perfusionsdruck beurteilt. Auf dieselbe Weise wurde dann beim Anschluss der Pfortader verfahren. Um den Kreislauf zu schließen, wurde zuletzt die *V. cava* an den venösen Abflussschenkel angeschlossen. Für die sNEVLP entfiel der Anschluss der Leberarterie selbstverständlich. Der Schlauch der Gallengangsdrainage wurde in ein vorgewogenes Sammelbehältnis geleitet, um die Galleproduktion kontinuierlich quantifizieren zu können. Die Zeit zwischen kalter Spülung und warmer Reperfusion (kalte Ischämiezeit) betrug maximal 60 Minuten. Nach Anschluss der Leber an den Kreislauf wurden die Perfusionsflüsse langsam über eine Erwärmungsperiode von 15 Minuten erhöht. Zeitpunkt T0 wurde gesetzt, wenn die vollen Flussraten erreicht waren, und die Leber dann für sechs Stunden perfundiert. Alle Perfusionsversuche wurden in dieser Weise von mir durchgeführt.

5.5. Zusammensetzung des Perfusats

Als Perfusionsmedium wurde eine modifizierte Version eines bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierten Zellkulturmediums verwendet (32). Als Grundlage diente *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* + Pyruvat (DMEM), das mit HEPES-Puffer, L-Alanin, L-Glutamin, Penicillin, Streptomycin, Insulin, Fortecortin und Glucagon versetzt wurde (Tabelle 2). Das bei Organentnahme gewonnene Vollblut wurde bei 4°C und 3200 RPM für 15 Minuten zentrifugiert und die Erythrozyten so vom Plasma und den restlichen korpuskulären Blutbestandteilen getrennt. Letztere wurden verworfen. Das Plasma wurde abgesaugt und für spätere Perfusionsversuche eingefroren. 10 ml des Erythrozytenkonzentrats wurden in 35 ml des modifizierten DMEMs suspensiert. 5 ml stammspezifischen Rattenplasmas wurden hinzugefügt, was ein Gesamtvolumen von 50 ml und einen rechnerischen Hämatokrit von 20% ergab. Schließlich wurden dem Perfusionsmedium noch 200 µl (1000 IE) Heparin und 500µl 1,2 M Glycin hinzugefügt. Das Perfusat wurde von mir für jeden Versuch auf diese Weise hergestellt.

Substanz	Konzentration	Menge
DEMEM		500 ml
HEPES-Puffer		7,5 ml
L-Alanin/L-Glutamin	200 mM	5 ml
Penicillin/Stroptomycin	10 mg/ml	5 ml
Insulin	5 IE/ml	60 µl
Fortecortin	50 µg/ml	20 µl
Glucagon		7 µl
Heparin	5 IE/µl	200 µl
Glycin	1,2 M	500 µl
Rattenerthrozyten		10 ml
Rattenplasma		5 ml

Tabelle 2: **Zusammensetzung des Perfusats.** Quelle: Eigens von Felix Claussen für diese Dissertation angefertigt

5.6. Messung biochemischer Parameter und Blutgasanalyse

Perfusatproben wurden zu Beginn, nach drei und sechs Stunden der Perfusion aus dem venösen Ausflussschenkel des Kreislaufs entnommen. Das Perfusat wurde bei 4°C und 3200 RPM zentrifugiert und der Überstand dem *Labor Berlin* (Labor Berlin–Charité Vivantes GmbH, Berlin, Deutschland) zur photometrischen Bestimmung von Alaninaminotransferase (ALT), Aspartataminotransferase (AST), Bilirubin und Harnstoff übergeben. Des Weiteren wurden zu denselben Zeitpunkten Perfusatproben aus dem portalvenösen Zufluss und aus dem venösen Ausfluss der Leber zur Analyse der Blutgase (ABL800 FLEX, Radiometer GmbH, Berlin, Deutschland) entnommen. Beurteilt wurden insbesondere der Sauerstoffpartialdruck (pO_2), Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2), die Fraktion des oxygenierten Hämoglobins (FO_2Hb), das Gesamthämoglobin, der Hämatokrit, der pH-Wert, Natrium, Kalium, Glukose und Lactat. Die Probenentnahme sowie die Blutgasanalysen wurden in allen Versuchen von mir durchgeführt.

5.7. Berechnung des Sauerstoffverbrauchs

Den Sauerstoffgehalt des Perfusats ($[O_2]$ in g/ml) berechnete ich mittels folgender Formel:

$$[O_2] = 0,0139 \times [Hb] \times FO_2Hb + 0,0000314 \times pO_2$$

$[Hb]$ ist hierbei die Hämoglobinkonzentration in g/dl, FO_2Hb ist die Fraktion des oxygenierten Hämoglobins und pO_2 ist der Sauerstoffpartialdruck in mmHg. Der hepatische Sauerstoffverbrauch (VO_2 in ml/min/g) wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$VO_2 = [O_2]_P - [O_2]_V \times \text{Flussrate}$$

$[O_2]_P$ und $[O_2]_V$ sind hierbei der jeweilige Sauerstoffgehalt des portalvenösen Zu- und des venösen Abflusses der Leber. Die Flussrate wird in ml/min/g Lebergewicht angegeben.

5.8. Histopathologische Aufarbeitung

Nach Ende der Perfusion wurde die Leber zur histopathologischen Aufarbeitung asserviert. Aus jedem der fünf Leberlappen wurden mindestens drei Parenchymproben entnommen, von denen mindestens eine in Formaldehyd und mindestens zwei in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt wurden. Der extrahepatische Gallengang wurde möglichst hilusnah abgetrennt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Die in Formaldehyd asservierten Parenchymproben wurden nach einer Aufbewahrungszeit von mindestens 24 Stunden in Paraffin eingebettet und nach ausreichend langer Aushärtung geschnitten. Anschließend wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt, wobei die Paraffinschnitte nach dem Durchlaufen einer Ethanolreihe in absteigenden Konzentrationen zunächst acht Minuten in Meyer's Hämatoxylin und anschließend 30 Sekunden in Eosin gefärbt wurden. Von allen Schnitten wurden jeweils fünf repräsentative Bilder in fünfzigfacher und hundertfacher Vergrößerung gemacht, welche pseudonymisiert einer Pathologin (R.A.) zur histopathologischen Begutachtung vorgelegt wurden. Beurteilt wurden die allgemeine Gewebsmorphologie, Nekrose und sinusoidale Dilatation.

Mit einem Cryotom wurden die schockgefrorenen Gallengänge geschnitten und anschließend ebenfalls einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Zur genaueren Quantifizierung des Zelluntergangs wurden die Gallengangsschnitte außerdem mittels *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL) angefärbt und mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gegengefärbt. Mittels *TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling* (TUNEL, Roche, Basel, Schweiz) werden Zellkerne apoptotischer Zellen angefärbt. 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) färbt doppelsträngige DNA an. Für die TUNEL-Färbung wurden die Schnitte zunächst 10 Minuten in Xylol gelegt. Sie durchliefen dann eine Ethanolreihe in absteigenden Konzentrationen (99%, 96%, 80%, 70%, 50%) und wurden anschließend mit *Aqua dest* gespült. Danach wurden sie nacheinander 1 Minute in Citrat-Puffer getaucht, kurz mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült, 30 Minuten in Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)-gepufferte Salzlösung gelegt und noch einmal kurz mit PBS gespült. Zuletzt wurden 50 μl TUNEL-Reaktionsmischung auf jeden Schnitt gegeben und die Schnitte für eine Stunde in absoluter Dunkelheit bei 37°C inkubiert. TUNEL-positive Areale wurden mittels der *NIH ImageJ Software* (Version: 2.0.0-rc-68/1.52f) gemessen.

Die Probenentnahme wurde für jeden Versuch von mir durchgeführt. Die histologischen Schnitte wurden von mir mit der Hilfe von Simon Moosburner und Peter Tang erstellt.

5.9. Gallengangsanalytik

Die Galle wurde während der gesamten Perfusion drainiert und gesammelt. Das produzierte kumulative Gallenvolumen wurde stündlich bestimmt, die Galle in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C zur späteren Analyse aufbewahrt. Zur Quantifizierung des Zelluntergangs im Gallengangsgewebe wurde die Aktivität bzw. Konzentration von Lactatdehydrogenase (LDH) und γ -Glutamyltransferase (GGT) in der Galle bestimmt. Die photometrische Bestimmung

der LDH-Aktivität in der Galle erfolgte mittels des *Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit* der Firma *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* (München, Deutschland). Hierfür wurden in zwei Verdünnungen jeweils 2,5 µl bzw. 5 µl Galle in 47,5 µl bzw. 45 µl Reagenz Mix diluiert. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 Minuten bei 37°C wurde die erste photometrische Messung gestartet und dann alle 5 Minuten über eine Messperiode von 30 Minuten wiederholt. Die LDH-Aktivität wurde anschließend mittels folgender Formel berechnet:

$$LDH\text{-Activity} = \frac{\Delta T_1 - T_2}{T \times V} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$\Delta T_1 - T_2$ ist hier die Messdifferenz zwischen der initialen und der finalen Messung, T ist die Reaktionszeit und V das Gallenvolumen.

Zur Bestimmung der GGT-Konzentration in der Galle wurde ein ELISA der Firma *Elabscience* (Houston, Texas, USA) verwendet. Hierfür wurden in die Vertiefungen einer Antikörper-beschichteten Mikrotiterplatte jeweils 100 µl Standard Arbeitsreagenz und 100 µl Galle in einer Verdünnung von 1:10, 1:20, 1:100 und 1:200 gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 90 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde die Flüssigkeit von der Platte entfernt und unverzüglich 100 µl einer biotinylierten Detektionslösung in die Vertiefungen gegeben. Es folgte wiederum eine sechzigminütige Inkubationszeit. Als nächstes wurden die Vertiefungen der Platte mit Meerrettichperoxidasekonjugat befüllt, für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit einem Waschpuffer gewaschen. Für den finalen Reaktionsschritt wurden jeder Vertiefung 90 µl des Reaktionssubstrats hinzugefügt. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die Reaktion mittels einer Stopp-Lösung beendet. Zum Schluss fand die optische Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm statt. Die Probengewinnung sowie die Messung der Enzyme in der Galle wurden von mir mit der Unterstützung von Peter Tang durchgeführt.

5.10. Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden mit *IBM SPSS Statistics Version 24.0* für macOS (*IBM Corp.*, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Grafiken wurden mit *GraphPad Prism Version 8.11* (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA) erstellt. Kategorische Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test analysiert. Mithilfe des Shapiro-Wilks-Tests wurde die Normalverteilung überprüft. Lag eine solche vor, wurden die Gruppen mittels eines two-way-ANOVAs analysiert. Lag keine Normalverteilung vor, wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Bonferoni-post-hoc-Test angewendet. Die Daten sind im Text als Median und in der Tabelle als Median und Interquartilenabstand angegeben. Angegeben wurde das 95%-Konfidenzintervall, ein P-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

6. Ergebnisse

6.1. Allgemeine Versuchs- und Perfusionsbedingungen

Das Gewicht der Versuchstiere und entnommenen Lebern zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0,47$ bzw. $p = 0,34$). Die

Organentnahme wurde für alle Versuche identisch durchgeführt. Die einzige Ausnahme stellte die nicht erfolgte arterielle Präparation in der sNEVLP-Gruppe dar, die in dieser Gruppe eine Verkürzung der Operationszeit um 10 ± 2 Minuten gegenüber den dNEVLP-Gruppen zur Folge hatte. Weder die kalte Ischämiezeit, noch die makroskopische Spülung der Lebern zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Der initiale pH-Wert lag in allen Versuchen im physiologischen Bereich und sank während der Perfusion in allen Gruppen ohne signifikante Unterschiede in den leicht sauren Bereich ab (pH_{T_0} $p = 0.22$, pH_{T_3} $p = 0.66$, pH_{T_6} $p = 0.22$). Perfusatnatrium, -kalium und -chlorid lagen zu allen Zeitpunkten der Perfusion in allen Gruppen im physiologischen Bereich. Der portalvenöse Perfusionsdruck zeigte während der gesamten Perfusion keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (PVP_{T_0} $p = 0.26$, PVP_{T_3} $p = 0.63$, PVP_{T_6} $p = 0.87$). Der physiologische Bereich von 4-9 mmHg wurde in keinem der Versuche über- oder unterschritten. Der hepatische Sauerstoffverbrauch blieb während der gesamten Perfusion hoch und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (VO_{2T_0} $p = 0,68$, VO_{2T_3} $p = 0,19$, VO_{2T_6} $p = 0.91$).

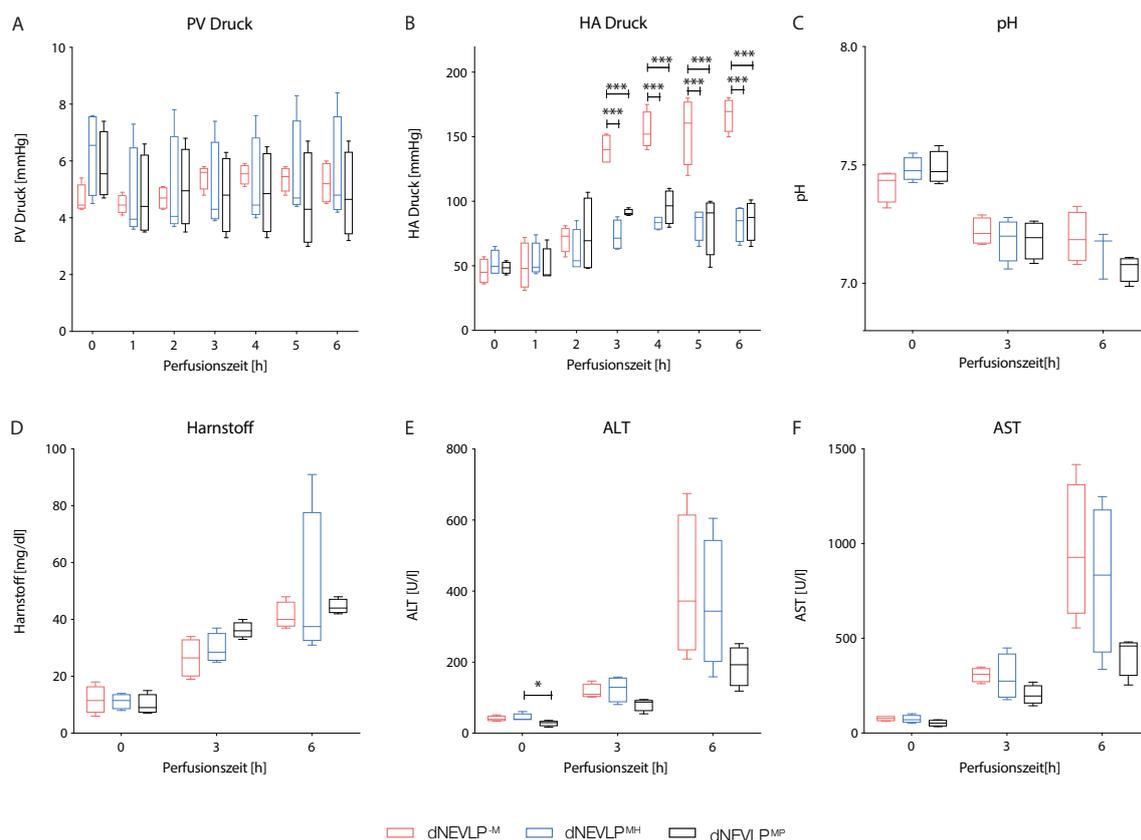


Abbildung 4: Vergleich der drei dNEVLP-Gruppen (Teil 1)

A Portalvenöser Druck. **B** Arterieller Druck. **C** pH-Wert des Perfusats. **D** Harnstoff im Perfusat. **E** Alaninaminotransferase im Perfusat. **F** Aspartataminotransferase im Perfusat. Quelle: Modifiziert nach *Claussen et al. (1)*

6.2. Etablierung der dualen Perfusion und der Vasodilatation mittels Metamizol

6.2.1. Perfusionsdruck

Der portalvenöse Perfusionsdruck zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den dNEVLP-Gruppen (PVP_{T_0} $p = 0.09$, PVP_{T_3} $p = 0.49$, PVP_{T_6} $p = 0.76$, Abb. 3 A). Auch der initiale arterielle Perfusionsdruck unterschied sich nicht signifikant (HAP_{T_0} p

= 0.67, Abb. 3 B). In der dNEVLP^M-Gruppe stieg der mittlere arterielle Perfusionsdruck ab Stunde drei nach Perfusionsbeginn drastisch an, überschritt schnell die als physiologisch erachtete Obergrenze von 110 mmHg und erreichte Werte von bis zu 180 mmHg nach sechs Stunden Perfusion (dNEVLP^M: HAP_{T0} = 45 mmHg, HAP_{T3} = 140 mmHg, HAP_{T6} = 169,5 mmHg, Abb. 3 B).

Die Applikation von 100 mg Metamizol in den arteriellen Schenkel des Perfusionskreislaufs führte zu einem direkten und signifikanten Abfall des arteriellen Perfusionsdrucks in beiden Metamizolgruppen. Der Anstieg des arteriellen Perfusionsdrucks über die physiologische Grenze von 110 mmHg konnte so verhindert werden (HAP_{T3} p = 0.007, HAP_{T4} p = 0.01, HAP_{T5} p = 0.02, HAP_{T6} p = 0.03, Abb. 3 B). Zwischen den beiden Metamizolgruppen zeigte der arterielle Perfusionsdruck keine signifikanten Unterschiede.

6.2.2. Leberfunktion

Die Harnstoffproduktion und der pH-Wert zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei dNEVLP-Gruppen (U_{T0} p = 0.79, U_{T3} p = 0.1, U_{T6} p = 0.32, pH_{T0} p = 0.23, pH_{T3} p = 0.78, pH_{T6} p = 0.14, Abb. 3 C-D). In den Metamizolgruppen zeichnete sich nach sechs Stunden Perfusion im Vergleich zur dNEVLP^M ein Trend zu niedrigeren Laktatkonzentrationen im Perfusat ab. Die Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (dNEVLP^{MP} L_{T6} = 7,5 mg/dl, dNEVLP^{MH} L_{T6} = 8 mg/dl, dNEVLP^M L_{T6} = 12,5 mg/dl, p = 0.14). Die Galleproduktion in der ersten Stunde der Perfusion unterschied sich nicht zwischen den drei dNEVLP-Gruppen (p = 0.58). Die Applikation von Metamizol, ab T1 in der dNEVLP^{MH}-Gruppe und meist

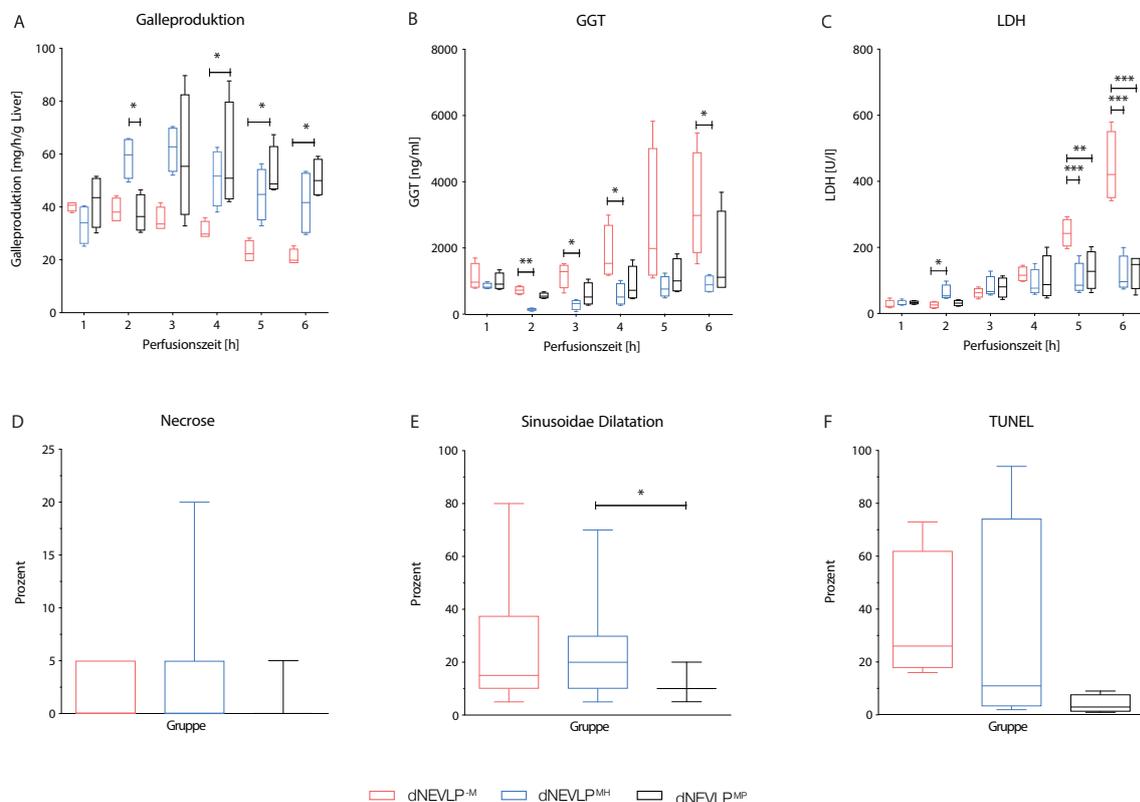


Abbildung 5: Vergleich der drei dNEVLP-Gruppen (Teil 2)

A Galleproduktion. **B** Gamma-glutamyltransferase in der Galle. **C** Laktatdehydrogenase in der Galle. **D** Nekrose im Leberparenchym. **E** Sinusoidale Dilatation im Leberparenchym. **F** TUNEL-positive Areale im Gallengangsgewebe. Quelle: Modifiziert nach Claussen *et al.* (1)

ab T3 in der dNEVLP^{MP}-Gruppe, hatte eine signifikante Steigerung der Galleproduktion zur Folge (B_{T2} p = 0,02, B_{T3} p = 0,06, B_{T4} p = 0,04, B_{T5} p = 0,04, B_{T6} p = 0,03, Abb. 4 A).

6.2.3. Leberschaden und Histopathologie

Die ALT-Konzentrationen zu Beginn der Perfusion waren in der dNEVLP^{MP}-Gruppe signifikant niedriger als in der dNEVLP^M-Gruppe (ALT_{T0} p = 0.048). Zwischen der dNEVLP^{MH}-Gruppe und den beiden anderen dNEVLP-Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Zu allen Zeitpunkten der Perfusion zeigte die dNEVLP^{MP}-Gruppe deutlich niedrigere Konzentrationen von ALT und AST im Perfusat als die beiden anderen dNEVLP-Gruppen (Abb. 3 E-F, Abb. 5 A-C). Es konnte allerdings keine statistische Signifikanz gezeigt werden.

In der histopathologischen Untersuchung des Lebergewebes zeigte sich deutlich weniger sinusoidale Dilatation in der dNEVLP^{MP}-Gruppe als in den beiden anderen Gruppen (NEVLP^{MP}: 10%, dNEVLP^{MH}: 20%, dNEVLP^M: 15%, Abb. 4 E). Der Unterschied zur dNEVLP^{MH}-Gruppe war statistisch signifikant (p = 0,01). In den Lebern der dNEVLP^{MP}-Gruppe fand sich des Weiteren weniger Nekrose als in denen der anderen dNEVLP-Gruppen (NEVLP^{MP}: 0%, dNEVLP^{MH}: 1%, dNEVLP^M: 2%, Abb. 4 D). Hier erreichten die Unterschiede jedoch keine statistische Signifikanz.

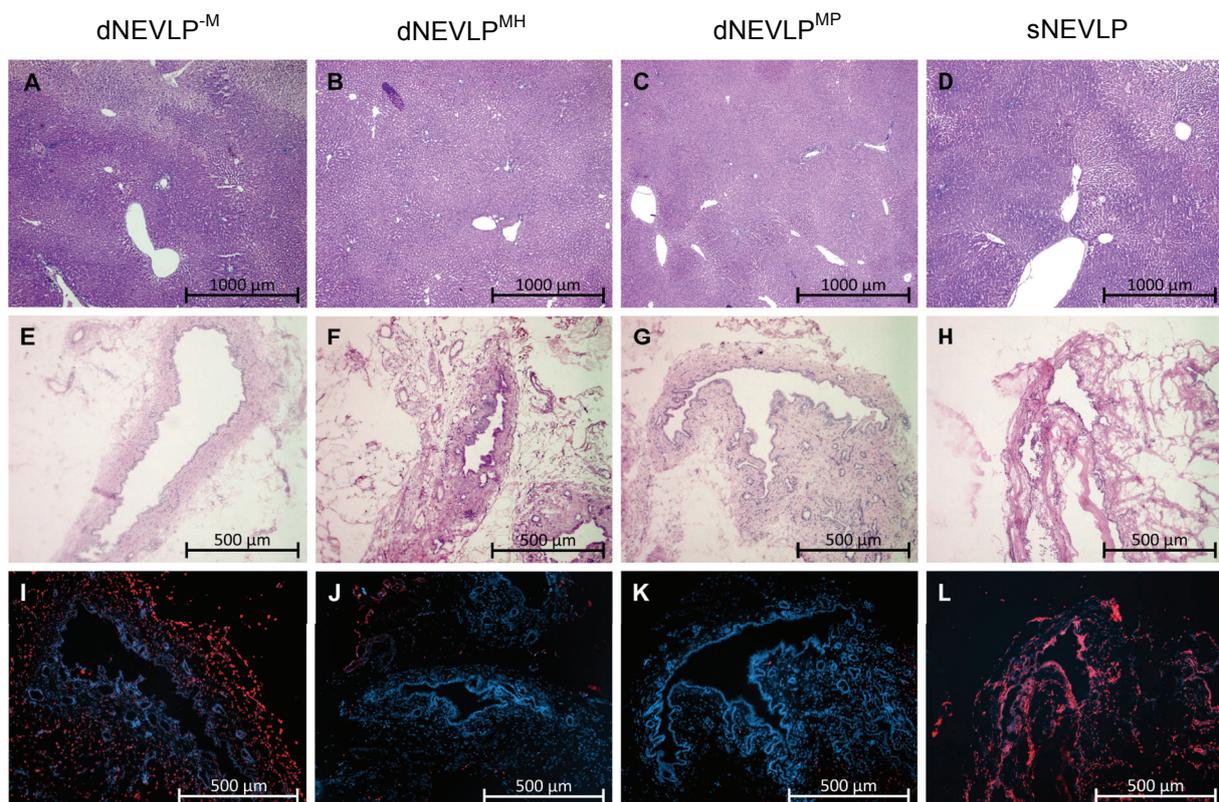


Abbildung 6: **Histologie**
A-D HE-gefärbtes Leberparenchym. **E-H** HE-gefärbtes Gallengangsgewebe. **I-L** TUNEL- und DAPI-gefärbtes Gallengangsgewebe. Quelle: Modifiziert nach *Claussen et al. (1)*

6.2.4. Gallengangsanalytik

Die LDH-Aktivität in der Galle nach der ersten Stunde der Perfusion zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei dNEVLP-Gruppen (LDH_{T1} p = 0,33). Nach zwei Stunden war die LDH-Aktivität in den Metamizolgruppen signifikant

niedriger als in der dNEVLP^M-Gruppe (LDH_{T2} p = 0,02). Nach drei und vier Stunden Perfusion zeigten sich wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen (LDH_{T3} p = 0,6, LDH_{T4} p = 0,58). Nach fünf und sechs Stunden Perfusion war die LDH-Aktivität in beiden Metamizolgruppen signifikant niedriger als in der dNEVLP^M-Gruppe (LDH_{T5} p = 0,04, LDH_{T6} p = 0,02, Abb. 4 C). Während der gesamten Perfusion war die GGT-Konzentration in den Metamizolgruppen deutlich niedriger als in der dNEVLP^M-Gruppe. Nach zwei, drei, vier und sechs Stunden war der Unterschied zwischen der dNEVLP^{MH}-Gruppe und der dNEVLP^M-Gruppe signifikant (GGT_{T2} p = 0,01, GGT_{T3} p = 0,04, GGT_{T4} p = 0,04, GGT_{T6} p = 0,049, Abb. 4 B). Die Unterschiede zwischen der dNEVLP^{MP}-Gruppe und den beiden anderen dNEVLP-Gruppen erreichte keine statistische Signifikanz. Die Histopathologie des Gallengangsgewebes zeigte deutlich weniger Zelluntergang in der dNEVLP^{MP}-Gruppe als in den beiden anderen dNEVLP-Gruppen (NEVLP^{MP}: 3%, dNEVLP^{MH}: 11%, dNEVLP^M: 26%, Abb. 4 F, Abb. 5 E-G, I-K). Hier konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

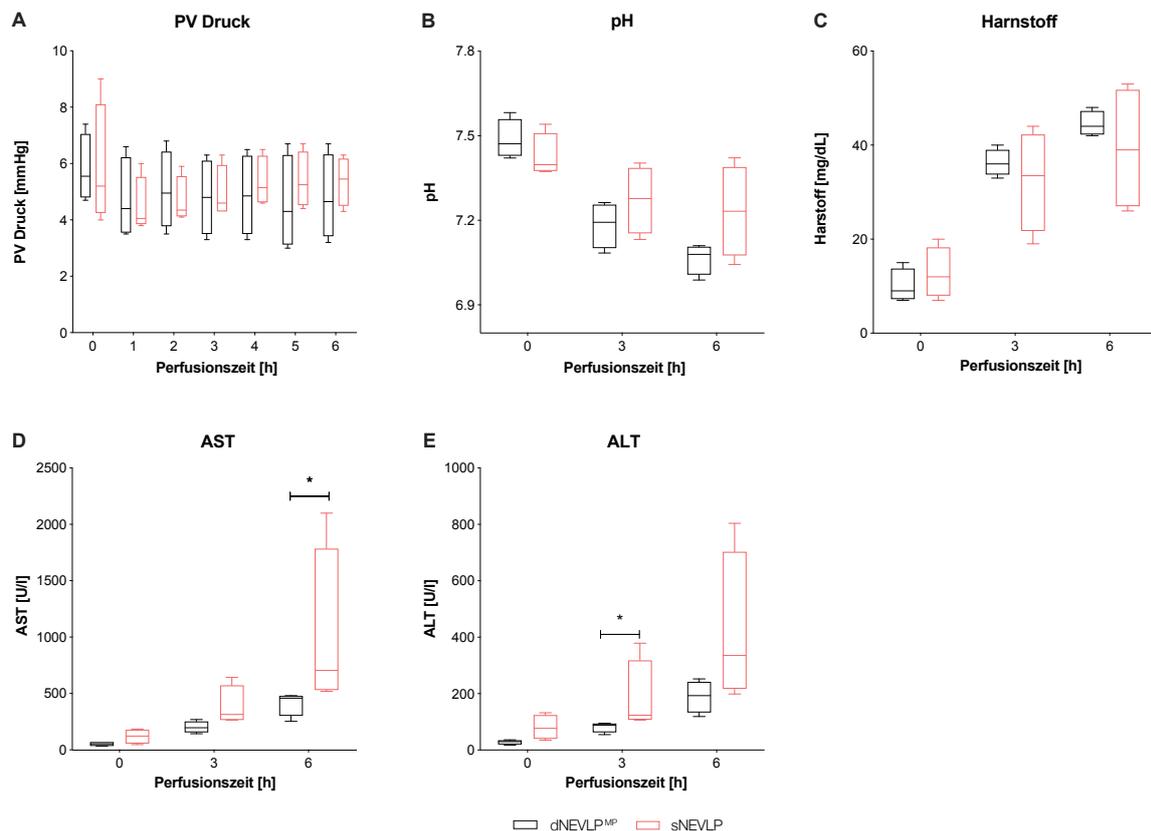


Abbildung 7: Vergleich von dNEVLP^{MP} und sNEVLP (Teil 1)

A Portalvenöser Druck. **B** pH-Wert des Perfusats. **C** Harnstoff im Perfusat. **D** Aspartataminotransferase im Perfusat. **E** Alaninaminotransferase im Perfusat. Quelle: Modifiziert nach Claussen *et al.* (1)

6.3. Vergleich von optimierter dNEVLP und sNEVLP

6.3.1. Perfusionsdruck und Leberfunktion

Es waren keine signifikanten Unterschiede im portalvenösen Perfusionsdruck und pH-Wert zwischen den beiden Gruppen zu beobachten (Abb. 6 A-B). Beide Gruppen zeigten während der gesamten Perfusion vergleichbare Konzentrationen von

Harnstoff im Perfusat (Abb. 6 C). Die Laktatkonzentration im Perfusat war in der dNEVLP^{MP} nach sechs Stunden Perfusion deutlich, wenn auch nicht signifikant, niedriger als in der sNEVLP-Gruppe (dNEVLP^{MP}: L_{T6} = 7,5 mg/dl, sNEVLP: L_{T6} = 14 mg/dl, p = 0,11). Die Galleproduktion war in der dNEVLP^{MP}- Gruppe ab drei Stunden nach Perfusionsbeginn signifikant höher als in der sNEVLP-Gruppe (B_{T4} p = 0.03, B_{T5} p = 0.03, B_{T6} p = 0.03, Abb. 7 A)

6.3.2. Leberschaden und Histopathologie des Lebergewebes

Die Konzentrationen von die ALT im Perfusat waren in der dNEVLP^{MP}- Gruppe nach drei Stunden signifikant niedriger und nach sechs Stunden immer noch deutlich, wenn auch nicht mehr signifikant, niedriger als in der sNEVLP- Gruppe (ALT_{T3} p = 0.03; ALT_{T6} p = 0.11; Abb. 6 E). Auch die Konzentrationen der AST im Perfusat waren in der dNEVLP^{MP}- Gruppe nach drei Stunden niedriger und nach sechs Stunden signifikant niedriger als in der sNEVLP-Gruppe (AST_{T3} p = 0.06, AST_{T6} p = 0.03, Abb. 6 D). Die Histopathologie des Lebergewebes zeigte signifikant weniger sinusoidale Dilatation und Nekrose in der dNEVLP^{MP}- Gruppe (Nekrose: p = 0.02, sinusoidale Dilatation: p = <0.001, Abb. 7 D-E, Abb. 5 C-D).

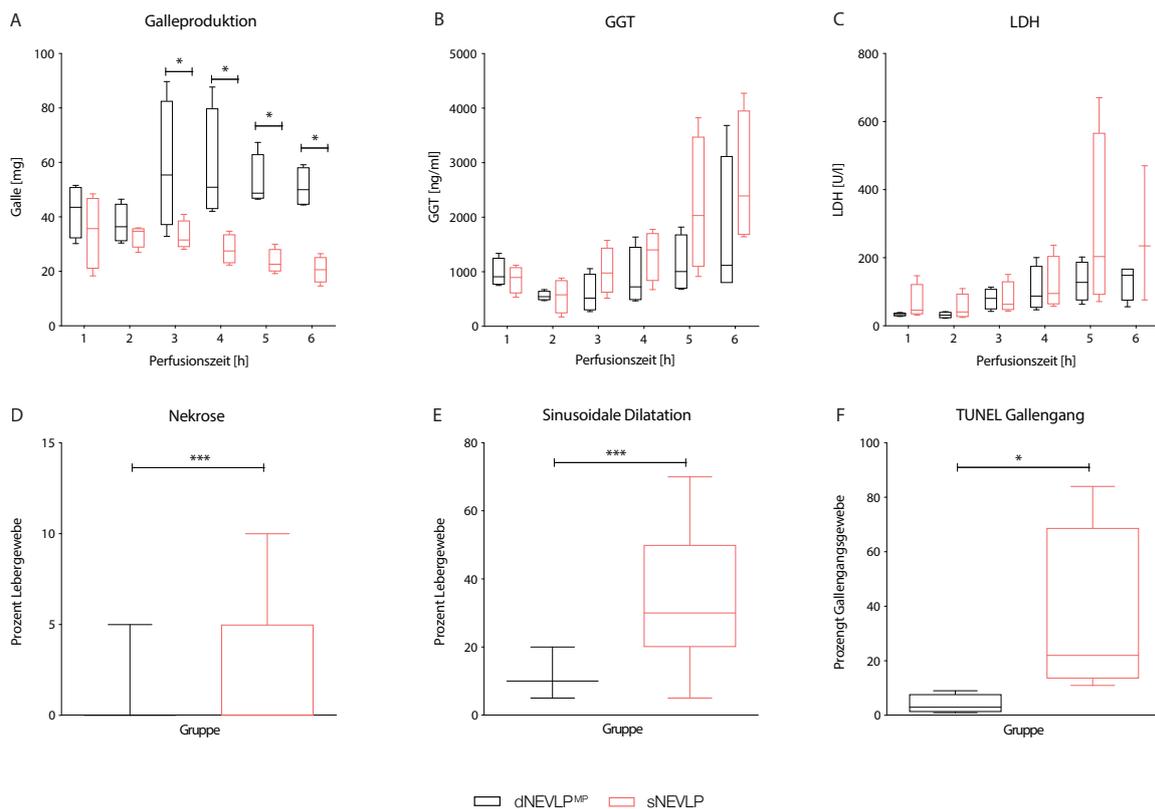


Abbildung 8: Vergleich von dNEVLP^{MP} und sNEVLP (Teil 2)

A Galleproduktion. **B** Gammaglutamyltransferase in der Galle. **C** Laktatdehydrogenase in der Galle. **D** Nekrose im Leberparenchym. **E** Sinusoidale Dilatation im Leberparenchym. **F** TUNEL-positive Areale im Gallengangsgewebe. Quelle: Modifiziert nach Claussen *et al.* (1)

6.3.3. Gallengangsanalytik

Die Aktivität der LDH in der Galle entwickelte sich in den ersten vier Stunden der Perfusion ähnlich. Nach fünf und sechs Stunden Perfusion zeichnete sich ein Trend zu niedrigeren Aktivitätswerten in der dNEVLP^{MP}- Gruppe ab (Abb. 7 C). Auch bei

den GGT-Konzentrationen in der Galle zeigte sich während der gesamten Perfusion ein deutlicher Trend zu niedrigeren Aktivitätswerten in der dNEVLP^{MP}- Gruppe (Abb. 7 B). Insgesamt konnte aber keine statistische Signifikanz gezeigt werden. HE- und TUNEL-Färbung des Gallengangsgewebes zeigte signifikant weniger untergegangene Zellen in der dNEVLP^{MP}- Gruppe ($p = 0,03$, Abb. 7 F, Abb. 5 G-H, K-L)

7. Diskussion

Der Mangel an Spenderorganen stellt die Transplantationsmedizin in Deutschland und weltweit vor große Herausforderungen. Die normotherme *ex vivo* Leberperfusion (NEVLP) gilt seit einiger Zeit als vielversprechende Strategie, den Pool an verfügbaren Organen zu erweitern und so die angespannte Situation zu entschärfen. Mittels normothermer Maschinenperfusion kann die Präservierung der Transplantate deutlich verbessert werden. Darüber hinaus bietet dieses Verfahren die Möglichkeit zur metabolischen Evaluation und Rekonditionierung der Organe. Bereits Mitte des letzten Jahrhunderts wurde begonnen, systematisch zur extrakorporalen Perfusion von Lebern zu forschen. In den Neunzigerjahren wurde die Forschung intensiviert und es erschienen erste Arbeiten zu humanen Lebern. Es dauerte weitere 20 Jahre bis die Maschinenperfusion von Transplantatlebern klinisch erprobt werden konnte. 2010 veröffentlichten *Garrera et al.* eine erste randomisierte Studie, in der sie die hypotherme Maschinenperfusion mit statischer Kaltlagerung verglichen und die Sicherheit des Verfahrens zeigen konnten (36). Nach weiteren sechs Jahren kam erstmals die normotherme *ex vivo* Leberperfusion zur klinischen Anwendung. *Ravikumar et al.* berichteten 2016 über eine erfolgreiche klinische Studie, dicht gefolgt von *Selzner et al.* im selben Jahr (22, 29). Beide Studien belegten die Sicherheit und den Nutzen von NEVLP im klinischen Kontext. Wegweisende Ergebnisse brachte im Jahr 2018 die erste Multicenter-Studie zur NEVLP. *Nasralla et al.* berichteten über den Vergleich von NEVLP und SCS in einer Kohorte von $n = 334$ Transplantaten in sieben verschiedenen europäischen Transplantationszentren. Sie verzeichneten eine Reduktion von frühen Organdysfunktionen, Transaminasen- und Bilirubinkonzentrationen nach Transplantation der perfundierten Organe gegenüber den SCS-Organen. Empfänger- und Transplantatüberleben nach einem Jahr zeigten hingegen keine Unterschiede (37). Es folgten weitere randomisierte klinische Studien. Heute steht die normotherme *ex vivo* Leberperfusion mehr denn je im Fokus chirurgischer Forschung.

Um die Entwicklung und Erprobung von NEVLP-Konzepten weiter voranzutreiben, ist es notwendig, funktionierende Kleintiermodelle zu etablieren. 1951 wurde von *Miller et al.* das erste geschlossene System für die Perfusion der isolierten Rattenleber vorgestellt (38). Seitdem wurde dieses Modell vielfach abgewandelt und weiterentwickelt. Die überwiegende Mehrzahl der in den folgenden Jahrzehnten vorgestellten Kleintiermodelle zur normothermen *ex vivo* Leberperfusion beschränkt sich auf die singuläre portalvenöse Perfusion des Organs (*single vessel normothermic ex vivo liver perfusion, sNEVLP*). Die allgemeine Rationale hierfür ist, dass die Leber überwiegend portalvenös versorgt wird. Darüber hinaus ist die rein

portalvenöse Leberperfusion mit vergleichsweise wenig technischem Aufwand verbunden. Tatsächlich hat sich die rein portalvenöse normotherme *ex vivo* Perfusion der Rattenleber als ein gutes Verfahren erwiesen. *Tolboom et al.* konnten zeigen, dass sie in Bezug auf die Organpräservierung eine sinnvolle Alternative zur statischen Kaltlagerung darstellt. Sie erreichten ein 28-Tage-Überleben von über 90% nach sechs Stunden Perfusion und Transplantation (30).

Trotzdem gibt es viele Argumente, die, insbesondere in Hinblick auf die Rekonditionierung marginaler Organe mittels NEVLP, einen dualen Ansatz, also die Perfusion der Leber durch Pfortader und Leberarterie (*dual vessel normothermic ex vivo liver perfusion, dNEVLP*), sinnvoll erscheinen lassen. Zum einen entspricht sie der physiologischen Leberdurchblutung im lebenden Organismus: 9-12% des Lebergewebes der Ratte werden exklusiv von der Leberarterie versorgt (39). Der extrahepatische Gallengang bezieht mindestens 49% seiner Blutversorgung aus der Leberarterie und es wurde gezeigt, dass das Gallengangsepithel besonders vulnerabel für Ischämie ist (40, 41). *Mora et al.* untersuchten die extrakorporale Perfusion von Schweinelebern als Methode zur temporären Unterstützung der Leberfunktion bei Patienten mit schweren Leberfunktionsstörungen. Sie konnten zeigen, dass dual perfundierte Lebern in diesem Zusammenhang besser funktionierten als rein portalvenös perfundierte (42). Zum anderen setzen klinische NEVLP-Systeme für humane Lebern fast ausschließlich auf die duale Perfusion (22, 33). Ein Kleintiermodell zur dualen normothermen *ex vivo* Leberperfusion würde also auch die klinische Anwendung deutlich besser abbilden.

Trotz dieser Überlegungen und Argumente finden sich in der Literatur nur wenige Arbeiten, die die duale normotherme *ex vivo* Perfusion von Kleintierlebern beschreiben. *Op den Dries et al.* und *Schlegel et al.* stellten kürzlich zwei Modelle zur dNEVLP von Rattenlebern vor. *Op den Dries et al.* verglichen drei Stunden druckgesteuerter dNEVLP mit statischer Kaltlagerung und zeigten die Überlegenheit von dNEVLP (43). *Schlegel et al.* verglichen unterschiedliche Perfusionstemperaturen und konnten vier Stunden flussgesteuerter dNEVLP realisieren (26). Klinische Studien zur NEVLP zeigen allerdings, dass die Perfusionsdauer im klinischen Kontext regelmäßig die Marke von drei oder vier Stunden überschreitet (22, 29). Um die Anwendung von dNEVLP im klinischen Bereich besser abzubilden, sollten auch Kleintiermodelle eine Perfusionsdauer von mehr als vier Stunden realisieren können. Darüberhinaus scheinen längere Perfusionsperioden auch in Hinblick auf die metabolische Rekonditionierung von Transplantatlebern sinnvoll.

Vieles spricht in Bezug auf die NEVLP für eine duale Perfusionsstrategie. Die meisten Modelle für Kleintier- bzw. Rattenlebern verlassen sich aber weiterhin auf die rein portalvenöse Perfusion. Adäquate Vergleiche der beiden Methoden sind in der Literatur nicht zu finden. Arbeiten, die die Gleichwertigkeit beider, oder sogar die Überlegenheit einer der beiden Methoden belegen, fehlen. *t'Hart et al.* verglichen 2007 die duale mit der singulären portalvenösen NEVLP, waren aber nicht in der Lage, Perfusionszeiten von mehr als 90 Minuten zu realisieren, ohne einen dramatischen Anstieg der Transaminasen und des Perfusionsdrucks zu verzeichnen (44). Gründe für diese deutlich unphysiologischen Perfusionsbedingungen nach einer

relativ kurzen Perfusionsperiode könnten unter anderem das Fehlen eines Dialysekreislaufs und die Nutzung eines zellfreien Perfusats sein, wie Ergebnisse vorhergehender Arbeiten unserer Forschungsgruppe nahelegen (31, 32). Auch der Verzicht auf eine Vasodilatation, eine, wie wir in dieser Arbeit zeigen, notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche prolongierte dNEVLP, könnte ein Grund für die von *t'Hart et al.* gemachten Beobachtungen sein. *Brüggenwürth et al.* publizierten 2018 eine vergleichende Arbeit zu einstündiger dualer und portalvenöser normothermer endischämischer Reperfusion von Rattenlebern nach sechsstündiger statischer Kaltlagerung und einstündiger subnormothermer Reperfusion (45). Sie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Perfusionsstrategien zeigen. Die sequentielle zunächst hypo- und dann normotherme endischämische Reperfusion, gleichsam als Methode zur schonenden Aufwärmung der Leber nach langer statischer Kaltlagerung, mag eine vielversprechende Strategie für eine optimierte Organpräservierung sein. Sie unterscheidet sich aber grundlegend von der prolongierten normothermen *ex vivo* Perfusion, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, und ist keine Option für die metabolische Rekonditionierung von Organen während der Perfusion.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zur dualen normothermen *ex vivo* Perfusion von Rattenlebern zu entwickeln und eine Organperfusion unter nahezu physiologische Bedingungen für sechs Stunden zu realisieren. Die Grundlage hierfür bildete die Entwicklung eines zunächst rudimentären und im Verlauf optimierten und miniaturisierten sNEVLP-Systems, wie sie detailliert bei *Nösser et al.* und *Gassner et al.* beschrieben wurde (31, 32). Die Konzeptualisierung und Etablierung eines solchen Modells ist ein langwieriger und äußerst aufwendiger Prozess. Basierend auf einem detaillierten Studium der verfügbaren Literatur galt es zunächst grundlegende Entscheidungen, wie die Wahl der Perfusionstemperatur, der passenden Versuchstiere und des zu modellierenden Transplantationssettings (Spender/-in nach Hirntod vs. Spender/-in nach Kreislaufstillstand), zu fällen. Nach der Festlegung auf die normotherme Perfusion bei 37°C, die Ratte als Modellorganismus und die Entnahme der Leber nach Hirntod als zu simulierenden Transplantationsmodus, konnte begonnen werden, Prozesse und Methoden zu entwickeln und zu etablieren: In Anlehnung an Techniken aus anderen Organentnahmeprojekten und in enger Absprache mit dem Mikrochirurgen unserer Arbeitsgruppe etablierten wir Operationstechniken für die optimale Kanülierung, Spülung und Entnahme der Rattenleber sowie für die Gewinnung und Konservierung von Rattenerythrozyten und -plasma. Basierend auf Zellkulturmedien suchten und fanden wir die richtige Zusammensetzung unseres Perfusionsmediums. Den grundlegenden Aufbau des sNEVLP-Kreislaufs konzipierten wir in Anlehnung an die Arbeiten von *Tolboom et al.* (30). Wir entwickelten eine Perfusionskammer, testeten verschiedene Pumpen, Oxygenatoren, Blasenfallen, Verbindungsschläuche und Dialysekartuschen und etablierten eine kontinuierliche Druckmessung. Wir verkleinerten sukzessive alle Bestandteile des Kreislaufs, um möglichst ressourcensparend arbeiten zu können. Die Prozesse eines Perfusionsversuchs von der koordinierten Bestellung und Haltung der Versuchstiere über die Organentnahme, den sterilen Aufbau des Perfusionskreislaufes, die Herstellung des Perfusats und die anschließende luftfreie

Befüllung des Kreislaufs mit demselben, den Einbau der Leber in den Kreislauf, die Perfusion selbst, die Probenentnahmen und schließlich das Ende des Versuchs wurden unzählige Male erprobt, um einen zeiteffizienten und reibungslosen Ablauf zu gewährleisten. Zur Auswertung der Perfusionsversuche etablierten wir zahlreiche analytische Methoden, wie histologische Färbungen (z.B. TUNEL) und Verfahren zur Messung von Enzymkonzentrationen und –aktivitäten.

Um unseren so etablierten sNEVLP-Kreislauf zu einem dNEVLP-Kreislauf weiter zu entwickeln, mussten erneut einige der beschriebenen Entwicklungsschritte durchlaufen werden. Die Organentnahmetechnik musste um die Präparation und Kanülierung der Leberarterie ergänzt werden. Der Perfusionskreislauf musste um einen Schenkel für die arterielle Perfusion erweitert werden, ohne das Füllvolumen zu vergrößern. Viele kleinere und größere Aufgaben mussten bewältigt werden, um die duale Perfusion zu ermöglichen. Das größte Problem, das wir beobachteten, war der deutliche Anstieg des arteriellen Gefäßwiderstandes und folglich des arteriellen Perfusionsdrucks, der mit großer Regelmäßigkeit zwischen Stunde drei und vier der Perfusion auftrat. Wir erklärten dieses Phänomen mit progredienten Vasospasmen der kleinen arteriellen Gefäße der Rattenleber. Wir nahmen an, dass sich die daraus resultierenden deutlich erhöhten Perfusionsdrücke negativ auf das Perfusionsoutcome auswirken würden, und, dass eine konsequente Vasodilatation notwendig sein würde, um Perfusionszeiten von mindestens sechs Stunden zu realisieren. Als „*proof of concept*“ inkludierten wir eine dNEVLP-Gruppe ohne Kontrolle des arteriellen Perfusionsdrucks in unsere Versuchsreihe. Um eine suffiziente Vasodilatation zu erreichen, erprobten wir verschiedene Agentien. Papaverin erwies sich als potenter Vasodilatator, wirkte in den für eine ausreichende Vasodilatation notwendigen Konzentrationen allerdings hepatotoxisch mit deutlich erhöhten Transaminasen nach sechs Stunden Perfusion. Nifedipin bewirkte keine suffiziente Vasodilatation und war insgesamt, nicht zuletzt aufgrund seiner hohen Lichtempfindlichkeit, schwierig zu handhaben. Neben den genannten identifizierten wir früh Metamizol als vielversprechendes Agens. In vielen Ländern, insbesondere in Deutschland, ist Metamizol ein weit verbreitetes und viel genutztes Analgetikum in Human- und Veterinärmedizin. Es ist günstig und leicht zu beschaffen. Seine Verwendung birgt ein niedriges Risiko für akute Leberschäden und es wurde gezeigt, dass es keinen toxischen Effekt auf Hepatozyten hat (46, 47). Vor allem aber zeigt Metamizol neben seinen analgetischen auch potente vasodilatatorische Eigenschaften (35). Wir untersuchten, ob die direkte Applikation von Metamizol in die Leberarterie eine suffiziente Vasodilatation und Kontrolle des arteriellen Perfusionsdrucks erreichen würde. Als wirksamste Applikationsform stellte sich hierzu die Gabe als Bolus im Gegensatz zur dauerhaften Gabe heraus. Um herauszufinden, ob die Gabe bei Bedarf ab einem bestimmten Druck oder die regelmäßige stündliche Gabe die besseren Ergebnisse erreichen würde, verglichen wir die beiden Methoden miteinander.

Unsere Ergebnisse bestätigen unsere vorherigen Beobachtungen steigender arterieller Perfusionsdrücke nach drei bis vier Stunden dNEVLP ohne Vasodilatation. Obwohl nur wenige Ergebnisse aus dem Vergleich der drei dualen Gruppen statistische Signifikanz erreichten, zeigte sich doch ein starker Trend hin zu deutlich

schlechteren Perfusionsergebnissen durch die resultierenden unphysiologisch hohen arteriellen Perfusionsdrücke. Wir konnten zeigen, dass die Gabe von Metamizol in die Leberarterie zu einer direkten und starken Vasodilatation führte und den arteriellen Perfusionsdruck effektiv senkte. Dies führte zu weniger Schaden in Leberparenchym und Gallengangsgewebe und somit zu einer verbesserten Organpräservierung im Vergleich zur dNEVLP ohne Vasodilatation. Interessanterweise erhöhte die Applikation von Metamizol die Galleproduktion deutlich. Der Vergleich der beiden Applikationsstrategien zeigte, dass die Applikation bei Bedarf der stündlichen Applikation insgesamt überlegen war. Dies legt nahe, dass Metamizol selbst keinen absoluten positiven Effekt auf die Leber hat, sondern diesen vielmehr über die Vasodilatation entwickelt und eingesetzt werden sollte, wenn diese notwendig ist.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine suffiziente Vasodilatation die Voraussetzung für eine erfolgreiche dNEVLP ist. Wir schlagen hierfür Metamizol als sehr wirksames und sicheres Agens vor. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass auch der Einsatz anderer Vasodilatoren, wie zum Beispiel Verapamil oder Epoprostenol, zu ähnlichen Ergebnissen führen würde.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war es, unser neu entwickeltes dNEVLP-Modell zu evaluieren, indem wir es mit unserem bereits etablierten sNEVLP-Modell verglichen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die dNEVLP insgesamt eine bessere Organpräservierung erreicht. Das deutlich niedrigere Ausmaß von Nekrose und sinusoidaler Dilatation zeigt, dass der durch die Perfusion verursachte Parenchymschaden durch die duale Perfusionsstrategie deutlich vermindert werden konnte. Wir schreiben dies nicht nur der verbesserten Perfusion derjenigen Leberareale, die ausschließlich arteriell versorgt werden, zu, sondern gehen davon aus, dass die duale Perfusion die hepatische Mikrozirkulation insgesamt deutlich verbessert. Auch das extrahepatische Gallengangsgewebe wurde durch die dNEVLP deutlich besser präserviert, wie die Histopathologie zeigt. Da der extrahepatische Gallengang einen Großteil seiner Blutversorgung über die Leberarterie bezieht, erscheint dieses Ergebnis folgerichtig. Die GGT und LDH in der Galle als Marker des cholangiozellulären Untergangs zeigten unter der dNEVLP eine deutliche Tendenz zu niedrigeren Werten als unter der sNEVLP. Obwohl das statistische Signifikanzniveau verfehlt wurde, untermauert dieser Trend die Beobachtungen aus der Histopathologie. Ein Grund für die fehlende statistische Signifikanz bei den Enzymwerten bei gleichzeitigen deutlich signifikanten Unterschieden in der Histopathologie könnte darin liegen, dass der Untergang des Gallengangsgewebes nicht nur im Epithel, sondern häufig auch in den tieferen Schichten der Gallengangswand lokalisiert war. Enzyme, die hier im Rahmen des Zelluntergangs freigesetzt würden, würden sich wahrscheinlich nicht oder nur in verhältnismäßig niedrigen Konzentrationen in der Galle nachweisen lassen. Für zukünftige Versuche könnte es sinnvoll sein, GGT und LDH zusätzlich im Perfusat zu bestimmen. Ein weiterer, eher methodischer Grund könnte sein, dass die Ergebnisse der sNEVLP-Gruppe deutlich inkonsistenter waren, als die der dNEVLP^{MP}-Gruppe, und eine deutlich größere Standardabweichung aufwiesen. Grundsätzlich ist zu vermerken, dass mittels der dNEVLP insgesamt sehr stabile Perfusionsbedingungen erreicht

wurden. Die Versuche der dNEVLP^{MP}-Gruppe erbrachten die konsistentesten Ergebnisse aller Versuchsgruppen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die dNEVLP mit der entsprechenden Druckkontrolle in unserem miniaturisierten Modell eine stabile Organperfusion für mindestens sechs Stunden ermöglicht und im Vergleich zur sNEVLP zu einer verbesserten Organpräservierung führt. In der Zusammenschau der Ergebnisse unserer Analysen von Leberfunktion und Leberschaden, der histopathologischen Untersuchungen und der Auswertung der Sauerstoffausschöpfung des Lebergewebes, waren die Lebern während der gesamten sechsstündigen Perfusion suffizient perfundiert und vital. Jede Leber erfüllte die von *Mergental et al.* etablierten klinischen Kriterien für Viabilität und Transplantabilität (Galleproduktion, stabile Flussraten und homogene Parenchymperfusion) (48).

Diese Arbeit weist jedoch auch einige Limitationen auf, die nicht unerwähnt bleiben sollten. Zunächst ist zu betonen, dass die Evaluierung der in dieser Arbeit verglichenen Perfusionsstrategien ausschließlich *ex vivo*, also mittels rein labortechnischer Methoden, durchgeführt wurde. Es bleibt abzuwarten, ob der *ex vivo* erzielte und dokumentierte Perfusionserfolg auch *in-vivo*, also nach Transplantation und im lebenden Organismus, validiert werden kann. Versuche hierzu finden gegenwärtig in unserer Arbeitsgruppe statt. Eine weitere Limitation stellt die Verfügbarkeit des verwendeten Vasodilators Metamizol dar. Obwohl Metamizol in vielen Ländern, insbesondere im deutschsprachigen Raum, sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin viel und erfolgreich eingesetzt wird, ist es zum Beispiel in den Ländern des angloamerikanischen Raums nicht für die humane Anwendung zugelassen. Dies schränkt die vorbildgetreue Anwendung unseres dualen Perfusionsmodells in diesen Ländern deutlich ein. Wir betonen jedoch, dass wir die Vasodilatation mittels Metamizol nur als eine, in Deutschland sehr praktikable Strategie vorstellen. Wir gehen davon aus, dass andere Vasodilatoren ähnliche Ergebnisse erzielen werden. Zuletzt muss erwähnt werden, dass die Gruppengröße für diese Arbeit mit $n = 4$ eher klein gewählt war, was den Nachweis statistischer Signifikanzen an einigen Stellen erschwert hat.

Wir präsentieren in dieser Arbeit ein Rattenmodell für die duale normotherme *ex vivo* Leberperfusion über sechs Stunden. Wir zeigen, dass die Druckkontrolle mittels suffizienter Vasodilatation grundlegende Voraussetzung für die erfolgreiche prolongierte dNEVLP ist und schlagen Metamizol als potenten und praktikablen Vasodilatator vor. Des Weiteren ziehen wir den Vergleich zwischen der dualen und portalvenösen normothermen *ex vivo* Leberperfusion und zeigen, dass die duale der portalvenösen normothermen *ex vivo* Leberperfusion im Rattenmodell überlegen ist.

8. Literaturverzeichnis

1. Claussen F, Gassner JMGV, Moosburner S, Wyrwal D, Nösser M, Tang P, Wegener L, Pohl J, Reutzel-Selke A, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Dual versus single vessel normothermic ex vivo perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation. *PloS one*. 2020;15(7):e0235635.
2. Habka D, Mann D, Landes R, Soto-Gutierrez A. Future Economics of Liver Transplantation: A 20-Year Cost Modeling Forecast and the Prospect of Bioengineering Autologous Liver Grafts. *PloS one*. 2015;10(7):e0131764.
3. Tacke F, Kroy DC, Barreiros AP, Neumann UP. Liver transplantation in Germany. *Liver Transplantation*. 2016;22(8):1136-42.
4. Pais R, Barritt ASt, Calmus Y, Scatton O, Runge T, Lebray P, Poynard T, Ratziu V, Conti F. NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *Journal of hepatology*. 2016;65(6):1245-57.
5. Pezzati D, Ghinolfi D, De Simone P, Balzano E, Filipponi F. Strategies to optimize the use of marginal donors in liver transplantation. *World journal of hepatology*. 2015;7(26):2636-47.
6. Vodkin I, Kuo A. Extended Criteria Donors in Liver Transplantation. *Clinics in liver disease*. 2017;21(2):289-301.
7. Sass DA, Reich DJ. Liver transplantation in the 21st century: expanding the donor options. *Gastroenterology clinics of North America*. 2011;40(3):641-58.
8. Orman ES, Mayorga ME, Wheeler SB, Townsley RM, Toro-Diaz HH, Hayashi PH, Barritt ASt. Declining liver graft quality threatens the future of liver transplantation in the United States. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2015;21(8):1040-50.
9. Nemes B, Gámán G, Polak WG, Gelley F, Hara T, Ono S, Baimakhanov Z, Piros L, Eguchi S. Extended criteria donors in liver transplantation Part I: reviewing the impact of determining factors. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 2016;10(7):827-39.
10. Kim WR, Lake JR, Smith JM. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Liver 2016.
11. Moosburner S, Sauer IM, Gassner J, Schleicher C, Bosebeck D, Rahmel A, Pratschke J, Raschzok N. Macrosteatosis is a huge problem in liver transplantation-however, not the only one we face. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2019.
12. de Graaf EL, Kench J, Dilworth P, Shackel NA, Strasser SI, Joseph D, Pleass H, Crawford M, McCaughan GW, Verran DJ. Grade of deceased donor liver macrovesicular steatosis impacts graft and recipient outcomes more than the Donor Risk Index. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2012;27(3):540-6.
13. Lué A, Solanas E, Baptista P, Lorente S, Araiz JJ, Garcia-Gil A, Serrano MT. How important is donor age in liver transplantation? *World Journal of Gastroenterology*. 2016;22(21):4966.
14. Attia M, Silva MA, Mirza DF. The marginal liver donor--an update. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2008;21(8):713-24.
15. McCormack L, Dutkowski P, El-Badry AM, Clavien PA. Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *Journal of hepatology*. 2011;54(5):1055-62.

16. Okaya T, Blanchard J, Schuster R, Kuboki S, Husted T, Caldwell CC, Zingarelli B, Wong H, Solomkin JS, Lentsch AB. Age-dependent responses to hepatic ischemia/reperfusion injury. *Shock*. 2005;24(5):421-7.
17. Nativ NI, Maguire TJ, Yarmush G, Brasaemle DL, Henry SD, Guarrera JV, Berthiaume F, Yarmush ML. Liver Defatting: An Alternative Approach to Enable Steatotic Liver Transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2012;12(12):3176-83.
18. Hagen T, Yowe D, Bartholomew J, Wehr C, Do K, Park J, Ames B. Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats- membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(7):3064-9.
19. Okaya T, Blanchard J, Schuster R, Kuboki S, Husted T, Caldwell CC, Zingarelli B, Wong H, Solomkin JS, Lentsch AB. Age-Dependent Responses to Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury. *Shock*. 2005;24(5):421-7.
20. Kollmann D, Selzner M. Recent advances in the field of warm ex-vivo liver perfusion. *Current opinion in organ transplantation*. 2017;22(6):555-62.
21. Bellini MI, Nozdrin M, Yiu J, Papalois V. Machine Perfusion for Abdominal Organ Preservation: A Systematic Review of Kidney and Liver Human Grafts. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(8):1221.
22. Selzner M, Goldaracena N, Echeverri J, Kathis JM, Linares I, Selzner N, Serrick C, Marquez M, Sapisochin G, Renner EL, Bhat M, McGilvray ID, Lilly L, Greig PD, Tsien C, Cattral MS, Ghanekar A, Grant DR. Normothermic ex vivo liver perfusion using steen solution as perfusate for human liver transplantation: First North American results. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2016;22(11):1501-8.
23. Dutkowski P, Polak WG, Muiesan P, Schlegel A, Verhoeven CJ, Scalera I, DeOliveira ML, Kron P, Clavien P-A. First Comparison of Hypothermic Oxygenated Perfusion Versus Static Cold Storage of Human Donation After Cardiac Death Liver Transplants. *Annals of surgery*. 2015;262(5):764-71.
24. Imber CJ, St Peter SD, Lopez de Cenarruzabeitia I, Pigott D, James T, Taylor R, McGuire J, Hughes D, Butler A, Rees M, Friend PJ. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation*. 2002;73(5):701-9.
25. Xu H, Berendsen T, Kim K, Soto-Gutierrez A, Bertheium F, Yarmush ML, Hertl M. Excorporeal normothermic machine perfusion resuscitates pig DCD livers with extended warm ischemia. *The Journal of surgical research*. 2012;173(2):e83-8.
26. Schlegel A, Kron P, Graf R, Dutkowski P, Clavien PA. Warm vs. cold perfusion techniques to rescue rodent liver grafts. *Journal of hepatology*. 2014;61(6):1267-75.
27. Goldaracena N, Echeverri J, Spetzler VN, Kathis JM, Barbas AS, Louis KS, Adeyi OA, Grant DR, Selzner N, Selzner M. Anti-inflammatory signaling during ex vivo liver perfusion improves the preservation of pig liver grafts before transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2016;22(11):1573-83.
28. Goldaracena N, Spetzler VN, Echeverri J, Kathis JM, Cherepanov V, Persson R, Hodges MR, Janssen HL, Selzner N, Grant DR, Feld JJ, Selzner M. Inducing Hepatitis C Virus Resistance After Pig Liver Transplantation-A Proof of Concept of Liver Graft Modification Using Warm Ex Vivo Perfusion. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017;17(4):970-8.
29. Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, Heaton N, Mirza D, Perera MT, Quaglia A, Holroyd D, Vogel T, Coussios CC, Friend PJ. Liver Transplantation After Ex Vivo Normothermic Machine Preservation: A Phase 1 (First-in-Man) Clinical Trial. *American*

journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2016;16(6):1779-87.

30. Tolboom H, Pouw R, Uygun K, Tanimura Y, Izamis ML, Berthiaume F, Yarmush ML. A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue engineering*. 2007;13(8):2143-51.

31. Nosser M, Gassner J, Moosburner S, Wyrwal D, Claussen F, Hillebrandt KH, Horner R, Tang P, Reutzel-Selke A, Polenz D, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Development of a Rat Liver Machine Perfusion System for Normothermic and Subnormothermic Conditions. *Tissue engineering Part A*. 2020;26(1-2):57-65.

32. Gassner J, Nosser M, Moosburner S, Horner R, Tang P, Wegener L, Wyrwal D, Claussen F, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2019;25(2):275-87.

33. Ghinolfi D, Rreka E, De Tata V, Franzini M, Pezzati D, Fierabracci V, Masini M, Cacciatoinsilla A, Bindi ML, Marselli L, Mazzotti V, Morganti R, Marchetti P, Biancofiore G, Campani D, Paolicchi A, De Simone P. Pilot, Open, Randomized, Prospective Trial for Normothermic Machine Perfusion Evaluation in Liver Transplantation From Older Donors. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2019;25(3):436-49.

34. Echeverri J, Goldaracena N, Kathis JM, Linares I, Roizales R, Kollmann D, Hamar M, Urbanellis P, Ganesh S, Adeyi OA, Tazari M, Selzner M, Selzner N. Comparison of BQ123, Epoprostenol, and Verapamil as Vasodilators During Normothermic Ex Vivo Liver Machine Perfusion. *Transplantation*. 2018;102(4):601-8.

35. Kaya B, Elcin Isilgan S, Serel S, Ergun H. Metamizole: an effective solution for vasospasm. *Journal of plastic surgery and hand surgery*. 2016;50(3):151-5.

36. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, Odeh-Ramadan R, Kinkhabwala M, Goldstein MJ, Ratner LE, Renz JF, Lee HT, Brown JRS, Emond JC. Hypothermic Machine Preservation in Human Liver Transplantation: The First Clinical Series. *American Journal of Transplantation*. 2010;10(2):372-81.

37. Nasralla D, Coussios CC, Mergental H, Akhtar MZ, Butler AJ, Ceresa CDL, Chiocchia V, Dutton SJ, García-Valdecasas JC, Heaton N, Imber C, Jassem W, Jochmans I, Karani J, Knight SR, Kocabayoglu P, Malagò M, Mirza D, Morris PJ, Pallan A, Paul A, Pavel M, Perera MTPR, Pirenne J, Ravikumar R, Russell L, Upponi S, Watson CJE, Weissenbacher A, Ploeg RJ, Friend PJ. A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature*. 2018;557(7703):50-6.

38. Miller L, Bly C, Watson M, Bale W. The dominant role of the liver in plasma protein synthesis - a direct study of the isolated rat liver with the aid of lysine-6-C14. *Journal of Experimental Medicine*. 1951;94(5):431-53.

39. Sahin S, Rowland M. Estimation of aqueous distributional spaces in the dual perfused rat liver. *The Journal of physiology*. 2000;528 Pt 1:199-207.

40. Sliker JC, Farid WR, van Eijck CH, Lange JF, van Bommel J, Metselaar HJ, de Jonge J, Kazemier G. Significant contribution of the portal vein to blood flow through the common bile duct. *Annals of surgery*. 2012;255(3):523-7.

41. Noack K, Bronk SF, Kato A, Gores GJ. The greater vulnerability of bile duct cells to reoxygenation injury than to anoxia. Implications for the pathogenesis of biliary strictures after liver transplantation. *Transplantation*. 1993;56(3):495-500.

42. Mora N, Kaptanoglu L, Zhang Z, Niekrasz M, Black S, Ver Steeg K, Wade R, Siddall V, Pao W, Walsh W, Ivancic D, Kaufman D, Abecassis M, Stuart F, Blei A, Leventhal J, Fryer J. Single vs Dual Vessel Porcine Extracorporeal Liver Perfusion. *Journal of Surgical Research*. 2002;103(2):228-35.
43. Op den Dries S, Karimian N, Westerkamp AC, Sutton ME, Kuipers M, Wiersema-Buist J, Ottens PJ, Kuipers J, Giepmans BN, Leuvenink HG, Lisman T, Porte RJ. Normothermic machine perfusion reduces bile duct injury and improves biliary epithelial function in rat donor livers. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2016;22(7):994-1005.
44. t Hart NA, van der Plaats A, Moers C, Leuvenink HG, Wiersema-Buist J, Verkerke GJ, Rakhorst G, Ploeg RJ. Development of the isolated dual perfused rat liver model as an improved reperfusion model for transplantation research. *The International journal of artificial organs*. 2006;30(2):219-27.
45. Bruggenwirth IMA, Moore C, Mahboub P, Thijssen MF, E X, Leuvenink HGD, Mandrekar P, Wang X, Kowalik TF, Porte RJ, Martins PN. A Comparative Study of Single and Dual Perfusion During End-ischemic Subnormothermic Liver Machine Preservation. *Transplantation direct*. 2018;4(11):e400.
46. Sabate M, Ibanez L, Perez E, Vidal X, Buti M, Xiol X, Mas A, Guarner C, Forne M, Sola R, Castellote J, Rigau J, Laporte JR. Risk of acute liver injury associated with the use of drugs: a multicentre population survey. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007;25(12):1401-9.
47. Krisai P, Rudin D, Grunig D, Scherer K, Pichler W, Terracciano L, Krahenbuhl S. Acute Liver Failure in a Patient Treated With Metamizole. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:996.
48. Mergental H, Stephenson BTF, Laing RW, Kirkham AJ, Neil DAH, Wallace LL, Boteon YL, Widmer J, Bhogal RH, Perera M, Smith A, Reynolds GM, Yap C, Hubscher SG, Mirza DF, Afford SC. Development of Clinical Criteria for Functional Assessment to Predict Primary Nonfunction of High-Risk Livers Using Normothermic Machine Perfusion. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2018;24(10):1453-69.

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Felix Johannes Claussen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Entwicklung und Evaluation eines Modells für die duale normotherme *ex vivo*-Perfusion von Rattenlebern“ / “Development and evaluation of a dual vessel normothermic *ex vivo* perfusion model for rat liver grafts“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

10. Ausführliche Anteilserklärung

Publikation: Claussen F, Gassner JMGV, Moosburner S, Wyrwal D, Nösser M, Tang P, Wegener L, Pohl J, Reutzel-Selke A, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. „*Dual versus single vessel normothermic ex vivo perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation*“, PLoS One

Online Veröffentlichung: 02. Juli 2020

Die hier vorgestellte Forschungsarbeit geht aus der durch die Organ Recovery Group (Projektleitung: Priv.-Doz. Dr. Nathanael Raschzok) der Experimentellen Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Leitung: Prof. Dr. Igor M. Sauer) angestrebten Etablierung eines Modells für die duale normotherme Maschinenperfusion von Rattenlebern hervor. Ich habe dieses Perfusionssystem auf der Grundlage des von Joseph Gassner, Maximilian Nösser und Simon Moosburner etablierten Modells zur portalvenösen normothermen Maschinenperfusion der Rattenleber entwickelt. Die beschriebenen operativen Verfahren habe ich, ebenfalls gemeinsam mit Joseph Gassner und Maximilian Nösser, an die in der Arbeitsgruppe vorbestehenden Methoden angepasst. Das Konzept der dualen Perfusion der Rattenleber sowie das der Vasodilatation mittels Metamizol wurden von mir entwickelt und die hierzu notwendige Literaturrecherche von mir durchgeführt. Die konzeptionellen technischen Zeichnungen des Kreislaufs sowie die Fotos der Leber im Perfusionskreislauf, die in „*Figure 1*“ der Publikation zu sehen sind, habe ich angefertigt. Ich habe für alle Perfusionsversuche den überwiegenden Arbeitsanteil (>80%), nämlich den Aufbau des Perfusionskreislaufs, die Überwachung der Perfusion und die Probenentnahmen selbst durchgeführt. Die Organentnahmen wurden von Joseph Gassner und Lara Wegener durchgeführt. Die Blutgasanalysen und die Messung der Gallenenzyme wurden von mir durchgeführt. Die histologischen Schnitte in H&E- und TUNEL-Färbung habe ich mit der Unterstützung von David Wyrwal und Peter Tang angefertigt. Die Mikrographieaufnahmen der gefärbten Gewebeschnitte habe ich angefertigt und randomisiert für die Auswertung durch die Pathologin Dr. Arsenic zusammengestellt. Für das Manuskript zur Veröffentlichung in *Plos One* habe ich repräsentative Bilder der histologischen Schnitte ausgewählt und zusammengestellt. Hieraus ist „*Figure 4*“ der Publikation hervorgegangen. Ich habe die von mir erhobenen Daten gemeinsam mit Simon Moosbruner statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Aus dieser Auswertung sind „*Figure 2,3,5 und 6*“ und „*S1 File*“ (*supporting information*) der Publikation hervorgegangen. Insgesamt habe ich das Konzept der Publikation in Plos One gemeinsam mit Priv.-Doz. Dr. Nathanael Raschzok erstellt. Ich habe alle Teile der Publikation (*Abstract, Introduction, Methods, Results, Discussion*) eigenständig verfasst und gemeinsam mit Priv.-Doz. Dr. Nathanael Raschzok und Prof. Dr. Igor M. Sauer überarbeitet. Die im Rahmen des Begutachtungsprozess durch Plos One geforderten Revisionen wurden von mir in enger Absprache mit Priv.-Doz. Dr. Nathanael Raschzok durchgeführt.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers (PD Dr. med. Nathanael Raschzok)

Unterschrift des Doktoranden (Felix Claussen)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"MULTIDISCIPLINARY SCIENCES"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 69 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE	745,692	43.070	1.285010
2	SCIENCE	680,994	41.037	1.070190
3	National Science Review	1,842	13.222	0.006500
4	Science Advances	21,901	12.804	0.110010
5	Nature Communications	243,793	11.878	1.103290
6	Nature Human Behaviour	1,230	10.575	0.006550
7	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA	661,118	9.580	1.022190
8	Science Bulletin	3,569	6.277	0.009840
9	Scientific Data	3,240	5.929	0.015610
10	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	1,994	5.122	0.006540
11	Journal of Advanced Research	2,691	5.045	0.004780
12	Research Synthesis Methods	1,932	5.043	0.005420
13	GigaScience	2,674	4.688	0.012510
14	Annals of the New York Academy of Sciences	46,385	4.295	0.025840
15	Scientific Reports	302,086	4.011	1.061540
16	Journal of the Royal Society Interface	12,933	3.224	0.029190
17	NPJ Microgravity	203	3.111	0.000670
18	PHILOSOPHICAL TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	19,227	3.093	0.028200

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
19	FRACTALS-COMPLEX GEOMETRY PATTERNS AND SCALING IN NATURE AND SOCIETY	1,429	2.971	0.001120
20	Journal of Radiation Research and Applied Sciences	860	2.963	0.001860
21	MIT Technology Review	929	2.893	0.001910
22	JOURNAL OF KING SAUD UNIVERSITY SCIENCE	1,120	2.835	0.001670
23	PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY A-MATHEMATICAL PHYSICAL AND ENGINEERING SCIENCES	18,683	2.818	0.018940
24	PLoS One	650,727	2.776	1.706770
25	COMPLEXITY	2,753	2.591	0.003890
26	Royal Society Open Science	4,118	2.515	0.017150
27	PeerJ	11,911	2.353	0.045900
28	SCIENCE AND ENGINEERING ETHICS	1,719	2.275	0.003450
29	INTERNATIONAL JOURNAL OF BIFURCATION AND CHAOS	7,008	2.145	0.007390
30	Symmetry-Basel	2,097	2.143	0.002590
31	SCIENTIFIC AMERICAN	6,609	1.946	0.003540
32	Science of Nature	508	1.839	0.002000
33	PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY SERIES B-PHYSICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES	1,532	1.833	0.001960
34	Journal of Taibah University for Science	779	1.640	0.001240
35	Frontiers in Life Science	241	1.622	0.000500
36	ARABIAN JOURNAL FOR SCIENCE AND ENGINEERING	3,838	1.518	0.005840
37	SCIENCE PROGRESS	521	1.500	0.000400

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
38	Proceedings of the Romanian Academy Series A-Mathematics Physics Technical Sciences Information Science	497	1.402	0.000900
39	SOUTH AFRICAN JOURNAL OF SCIENCE	2,604	1.351	0.002010
40	ISSUES IN SCIENCE AND TECHNOLOGY	428	1.214	0.000990
41	Jove-Journal of Visualized Experiments	13,650	1.108	0.035180
42	RENDICONTI LINCEI-SCIENZE FISICHE E NATURALI	750	1.087	0.001080
43	ENDEAVOUR	540	1.068	0.000440
44	DISCRETE DYNAMICS IN NATURE AND SOCIETY	1,962	0.973	0.003690
45	Mathematical Modelling of Natural Phenomena	679	0.949	0.001930
46	ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS	2,841	0.938	0.003410
47	Kuwait Journal of Science	225	0.891	0.000340
48	ADVANCES IN COMPLEX SYSTEMS	618	0.867	0.000340
49	JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF NEW ZEALAND	648	0.774	0.000400
50	CURRENT SCIENCE	10,540	0.756	0.006420
51	JOURNAL OF THE INDIAN INSTITUTE OF SCIENCE	391	0.742	0.000530
52	Iranian Journal of Science and Technology Transaction A-Science	499	0.692	0.000460
53	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES INDIA SECTION A-PHYSICAL SCIENCES	309	0.681	0.000400
54	TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF SOUTH AUSTRALIA	444	0.667	0.000200
55	DEFENCE SCIENCE JOURNAL	928	0.589	0.000560
56	Sains Malaysiana	1,337	0.540	0.001320
57	Proceedings of the Estonian Academy of Sciences	523	0.510	0.000490
58	AMERICAN SCIENTIST	2,425	0.507	0.001110

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
59	SCIENTIST	268	0.493	0.000380
60	HERALD OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES	331	0.492	0.000380
61	Maejo International Journal of Science and Technology	218	0.481	0.000230
62	SCIENCEASIA	618	0.452	0.000540
63	JOURNAL OF THE NATIONAL SCIENCE FOUNDATION OF SRI LANKA	285	0.419	0.000280
64	ACTA SCIENTIARUM-TECHNOLOGY	344	0.356	0.000470
65	Chiang Mai Journal of Science	502	0.342	0.000650
66	NEW SCIENTIST	918	0.332	0.001340
67	NATIONAL ACADEMY SCIENCE LETTERS-INDIA	433	0.331	0.000700
68	COMPTES RENDUS DE L ACADEMIE BULGARE DES SCIENCES	578	0.321	0.000550
69	INTERDISCIPLINARY SCIENCE REVIEWS	306	0.140	0.000150

Copyright © 2019 Clarivate Analytics

RESEARCH ARTICLE

Dual versus single vessel normothermic *ex vivo* perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation

Felix Claussen¹, Joseph M. G. V. Gassner¹, Simon Moosburner¹, David Wyrwal¹, Maximilian Nösser¹, Peter Tang¹, Lara Wegener¹, Julian Pohl¹, Anja Reutzel-Selke¹, Ruza Arsenic², Johann Pratschke¹, Igor M. Sauer^{1*}, Nathanael Raschzok^{1,3}

1 Department of Surgery, Campus Charité Mitte | Campus Virchow Klinikum, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt- Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, **2** Institute of Pathology, Charité–Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin, Humboldt- Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany, **3** BIH Charité Clinician Scientist Program, Berlin Institute of Health (BIH), Berlin, Germany

* igor.sauer@charite.de



Abstract

OPEN ACCESS

Citation: Claussen F, Gassner JMGV, Moosburner S, Wyrwal D, Nösser M, Tang P, et al. (2020) Dual versus single vessel normothermic *ex vivo* perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation. PLoS ONE 15(7): e0235635. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235635>

Editor: Michael Bader, Max Delbrück Centrum für Molekulare Medizin Berlin Buch, GERMANY

Received: March 2, 2020

Accepted: June 18, 2020

Published: July 2, 2020

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235635>

Copyright: © 2020 Claussen et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Background

Normothermic *ex vivo* liver perfusion (NEVLP) is a promising strategy to increase the donor pool in liver transplantation. Small animal models are essential to further investigate questions regarding organ preservation and reconditioning by NEVLP. A dual vessel small animal NEVLP (dNEVLP) model was developed using metamizole as a vasodilator and compared to conventional portovenous single vessel NEVLP (sNEVLP).

Methods

Livers of male Wistar rats were perfused with erythrocyte-supplemented culture medium for six hours by either dNEVLP via hepatic artery and portal vein or portovenous sNEVLP. dNEVLP was performed either with or without metamizole treatment. Perfusion pressure and flow rates were constantly monitored. Transaminase levels were determined in the perfusate at the start and after three and six hours of perfusion. Bile secretion was monitored and bile LDH and GGT levels were measured hourly. Histopathological analysis was performed using liver and bile duct tissue samples after perfusion.

Results

Hepatic artery pressure was significantly lower in dNEVLP with metamizole administration. Compared to sNEVLP, dNEVLP with metamizole treatment showed higher bile production, lower levels of transaminases during and after perfusion as well as significantly lower necrosis in liver and bile duct tissue. Biochemical markers of bile duct injury showed the same trend.

Funding: This work was funded by institutional financial support of the Charité – Universitätsmedizin Berlin, the German Research Foundation (grant number: RA 3044/3-1) and by a Kickbox Seed Grant of the Einstein Center for Regenerative Therapies. Nathanael Raschzok is fellow of the BIH Charité Clinician Scientist Program funded by the Charité – Universitätsmedizin Berlin and the Berlin Institute of Health.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abbreviations: ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; dNEVLP, dual vessel normothermic *ex vivo* liver perfusion; ECD, extended criteria donor; GGT, gamma glutamyltransferase; H&E, haematoxylin and eosin; HA, hepatic artery; HTK, histidine-tryptophan-ketoglutarate solution; LDH, lactate dehydrogenase; NEVLP, normothermic *ex vivo* liver perfusion; PV, portal vein; sNEVLP, single vessel Normothermic *ex vivo* liver perfusion; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

Conclusion

Our miniaturized dNEVLP system enables normothermic dual vessel rat liver perfusion. The administration of metamizole effectively ameliorates arterial vasospasm allowing for six hours of dNEVLP, with superior outcome compared to sNEVLP.

Introduction

Liver transplantation is still the only curative treatment option for end stage liver disease. However, there has been an increasing mismatch of organ supply and demand in recent years [1]. The reasons for this development are manifold including progressive aging of the population and increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in many countries [2, 3]. The severe organ shortage makes the use of marginal organs from so-called extended criteria donors (ECD) necessary [4]. ECDs are donors that do not meet the usual criteria for liver transplantation and are for example old or severely overweight [5, 6]. Data of the *United Network for Organ Sharing* show an increasing number of donors that are of high age or severely overweight [7]. Indeed, in Germany, up to 75% of liver grafts transplanted fulfil at least one *Eurotransplant* criterion for extended criteria donors [8]. However, it has been shown, that marginal organs from ECDs perform significantly worse and show higher rates of post-transplantation complications than organs from donors matching the usual transplantation criteria [9, 10]. This is commonly attributed to their increased susceptibility to ischemia-reperfusion injury after cold storage and consecutive warm reperfusion [10, 11].

The necessity of using ECD liver grafts, resulting in poorer patient outcome after cold static storage and transplantation, calls for new strategies for organ preservation. In recent years normothermic *ex vivo* liver perfusion (NEVLP) has been proven to be a useful alternative to static cold storage of liver grafts [12]. Several studies have demonstrated that NEVLP improves preservation of both fit and marginal liver grafts compared to static cold storage [13–15]. Besides its beneficial effects on the preservation of donor organs NEVLP, unlike subnormothermic or hypothermic *ex vivo* liver perfusion, also offers the opportunity to metabolically characterize the graft prior to transplantation and to perform pharmacological interventions that rely on a fully functional metabolism and near-to-physiological conditions. Such interventions could improve the quality of marginal liver grafts that are otherwise not acceptable for transplantation [12, 16, 17].

In order to develop and investigate organ recovery strategies based on NEVLP, animal models are needed. Since porcine models are costly and require highly developed infrastructures, small animal models seem more feasible for this task. Several models for *ex vivo* machine perfusion of rodent livers have been introduced in recent years. The majority of these models propose single vessel perfusion through the portal vein (PV). However, considering the physiological situation, a dual vessel approach, realizing perfusion through both the PV and the hepatic artery (HA), seems more coherent. Also, a dual vessel small animal NEVLP model would correspond to the clinical situation more adequately since NEVLP devices for human liver grafts also employ dual vessel perfusion [18–20].

We developed a dual vessel normothermic *ex vivo* liver perfusion (dNEVLP) model for rat livers that would sustain stable perfusion conditions for a perfusion period of six hours. We developed a flow-controlled perfusion system using metamizole to mitigate arterial vasospasm and control arterial perfusion pressure. Amongst other qualities, metamizole is known to have spasmolytic effects and has been shown to effectively ameliorate arterial vasospasm of the HA

of the rat [21, 22]. Subsequently we compared our previously established single vessel NEVLP model (sNEVLP) to our new dNEVLP model [23].

Methods

Perfusion setup

The laboratory-scaled sNEVLP setup, as initially described by Gassner et al. [23], consisted of a custom-made glass perfusion chamber with multiple inlets (Glass Gafner GmbH, Munich, Germany). A flow-controlled roller pump provided a continuous flow through the portal vein. Flow was set to 1 mL/min/g liver weight through the portal vein. A pressure sensor ensured continuous monitoring of the portal venous pressure. Average initial pressure was 5.65 mmHg. Portovenous pressures up to 9 mmHg were considered physiological. Pressures were continuously recorded with BDAS 2.0 software (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Gas exchange was ensured by a silicon membrane oxygenator (Radnoti, Dublin, Ireland) with a priming volume of 10 mL and 90% oxygen atmosphere. A glass bubble trap prevented air embolization and worked as a *Windkessel* to ensure laminar flow through the portal vein. A dialysis circuit was diverted from the main perfusion circuit directly after the perfusion chamber. Another roller pump brought perfusate to the dialysis cartridge with a constant flow of 10 mL/min. 500 mL of Ci-Ca dialysate K2 (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) substituted with 12 mM glycine were used. Dialysate flow of 10 mL/min was generated by two roller pumps, one up- and one downstream from the dialysis cartridge, allowing flow adjustments to counteract volume shifts. 1000 IE/h Heparin (Rotexmedica, Trittau, Germany) and 500 μ L/h of 1.2 M glycine (45 mg/h) were continuously infused using a syringe driver (*Perfusor*[®], B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany, Fig 1A).

For dual vessel NEVLP (dNEVLP) a second flow-controlled roller pump, installed downstream to the first one, diverted a defined volume from the main circuit, generating a pulsatile flow through the hepatic artery. Flow was set to 1.1 mL/min/g liver weight for the first roller pump and 0.1 mL/min/g liver weight for the second roller pump, generating a flow of 1 mL/min/g liver weight through the portal vein and 0.1 mL/min/g liver weight through the hepatic artery. A second pressure sensor allowed continuous monitoring of the arterial pressure. Average initial arterial pressure was 48.8 mmHg and pressures up to 110 mmHg were considered physiological. The rest of the perfusion circuit was set up in the exact same manner as described for sNEVLP (Fig 1B).

In metamizole treatment groups, 100 mg boluses of metamizole sodium (*Winthrop Arzneimittel GmbH*, Frankfurt am Main, Germany) were administered into the hepatic artery either hourly or on demand at a pressure cutoff of 110 mmHg.

Animals and group protocols

Male Wistar rats were purchased from *Janvier* (Le Genest-Saint-Isle, France). To allow for adequate acclimatisation, animals were kept on a 12-hour light-dark cycle for a minimum of one week. All procedures were conducted within a weight range of 280–350 g and with the approval of the local authorities for animal welfare and testing (LaGeSo Berlin, O0365/11). Rats were randomly assigned to 4 groups: dNEVLP without metamizole treatment (dNEVLP^{-M}, n = 4), dNEVLP with hourly administration of metamizole beginning one hour after perfusion start (dNEVLP^{MH}, n = 4), dNEVLP with administration of metamizole on demand at a pressure cut-off of 110 mmHg (dNEVLP^{MP}, n = 4) and sNEVLP (sNEVLP, n = 4) as baseline control. In a first step the three dNEVLP groups were compared. Subsequently the best dNEVLP group was compared to the sNEVLP group.

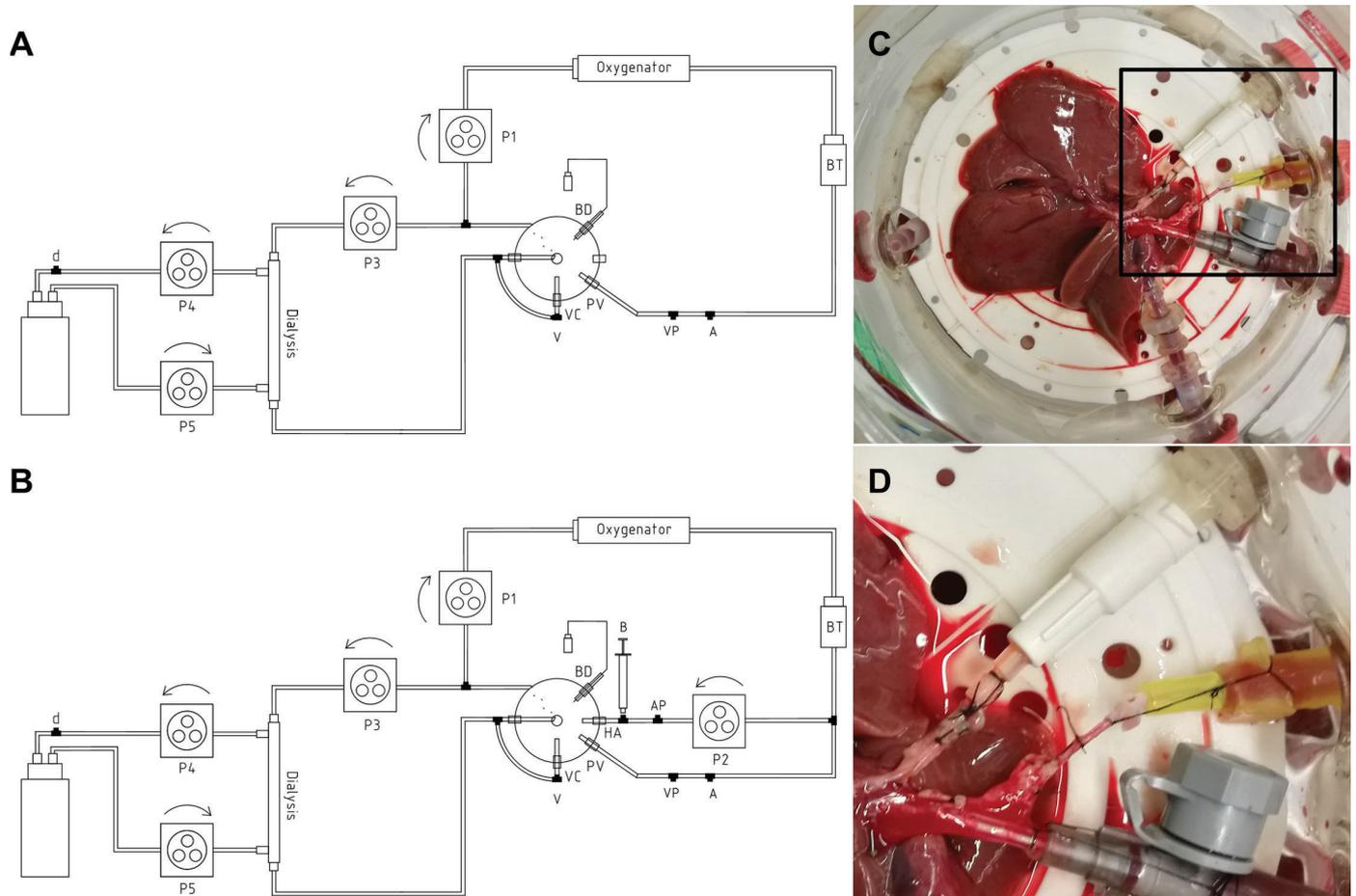


Fig 1. Perfusion setups. (A) Technical drawing of the sNEVLP setup consisting of the perfusion chamber with inlets for the portal vein (PV) and outlets for the vena cava (VC) and bile duct (BD), an oxygenator, a bubble trap (BT), a dialysis circuit and four roller pumps (P1, P3-5). Several outlets within the perfusion circuit allowed for sample collection of the arterial (A) and venous (V) perfusate and dialysate (d) and for measurement of the portovenous pressure (PV). (B) Technical drawing of the dNEVLP setup with an additional inflow for the hepatic artery (HA), a fifth roller pump (P2) and another two outlets for metazolol bolus application (B) and measurement of the arterial pressure (AP). (C) Liver in the perfusion chamber (dNEVLP) with cannulated bile duct, hepatic artery, portal vein and infrahepatic vena cava (top to bottom). (D) Close-up on cannulated hepatic artery (yellow cannula) with patch from abdominal aorta.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235635.g001>

Surgical procedures

General anaesthesia was performed on animals using isoflurane inhalation and subcutaneous injections of 100 mg/kg metazolol (*Winthrop Arzneimittel GmbH*, Frankfurt am Main, Germany) and 12 mg/kg ketamine (*CP-Pharma*, Burgdorf, Germany). Subsequently, the abdominal cavity was opened. The liver was freed from its ligaments and the bile duct was catheterized using a custom-built catheter. The gastroduodenal, left gastric and splenic artery were ligated. 1 mL of Ringer solution supplemented with 500 IE Heparin (*Rotexmedica*, Trittau, Germany) was injected into the abdominal vena cava inferior. The abdominal aorta and the portal vein were cannulated for blood collection and later flushing. In the dNEVLP groups the hepatic artery was cannulated through an aortic patch (**Fig 1C and 1D**). The thoracic cavity was opened, and the thoracic aorta clamped. The liver was flushed via both, the aorta and the portal vein with 20 mL of 4°C cold HTK-solution (*Dr. Franz Köhler Chemie GmbH*, Bensheim, Germany), supplemented with 12mM glycine. Time between blood collection and cold flushing of the liver (warm ischemia time, WIT) did not exceed 15 minutes. The right

suprarenal vein, the oesophageal veins and the suprahepatic vena cava were ligated. A custom-made cannula was inserted into the infrahepatic vena cava. The liver was completely mobilised and then transferred into a pre-weighed container filled with cold HTK-solution supplemented with 12 mM glycine.

Perfusion procedure

The HTK solution was flushed out of the liver via the portal vein using 20 mL ringer solution. The liver was placed on a silicon mat in the perfusion chamber exposing the hilum (Fig 1C). The portal vein, vena cava and hepatic artery (only in dNEVLP groups, Fig 1D) were connected to the perfusion circuit. The bile duct catheter tube was inserted into a pre-weighed collection tube to allow for free bile outflow. Cold ischemia time did not exceed 60 minutes. After connection to the perfusion circuit, the flow rates were slowly increased over a rewarming period of 15 minutes. T0 was set when full flows were reached. Subsequently the liver was perfused for six hours.

Composition of the perfusate

Erythrocytes and plasma were separated by centrifugation at 4°C and 3200 RPM for 15 minutes. The plasma phase was collected, and the buffy coat was withdrawn by suction. 10 mL of the erythrocyte concentrate were suspended in 35 mL of Dulbecco's Modified Eagle's Medium as used by Gassner et al. [23]. 5 mL of strain specific rat plasma were added generating a total perfusion volume of 50 mL with a calculated haematocrit of 20%. The perfusate was additionally supplemented with 1000 IE heparin and 12mM glycine.

Measurement of biochemical markers and blood gas analysis

Perfusate samples were taken at the start, after 3 and 6 hours of perfusion and centrifuged at 3200 RPM and 4°C for 10 minutes. The supernatant was collected for analysis. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and Urea were photometrically measured by *Labor Berlin-Charité Vivantes GmbH*. Additionally, blood gas analysis was performed on samples from the in- and outflowing perfusate (*ABL800 FLEX, Radiometer GmbH, Berlin, Germany*). Oxygen uptake was calculated according to *Tolboom et al.* [24]

Tissue sampling and histological analysis

After perfusion livers were removed from the perfusion chamber and flushed with 20 mL of Ringer solution. At least four tissue samples were collected from each liver lobe and preserved in formaldehyde and at -80°C for later histological analysis. Haematoxylin and eosin (H&E) staining (*AppliChem, Darmstadt, Germany*) was performed on 2 µm and 5 µm thick paraffin sections. A pathologist (R.A.) examined H&E-stained slices from a minimum of four different lobes from each perfused liver, blinded to the treatment groups. Levels of hepatocellular ballooning, loss of nucleus, and cellular fragmentation were assessed as markers for necrosis and sinusoidal dilatation was determined. Additionally, the hilar part of the extrahepatic bile duct, proximal to the catheter, was removed from the liver, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later analysis. H&E staining was performed on 8 µm cryo sections. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) for special tissues (*F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Switzerland*) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (*Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA*) was performed on 8 µm cryo sections according to the manufacturer's instructions. TUNEL-positive areas were measured using *NIH ImageJ* (Version: 2.0.0-rc-68/1.52f).

Bile collection and analysis

The bile was continuously collected, weighed hourly, frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C for later analysis. In order to assess epithelial cell death in the extrahepatic bile duct, lactate dehydrogenase (LDH) and gamma glutamyltransferase (GGT) were determined in the collected bile. LDH was determined by photometric measurement (LDH activity assay kit, *Sigma-Aldrich Chemie GmbH* Munich, Germany) and GGT was determined by an ELISA (*Elabscience*, Houston, USA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Data is presented as median in the text and as median and interquartile range in the tables. Categorical variables were analysed using the chi-squared test. After testing for normality using the Shapiro-Wilk test, group variables were analysed with two-way ANOVA or Kruskal-Wallis test and Bonferoni post-hoc test, accordingly. Data is presented as 95% confidence interval (CI). Overall, a p value < 0.05 was considered significant. Calculations were carried out using IBM SPSS Statistics Version 24.0 for macOS (*IBM Corp.*, Armonk, NY, USA). Graphs were generated using GraphPad Prism Version 8.11 (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA).

Results

Stable perfusion conditions were achieved for all groups

Animal and liver weight did not differ significantly between all four groups ($p = 0.47$ and $p = 0.34$, respectively). Surgical procedures were performed in the same manner for all experiments apart from the arterial preparation in the dNEVLP groups. Cold ischemia time and macroscopic flush after explanation did not differ significantly. Initial pH was within physiological range and decreased to slightly acidic conditions in all experiments without significant differences ($\text{pH}_{\text{T}0} p = 0.22$, $\text{pH}_{\text{T}3} p = 0.66$, $\text{pH}_{\text{T}6} p = 0.22$). Sodium, potassium and chloride stayed within physiological ranges in all four groups. Throughout perfusion, PV pressure did not significantly differ between all groups ($\text{PVP}_{\text{T}0} p = 0.26$, $\text{PVP}_{\text{T}3} p = 0.63$, $\text{PVP}_{\text{T}6} p = 0.87$) and did not fall below or exceed the physiological range of 4–9 mmHg in all four groups throughout perfusion. Histopathology did not show relevant edema in any of the four groups after perfusion. Oxygen consumption remained high throughout perfusion in all groups without significant differences (dNEVLP^{MP}: $\text{VO}_{2\text{T}0} = 0.03$ ml/min/g, $\text{VO}_{2\text{T}3} = 0.04$ ml/min/g, $\text{VO}_{2\text{T}6} = 0.03$ ml/min/g; dNEVLP^{MH}: $\text{VO}_{2\text{T}0} = 0.03$ ml/min/g, $\text{VO}_{2\text{T}3} = 0.04$ ml/min/g, $\text{VO}_{2\text{T}6} = 0.05$ ml/min/g; dNEVLP^M: $\text{VO}_{2\text{T}0} = 0.04$ ml/min/g, $\text{VO}_{2\text{T}3} = 0.05$ ml/min/g, $\text{VO}_{2\text{T}6} = 0.04$ ml/min/g; sNEVLP: $\text{VO}_{2\text{T}0} = 0.02$ ml/min/g, $\text{VO}_{2\text{T}3} = 0.04$ ml/min/g, $\text{VO}_{2\text{T}6} = 0.03$ ml/min/g).

Administration of metamizole significantly decreased arterial pressure and increased bile production

Initial portovenous and arterial pressures did not significantly vary between all dNEVLP groups ($\text{PVP}_{\text{T}0} p = 0.09$, $\text{aP}_{\text{T}0} p = 0.67$, [Fig 2A and 2B](#)). In the dNEVLP^M group, the arterial pressure exceeded the physiological cutoff of 110 mmHg after three hours of perfusion leading to severely high pressures of up to 190 mmHg after six hours of perfusion. A significant decrease in arterial pressure was observed after both the hourly and the pressure dependent administration of metamizole in the metamizole treatment groups. This effectively prevented an increase of the arterial pressure above 110 mmHg ($\text{aP}_{\text{T}3} p = 0.007$, $\text{aP}_{\text{T}4} p = 0.01$, $\text{aP}_{\text{T}5} p = 0.02$, $\text{aP}_{\text{T}6} p = 0.03$, [Fig 2B](#)). Arterial pressures did not significantly differ between the two metamizole treatment groups.

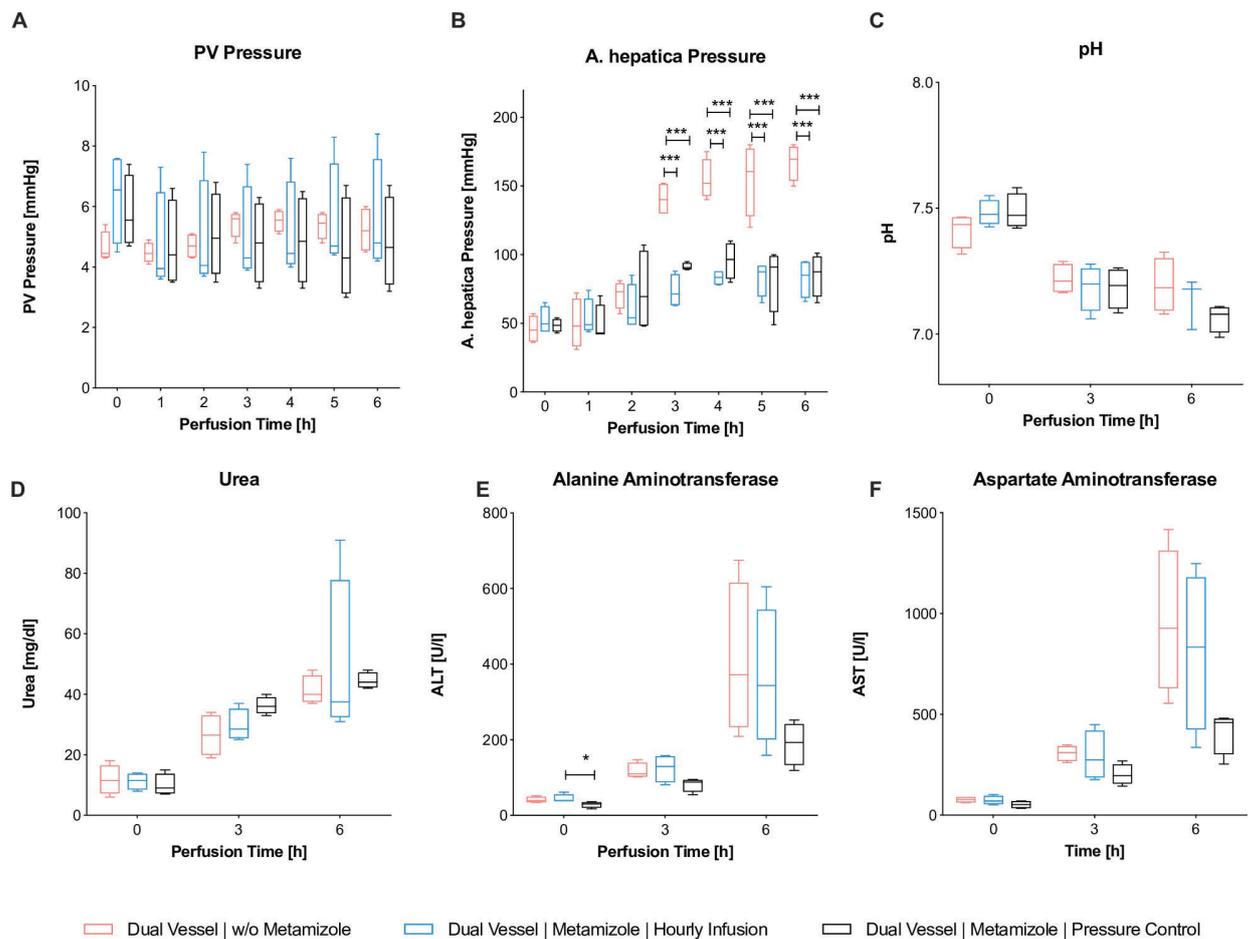


Fig 2. Comparison of dNEVLP groups 1. Comparison of the three dNEVLP groups: (A) portovenous pressure, (B) arterial pressure, (C) perfusate pH, (D) perfusate urea, (E) perfusate alanine aminotransferase, (F) perfusate aspartate aminotransferase. *** indicates $p \leq 0.001$. Data shown as median and interquartile range.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235635.g002>

Bile production significantly increased in the dNEVLP groups with metamizole application. In the second hour of perfusion bile production in the dNEVLP^{MH} group was significantly higher than in the dNEVLP^{MP} group, in which metamizole had not yet been administered, but not significantly higher than in the dNEVLP^M group ($B_{T2} p = 0.02$, Fig 3A). In the fourth hour of perfusion, bile production in the dNEVLP^{MH} group was significantly higher than in the dNEVLP^M group ($B_{T4} p = 0.04$, Fig 3A). In the fifth and sixth hour of perfusion bile production in the dNEVLP^{MP} group was significantly higher than in the dNEVLP^M group ($B_{T5} p = 0.04$, $B_{T6} p = 0.03$, Fig 3A).

Administration of metamizole on demand (dNEVLP^{MP}) achieved lowest markers of liver and bile duct damage

Between all three dNEVLP groups perfusate urea levels and pH did not differ significantly throughout perfusion ($U_{T0} p = 0.79$, $U_{T3} p = 0.1$, $U_{T6} p = 0.32$, $pH_{T0} p = 0.23$, $pH_{T3} p = 0.78$, $pH_{T6} p = 0.14$, Fig 2C and 2D). In the dNEVLP^{MH} and dNEVLP^{MP} groups lactate levels after six hours of perfusion were lower than in the dNEVLP^M groups. However, differences did not reach statistical significance ($L_{T6} p = 0.14$).

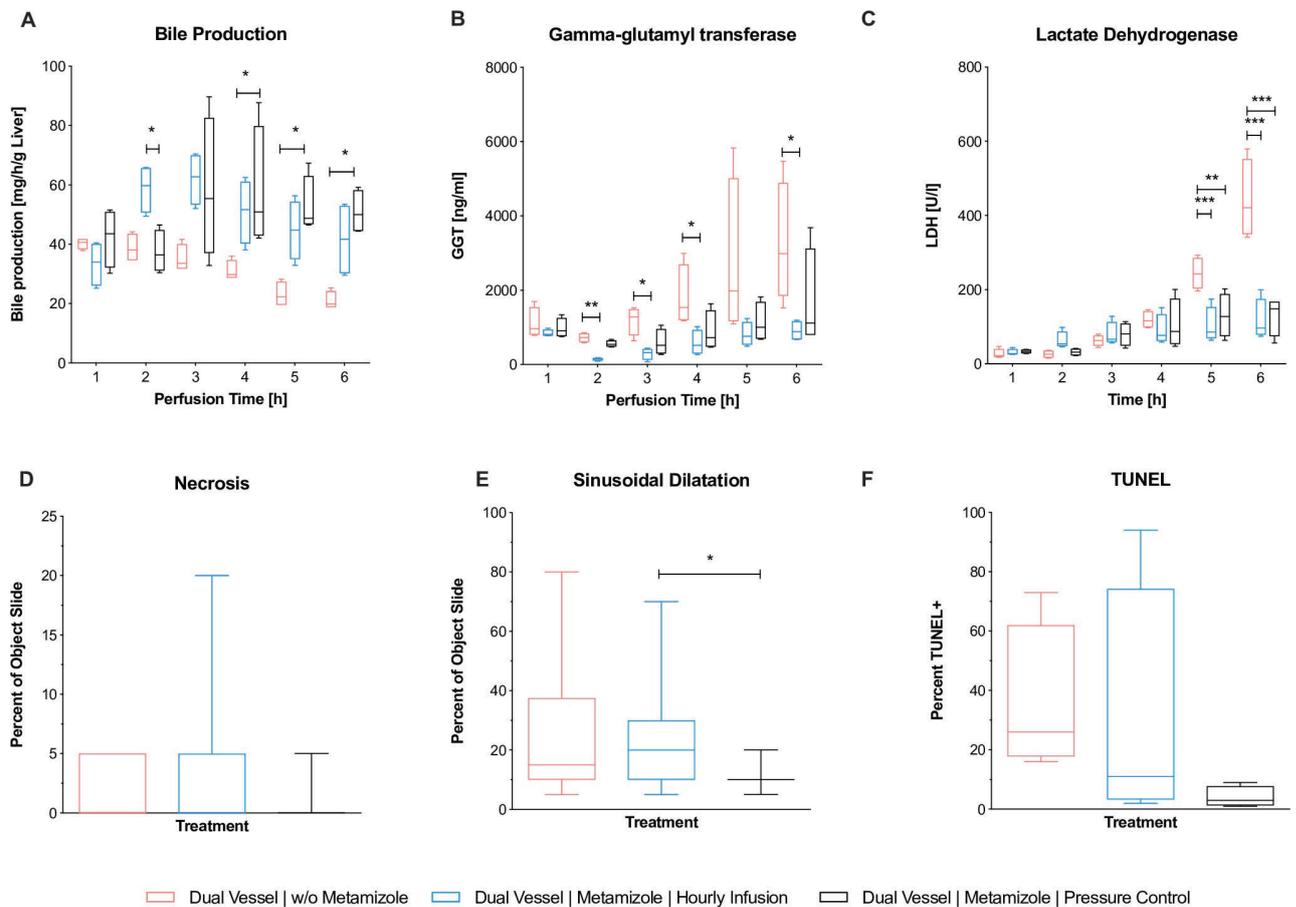


Fig 3. Comparison of dNEVLP groups 2. Comparison of the three dNEVLP groups: (A) amount of bile production, (B) bile gamma-glutamyl transferase, (C) lactate dehydrogenase within bile, (D) liver parenchyma necrosis, (E) liver parenchyma sinusoidal dilatation, (F) bile duct necrosis in TUNEL staining. * indicates $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p = 0.001$. Data shown as median and interquartile range.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235635.g003>

Initial ALT levels were significantly lower in the dNEVLP^{MP} group than in the dNEVLP^M group ($ALT_{T0} p = 0.048$; Fig 2E). In the dNEVLP^{MP} group, ALT and AST levels trended to be lower than in dNEVLP^{MH} and dNEVLP^M groups throughout perfusion (Fig 2E and 2F).

HE staining showed considerably less sinusoidal dilatation in the dNEVLP^{MP} group than in the dNEVLP^M group and significantly less sinusoidal dilatation than in the dNEVLP^{MH} group after six hours of perfusion ($p = 0.01$, Figs 3E and 4A–4C). Tissue necrosis was also lowest in the dNEVLP^{MP} group (Figs 3D, 4A–4C). However, no statistical significance could be shown ($p = 0.9$).

Measurement of bile LDH showed similar levels for all three dNEVLP groups during the first four hours of perfusion. After five and six hours of perfusion bile LDH levels were significantly lower in both metamizole treatment groups compared to the dNEVLP^M group ($p = 0.02$, Fig 3C).

Throughout perfusion bile GGT levels in the metamizole treatment groups were lower than in the non-treatment group. After two, three, four and six hours of perfusion, GGT levels in the dNEVLP^{MH} group were significantly lower than in the dNEVLP^M group (Fig 3B). GGT levels did not differ significantly between the two metamizole treatment groups.

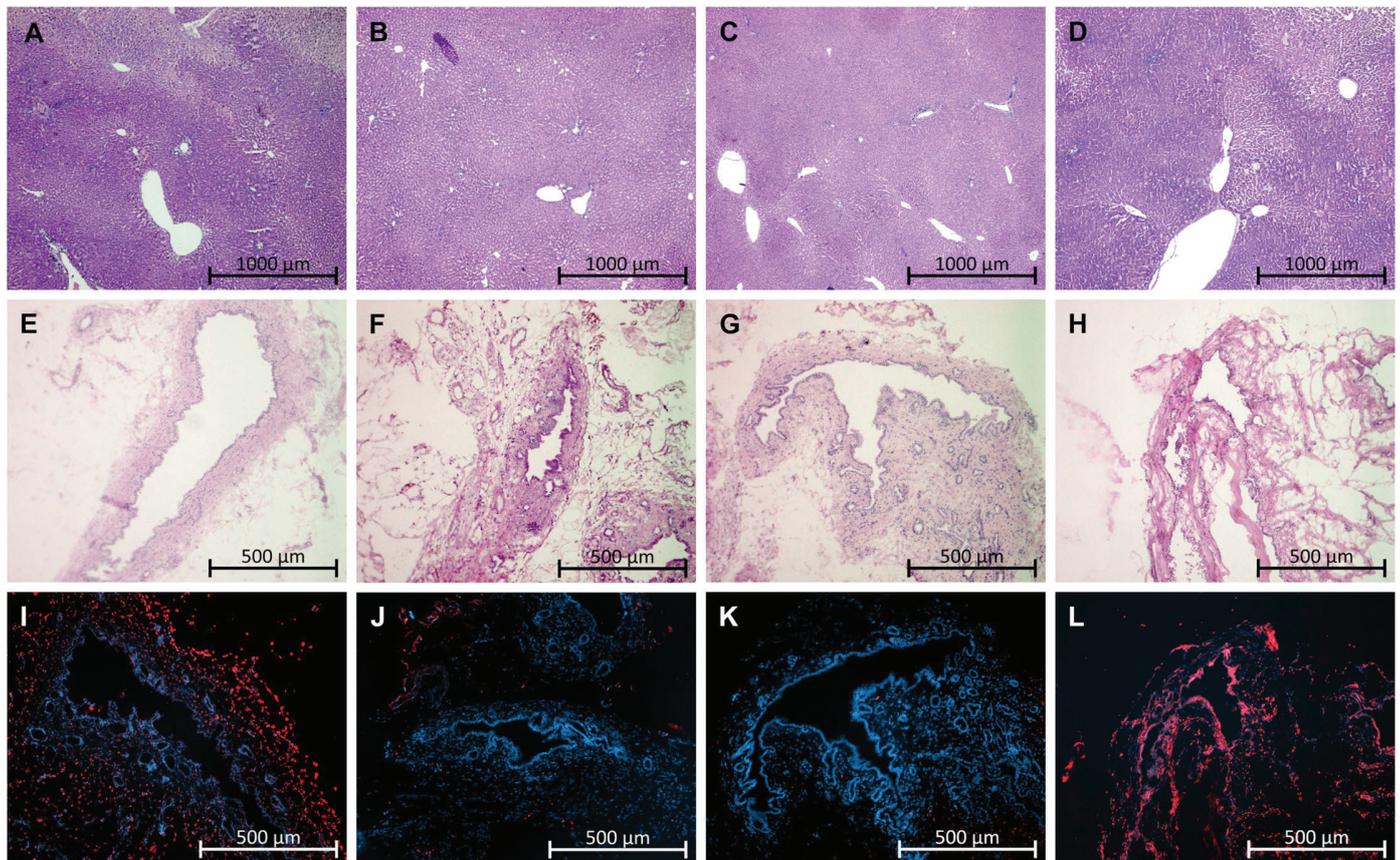


Fig 4. Histopathology. (A–D) HE staining of liver parenchyma, (E–H) HE staining of bile duct, (I–L) TUNEL & DAPI staining of bile duct, (A, E, I) dNEVLP^P, (B, F, J) dNEVLP^{MH}, (C, G, K) dNEVLP^{MP}, (D, H, L) sNEVLP.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235635.g004>

HE and TUNEL staining of the bile duct clearly showed lower necrosis in the dNEVLP^{MP} group compared to the other two groups (Figs 3F, 4E–4G and 4I–4K). However, no statistical significance could be shown ($p = 0.06$).

dNEVLP with administration of metamizole on demand (dNEVLP^{MP}) showed better liver function and lower markers of liver and bile duct damage, compared to sNEVLP

Between the two groups, perfusate pH and PV pressure did not show significant differences throughout perfusion (Fig 5A and 5B). Urea levels were higher in the dNEVLP^{MP} group, but did not reach significance (Fig 5C). Lactate levels after six hours of perfusion were lower in the dNEVLP^{MP} group than in the sNEVLP group even though differences did not reach statistical significance. Bile production was significantly higher in the dNEVLP^{MP} group from three hours of perfusion on until the end ($B_{T4} p = 0.03$, $B_{T5} p = 0.03$, $B_{T6} p = 0.03$, Fig 6A).

ALT levels were significantly lower in the dNEVLP^{MP} group after three hours and still lower after six hours of perfusion ($ALT_{T3} p = 0.03$; $ALT_{T6} p = 0.11$; Fig 5E). AST levels in the dNEVLP^{MP} group were lower after three and significantly lower after six hours of perfusion ($AST_{T3} p = 0.06$, $AST_{T6} p = 0.03$, Fig 5D).

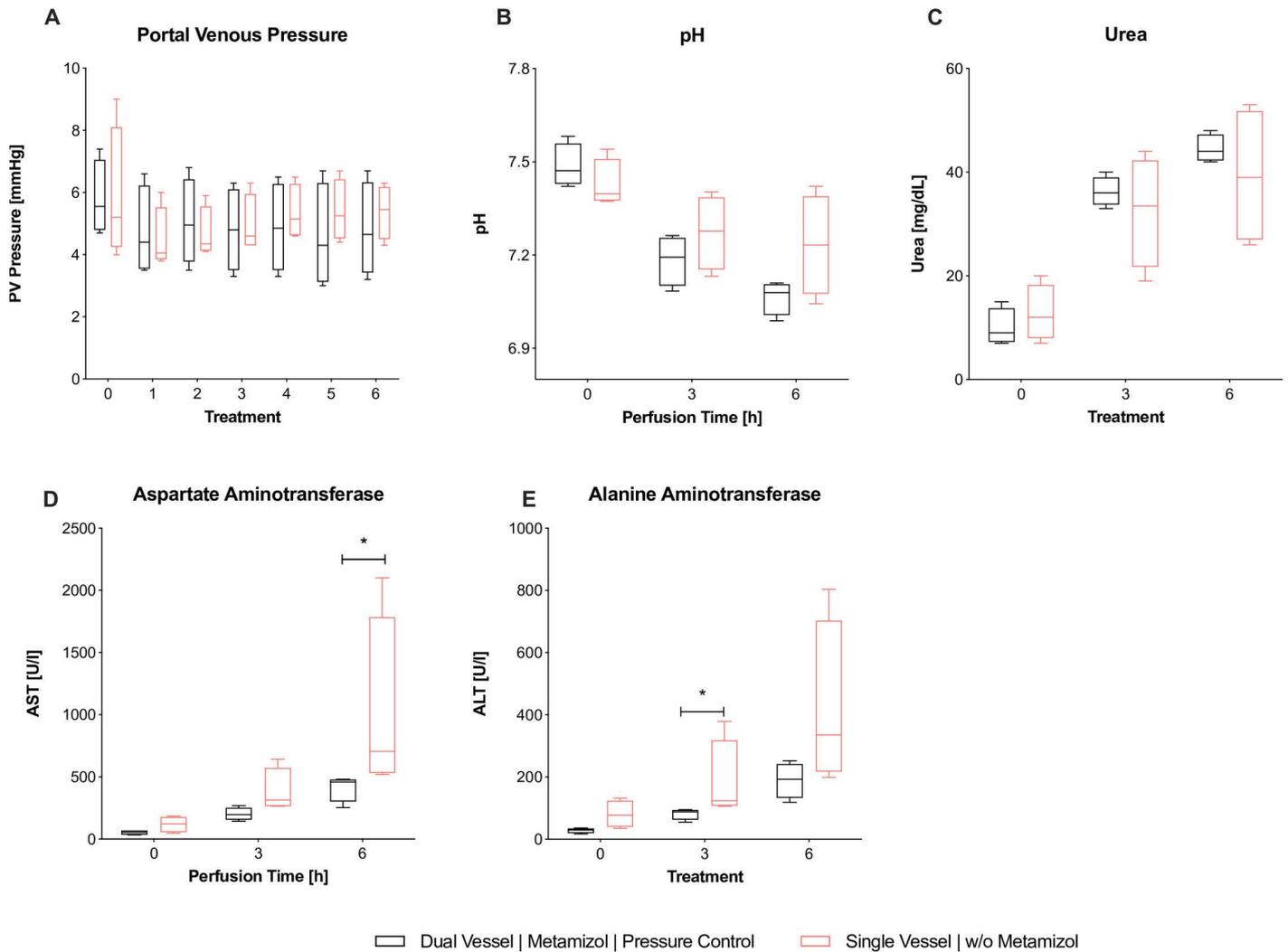


Fig 5. Comparison of dNEVLP^{MP} and sNEVLP groups 1. Comparison of dNEVLP^{MP} and sNEVLP: (A) portovenous pressure; (B) pH of perfusate, (C) urea within perfusate, (D) alanine aminotransferase within perfusate, (E) aspartate aminotransferase within perfusate. * indicates $p \leq 0.05$. Data shown as median and interquartile range.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235635.g005>

H&E staining showed significantly lower sinusoidal dilatation and necrosis in the dNEVLP^{MP} group after six hours of perfusion (necrosis $p = 0.02$, sinusoidal dilatation $p = <0.001$, **Figs 6D–6E, 4C and 4D**).

Bile LDH levels showed similar developments in both groups in the first four hours of perfusion. After five and six hours, LDH levels in the dNEVLP^{MP} group were considerably lower than in the sNEVLP group. However, no statistical significance could be shown (**Fig 6C**). As well, GGT levels trended to be lower in the dNEVLP^{MP} group from three hours of perfusion on (**Fig 6B**).

H&E and TUNEL staining of the bile duct showed significantly lower necrosis in the dNEVLP^{MP} group ($p = 0.03$, **Figs 6F, 4G–4H and 4K–4L**).

Discussion

Normothermic ex vivo liver perfusion (NEVLP) is regarded as a beneficial alternative to static cold storage in liver transplantation, especially when using marginal liver grafts. Small animal

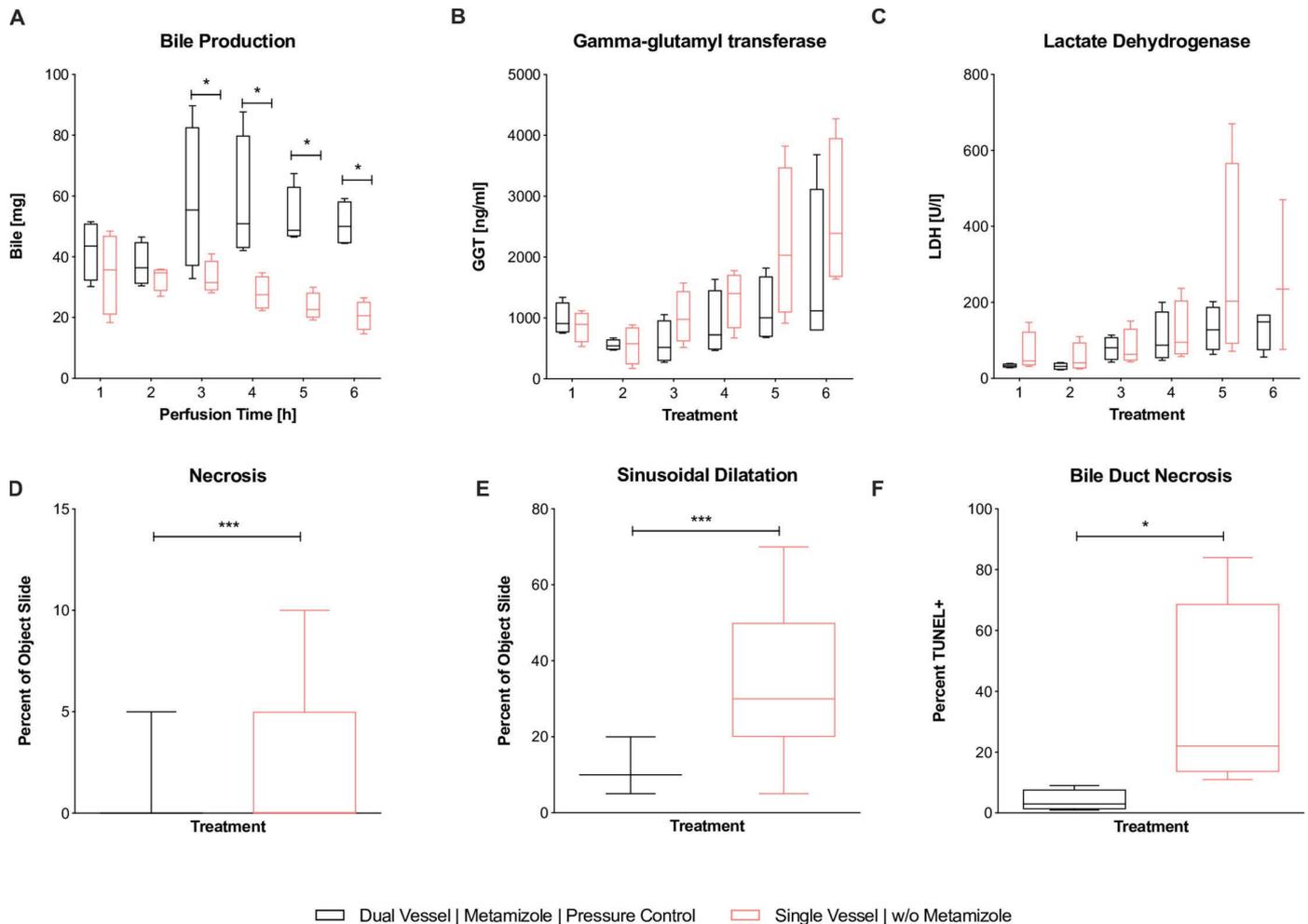


Fig 6. Comparison of dNEVLP^{MP} and sNEVLP groups 2. Comparison of dNEVLP^{MP} and sNEVLP: (A) amount of bile production, (B) gamma-glutamyl transferase within bile, (C) lactate dehydrogenase within bile, (D) liver parenchyma necrosis, (E) liver parenchyma sinusoidal dilatation, (F) bile duct necrosis in TUNEL staining. * indicates $p \leq 0.05$ and *** $p = 0.001$. Data shown as median and interquartile range.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235635.g006>

NEVLP models are needed to foster the development of strategies for organ preservation and reconditioning. In current literature, laboratory-scaled NEVLP models usually utilize single vessel perfusion, which means the organ is only perfused through the PV. *Tolboom et al.* could show that single vessel normothermic liver perfusion is a feasible strategy for organ preservation of rat livers with high survival rates after transplantation [24]. However, when it comes to metabolic reconditioning, there are many arguments for a dual vessel approach: 9–12% of rat liver parenchyma is supplied by the arterial blood flow only [25]. The extrahepatic bile duct obtains at least 49% of its blood supply exclusively from the HA and its epithelial cells are known to be especially vulnerable to ischemia [26, 27]. *Mora et al.* showed, that in porcine extracorporeal liver perfusion as a method to provide temporary liver support for patients with severe liver failure, dually perfused livers performed better than such solely perfused through the PV [28]. Generally, a dual vessel perfusion model corresponds to the physiological situation better than a single vessel perfusion model. Most importantly, it more directly reflects the clinical situation, since NEVLP devices for human liver grafts also employ dual vessel perfusion [18–20].

Despite these considerations, there are only a few studies reporting on dual vessel small animal NEVLP. *Op den Dries et al.* and *Schlegel et al.* presented dual vessel rat NEVLP models in their recent works, realizing perfusion periods of three and four hours, respectively [15, 29]. However, for ex vivo organ reconditioning, perfusion periods of more than four hours may be necessary to reflect the clinical situation, where perfusion time frequently exceeds such durations. Moreover, in our opinion, longer perfusion periods could be necessary to effectively conduct pharmacological organ reconditioning.

Although there are several arguments for dual vessel NEVLP, single vessel small animal NEVLP models are still commonly used in basic research. However, there is no evidence in literature for the equivalence of the single vessel and the dual vessel approach or even the superiority of one over the other. *t'Hart et al.* compared single and dual vessel NEVLP but were unable to accomplish perfusion periods of longer than 90 minutes without witnessing a severe escalation of arterial perfusion pressure and transaminase levels [30]. Reasons for that could include the lack of a dialysis circuit and the utilization of a cell free perfusate, as previous findings of our work group show [31, 23]. *Brüggenwirth et al.* recently published a comparative study on dual and single vessel end-ischemic normothermic reperfusion of the rat liver following six hours of cold storage and one hour of subnormothermic reperfusion [32]. They showed similar outcomes for dual and single vessel perfused livers. In our opinion, short end-ischemic reperfusion after prolonged cold storage might be a feasible strategy for organ preservation but not the right option for metabolic reconditioning of rat liver grafts.

The first aim of this work was to develop a dual vessel NEVLP rat model that would maintain near-to-physiological conditions for a perfusion period of six hours. The development of such a model comes with many difficulties. The most serious problem we observed was a severe increase of vascular resistance in the arterial flow area. We attributed this phenomenon to progressive vasospasm in the small arterial vessels of the rat liver and assumed that sufficient vasodilatation would be necessary for successful dual vessel NEVLP. We identified metamizole as a possible agent to accomplish that. *Kaya et al.* have shown that metamizole is able to effectively ameliorate arterial vasospasm of the hepatic artery, when applied topical [22]. We investigated, whether the direct administration of metamizole into the HA could effectively decrease arterial vascular resistance in the liver and ensure sufficient vasodilatation. In many countries, including Germany, metamizole is inexpensive, widely available and therefore often used in animal research and veterinary medicine. It has a low risk of causing acute liver failure and has been shown to have no toxic effects on hepatocytes [33, 34]. Agranulocytosis, which is a known severe adverse effect of metamizole treatment, has led to its ban in several countries. Although we do not propose using metamizole for clinical NEVLP, the risk of myelotoxic effects during leukocyte-free NEVLP should be low. Since metamizole has not been shown to accumulate in the liver and the liver would be flushed before transplantation, the risk of adverse effects after transplantation should also be low.

Our results confirm our previous observation of increasing vascular resistance occurring from three to four hours of perfusion onward. As presumed, the subsequent unphysiologically high arterial pressures resulted in poor perfusion outcome, as parameters of liver and bile duct damage were considerably elevated. Interestingly, the high arterial pressures did not lead to relevant development of edema. We could show, that the application of metamizole into the HA ensured sufficient vasodilatation and kept arterial pressures in the physiological range. This led to better organ preservation as both metamizole groups showed lower markers of liver damage as well as better results in the histopathology of both liver and bile duct tissue. Notably, the application metamizole significantly increased bile production and lowered levels of bile duct damage markers.

The comparison between the two metamizole groups indicated, that the administration of metamizole on demand—as opposed to a static hourly administration—was altogether more beneficial for the organs. Interestingly, the hourly administration of metamizole even led to significantly more sinusoidal dilatation than the pressure dependent administration on demand. This suggests, that metamizole itself does not have an intrinsic positive effect on the liver but develops its beneficial effect through vasodilatation, when vasodilatation is needed.

Furthermore, the on-demand-protocol accomplished more stable perfusion conditions, as results in this group were the most consistent ones between the three dNEVLP groups.

Our results show that dual vessel NEVLP is only beneficial if sufficient vasodilatation is performed during perfusion. We propose Metamizole as one possible agent to accomplish that. However, other vasodilators (e.g. Epoprostenol or Verapamil) might show similar results [35].

The second aim of this work was the evaluation of our newly developed dNEVLP system by comparing it to our well-established sNEVLP system. Our results indicate that dNEVLP leads to lower liver damage and better liver function. Although oxygen uptake did not show a significant difference, histological architecture was better preserved, as necrosis and sinusoidal dilatation in the liver parenchyma were significantly lower. We attribute this not only to the improved perfusion of areas that are supplied only by the HA, but also to a general improvement of the microcirculation of the liver. Histopathology also showed significantly better preservation of the extra hepatic bile duct by dNEVLP compared to sNEVLP. Since the extra hepatic bile duct obtains a great part of its blood supply only from the hepatic artery, these results seem coherent. Chemical markers of bile duct epithelial damage show the same trend, but results did not reach statistical significance. One reason for this is the high standard deviation of the results in the sNEVLP group. Another reason might be, that bile duct damage in the sNEVLP group was more frequently located in the deeper layers of the bile duct than in the epithelium, as histopathology showed. Again, it is important to mention that dNEVLP achieved more stable perfusion conditions, as results were more consistent than in the sNEVLP group.

Our results suggest, that dNEVLP with on demand application of metamizole for vasodilatation leads to superior organ preservation after six hours of perfusion compared to sNEVLP in our miniaturized rat liver perfusion system. Judging from our oxygen consumption analysis, liver function tests, and histological analyses, the organs were well perfused and viable throughout the entire perfusion period. Moreover, all livers in our experiments met the clinical criteria for viability and transplantability as established by *Mergental et al.* (bile production, stable flow rates and homogenous perfusion) [36]. However, these criteria were established for human livers and thus have limited validity in the assessment of rat livers. It remains to be seen, if dually perfused rat livers also perform better after transplantation. This is currently being investigated in our work group.

In conclusion, we here present a dual vessel small animal NEVLP model. We introduce metamizole as a potent agent to mitigate arterial vasospasm, thus allowing for perfusion periods of six hours and more. Furthermore, we present a comparison between single and dual vessel NEVLP in a small animal model. We show, that dNEVLP with sufficient vasodilatation by metamizole application on demand seems to be superior to sNEVLP in terms of organ preservation.

Supporting information

S1 File.
(DOCX)

Acknowledgments

The Authors would like to thank Steffen Lippert, Kirsten Führer and Dietrich Polenz for their instruction and support in the methods.

Author Contributions

Conceptualization: Felix Claussen, Joseph M. G. V. Gassner, Simon Moosburner, Maximilian Nösser, Julian Pohl, Anja Reutzel-Selke, Igor M. Sauer, Nathanael Raschzok.

Data curation: Felix Claussen, Simon Moosburner, David Wyrwal, Maximilian Nösser, Lara Wegener, Julian Pohl, Ruza Arsenic.

Formal analysis: Felix Claussen, Simon Moosburner, David Wyrwal, Anja Reutzel-Selke.

Funding acquisition: Anja Reutzel-Selke, Nathanael Raschzok.

Methodology: Peter Tang, Julian Pohl, Ruza Arsenic.

Project administration: Johann Pratschke, Igor M. Sauer.

Resources: David Wyrwal, Peter Tang, Lara Wegener.

Supervision: Joseph M. G. V. Gassner, Peter Tang, Anja Reutzel-Selke, Johann Pratschke, Igor M. Sauer, Nathanael Raschzok.

Validation: Simon Moosburner, Peter Tang, Anja Reutzel-Selke, Ruza Arsenic, Johann Pratschke.

Visualization: Felix Claussen, Simon Moosburner.

Writing – original draft: Felix Claussen.

Writing – review & editing: Felix Claussen, Joseph M. G. V. Gassner, Johann Pratschke, Igor M. Sauer, Nathanael Raschzok.

References

1. Habka D, Mann D, Landes R, Soto-Gutierrez A. Future Economics of Liver Transplantation: A 20-Year Cost Modeling Forecast and the Prospect of Bioengineering Autologous Liver Grafts. *PLoS one*. 2015; 10(7):e0131764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131764> PMID: 26177505
2. Pezzati D, Ghinolfi D, De Simone P, Balzano E, Filippini F. Strategies to optimize the use of marginal donors in liver transplantation. *World journal of hepatology*. 2015; 7(26):2636–47. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i26.2636> PMID: 26609341
3. Pais R, Barritt AS, Calmus Y, Scatton O, Runge T, Lebray P, et al. NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *Journal of hepatology*. 2016; 65(6):1245–57. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.07.033> PMID: 27486010
4. Vodkin I, Kuo A. Extended Criteria Donors in Liver Transplantation. *Clinics in liver disease*. 2017; 21(2):289–301. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2016.12.004> PMID: 28364814
5. Sass DA, Reich DJ. Liver transplantation in the 21st century: expanding the donor options. *Gastroenterology clinics of North America*. 2011; 40(3):641–58. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2011.06.007> PMID: 21893278
6. Orman ES, Mayorga ME, Wheeler SB, Townsley RM, Toro-Diaz HH, Hayashi PH, et al. Declining liver graft quality threatens the future of liver transplantation in the United States. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2015; 21(8):1040–50.
7. Kim WR, Lake JR, Smith JM. OPTN/SRTR 2016 Annual Data Report: Liver 2016.
8. Moosburner S, Sauer IM, Gassner J, Schleicher C, Bosebeck D, Rahmel A, et al. Macrosteatosis is a huge problem in liver transplantation-however, not the only one we face. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2019.

9. Attia M, Silva MA, Mirza DF. The marginal liver donor—an update. *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2008; 21(8):713–24.
10. McCormack L, Dutkowski P, El-Badry AM, Clavien PA. Liver transplantation using fatty livers: always feasible? *Journal of hepatology*. 2011; 54(5):1055–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.11.004> PMID: 21145846
11. Okaya T, Blanchard J, Schuster R, Kuboki S, Husted T, Caldwell CC, et al. Age-dependent responses to hepatic ischemia/reperfusion injury. *Shock*. 2005; 24(5):421–7. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000181282.14050.11> PMID: 16247327
12. Kollmann D, Selzner M. Recent advances in the field of warm ex-vivo liver perfusion. *Current opinion in organ transplantation*. 2017; 22(6):555–62. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000471> PMID: 28922300
13. Imber CJ, St Peter SD, Lopez de Cenarruzabeitia I, Pigott D, James T, Taylor R, et al. Advantages of normothermic perfusion over cold storage in liver preservation. *Transplantation*. 2002; 73(5):701–9. <https://doi.org/10.1097/00007890-200203150-00008> PMID: 11907414
14. Xu H, Berendsen T, Kim K, Soto-Gutierrez A, Bertheium F, Yarmush ML, et al. Excorporeal normothermic machine perfusion resuscitates pig DCD livers with extended warm ischemia. *The Journal of surgical research*. 2012; 173(2):e83–8. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2011.09.057> PMID: 22099594
15. Schlegel A, Kron P, Graf R, Dutkowski P, Clavien PA. Warm vs. cold perfusion techniques to rescue rodent liver grafts. *Journal of hepatology*. 2014; 61(6):1267–75. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.023> PMID: 25086285
16. Goldaracena N, Echeverri J, Spetzler VN, Kathis JM, Barbas AS, Louis KS, et al. Anti-inflammatory signaling during ex vivo liver perfusion improves the preservation of pig liver grafts before transplantation. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2016; 22(11):1573–83.
17. Goldaracena N, Spetzler VN, Echeverri J, Kathis JM, Cherepanov V, Persson R, et al. Inducing Hepatitis C Virus Resistance After Pig Liver Transplantation—A Proof of Concept of Liver Graft Modification Using Warm Ex Vivo Perfusion. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2017; 17(4):970–8.
18. Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, Heaton N, Mirza D, Perera MT, et al. Liver Transplantation After Ex Vivo Normothermic Machine Preservation: A Phase 1 (First-in-Man) Clinical Trial. *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2016; 16(6):1779–87.
19. Ghinolfi D, Rreka E, De Tata V, Franzini M, Pezzati D, Fierabracci V, et al. Pilot, Open, Randomized, Prospective Trial for Normothermic Machine Perfusion Evaluation in Liver Transplantation From Older Donors. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2019; 25(3):436–49.
20. Selzner M, Goldaracena N, Echeverri J, Kathis JM, Linares I, Selzner N, et al. Normothermic ex vivo liver perfusion using steen solution as perfusate for human liver transplantation: First North American results. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2016; 22(11):1501–8.
21. Jasiacka A, Maslanka T, Jaroszewski JJ. Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish journal of veterinary sciences*. 2014; 17(1):207–14. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0030> PMID: 24724493
22. Kaya B, Elcin Isilgan S, Serel S, Ergun H. Metamizole: an effective solution for vasospasm. *Journal of plastic surgery and hand surgery*. 2016; 50(3):151–5. <https://doi.org/10.3109/2000656X.2015.1137924> PMID: 26854097
23. Gassner J, Nosser M, Moosburner S, Horner R, Tang P, Wegener L, et al. Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2019; 25(2):275–87.
24. Tolboom H, Pouw R, Uygun K, Tanimura Y, Izamis ML, Berthiaume F, et al. A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue engineering*. 2007; 13(8):2143–51. <https://doi.org/10.1089/ten.2007.0101> PMID: 17596120
25. Sahin S, Rowland M. Estimation of aqueous distributional spaces in the dual perfused rat liver. *The Journal of physiology*. 2000; 528 Pt 1:199–207.
26. Sliker JC, Farid WR, van Eijck CH, Lange JF, van Bommel J, Metselaer HJ, et al. Significant contribution of the portal vein to blood flow through the common bile duct. *Annals of surgery*. 2012; 255(3):523–7. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e31824714d0> PMID: 22323010
27. Noack K, Bronk SF, Kato A, Gores GJ. The greater vulnerability of bile duct cells to reoxygenation injury than to anoxia. Implications for the pathogenesis of biliary strictures after liver transplantation. *Transplantation*. 1993; 56(3):495–500. <https://doi.org/10.1097/00007890-199309000-00001> PMID: 8212138

28. Mora N, Kaptanoglu L, Zhang Z, Niekrasz M, Black S, Ver Steeg K, et al. Single vs Dual Vessel Porcine Extracorporeal Liver Perfusion. *Journal of Surgical Research*. 2002; 103(2):228–35. <https://doi.org/10.1006/jsre.2002.6366> PMID: [11922739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11922739/)
29. Op den Dries S, Karimian N, Westerkamp AC, Sutton ME, Kuipers M, Wiersema-Buist J, et al. Normothermic machine perfusion reduces bile duct injury and improves biliary epithelial function in rat donor livers. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2016; 22(7):994–1005.
30. t Hart NA, van der Plaats A, Moers C, Leuvenink HG, Wiersema-Buist J, Verkerke GJ, et al. Development of the isolated dual perfused rat liver model as an improved reperfusion model for transplantation research. *The International journal of artificial organs*. 2006; 30(2):219–27.
31. Nossler M, Gassner J, Moosburner S, Wyrwal D, Claussen F, Hillebrandt KH, et al. Development of a Rat Liver Machine Perfusion System for Normothermic and Subnormothermic Conditions. *Tissue engineering Part A*. 2020; 26(1–2):57–65. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2019.0152> PMID: [31364485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31364485/)
32. Bruggenwirth IMA, Moore C, Mahboub P, Thijssen MF, E X, Leuvenink HGD, et al. A Comparative Study of Single and Dual Perfusion During End-ischemic Subnormothermic Liver Machine Preservation. *Transplantation direct*. 2018; 4(11):e400. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000840> PMID: [30534591](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30534591/)
33. Sabate M, Ibanez L, Perez E, Vidal X, Buti M, Xiol X, et al. Risk of acute liver injury associated with the use of drugs: a multicentre population survey. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007; 25(12):1401–9.
34. Krisai P, Rudin D, Grunig D, Scherer K, Pichler W, Terracciano L, et al. Acute Liver Failure in a Patient Treated With Metamizole. *Frontiers in pharmacology*. 2019; 10:996. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00996> PMID: [31572180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31572180/)
35. Echeverri J, Goldaracena N, Kathis JM, Linares I, Roizales R, Kollmann D, et al. Comparison of BQ123, Epoprostenol, and Verapamil as Vasodilators During Normothermic Ex Vivo Liver Machine Perfusion. *Transplantation*. 2018; 102(4):601–8. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002021> PMID: [29189484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29189484/)
36. Mergental H, Stephenson BTF, Laing RW, Kirkham AJ, Neil DAH, Wallace LL, et al. Development of Clinical Criteria for Functional Assessment to Predict Primary Nonfunction of High-Risk Livers Using Normothermic Machine Perfusion. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2018; 24(10):1453–69.

13. Originaldaten

	Dual Vessel Metamizole On demand	Dual Vessel Metamizole Hourly Infusion	Dual Vessel w/o Metamizole	Single Vessel	p-Value
Rat Weight [g]	329 (37)	335 (11.5)	329.5 (13.5)	318 (47.75)	0.47
Liver Weight [g]	15.1 (1.33)	17.35 (2.75)	15.65 (1.2)	14.8 (7.2)	0.34
Cold Ischemic Time [min]	52.5 (14)	55 (3.75)	50 (10)	55 (10)	0.28
Macroscopic Flush	10 (0.75)	10 (0.75)	9.5 (1)	10 (1)	0.48
ALT [U/l]					
T0	30 (14.75)	39 (17.75)	39 (15)	77 (84.25)	0.04
T3	88 (31.5)	129.5 (69)	110 (37.25)	123.5 (210.5)	0.07
T6	193 (108.25)	343.5 (343.25)	372 (382)	335.5 (485.5)	0.22
AST [U/l]					
T0	53 (34.5)	70.5 (42)	77.5 (27.25)	121 (121.25)	0.31
T3	196 (96.25)	274.5 (232.25)	310 (73.75)	314 (306.25)	0.16
T6	459 (176.25)	833.5 (754.25)	927 (682)	705 (1253.75)	0.07
Urea [mmol/l]					
T0	9 (6.5)	11.5 (5.25)	11.5 (9.25)	12 (10.25)	0.87
T3	36 (5.25)	28.5 (9.75)	26.5 (13)	33.5 (20.5)	0.26
T6	44 (5)	40 (8.75)	37.5 (45.25)	39 (24.75)	0.74
Glucose [mg/dl]					
T0	320 (65.75)	319 (146.5)	351.5 (113.25)	338 (225.75)	0.81
T3	250 (98.5)	296 (86.5)	242 (101.5)	215 (141.5)	0.31
T6	256 (107.5)	326 (58.5)	230.5 (123.75)	218 (137.5)	0.19
Sodium [mmol/l]					
T0	136 (4.25)	135.5 (3.25)	136.5 (4.75)	134 (3.75)	0.75
T3	135 (5.5)	136 (7)	132.5 (1.75)	131.5 (1.75)	0.04
T6	137 (5.75)	139.5 (10.5)	132 (2.25)	131.5 (4)	0.01
Potassium [mmol/l]					
T0	4.9 (1.25)	4.95 (1.4)	5.35 (2.85)	5 (1.33)	0.93
T3	3.9 (0.48)	3.95 (0.33)	4 (0.8)	3.75 (0.8)	0.77
T6	4.6 (0.35)	4.6 (0.3)	4.55 (0.58)	4.25 (1)	0.52
Lactate [mg/dl]					
T0	27 (7.25)	35 (3.75)	31.5 (7)	28.5 (30)	0.67
T3	14.5 (7)	10 (8.5)	15 (5)	13.5 (7.75)	0.43
T6	7.5 (8.5)	8 (5)	12.5 (6.25)	14 (7)	0.07
Bile Production [mg]					
T1	672.5 (272)	583.5 (152.5)	628.5 (73.75)	433.5 (281.75)	0.4
T2	541.5 (179.5)	1021 (312.5)	605 (175)	498.5 (302.75)	0.02
T3	878.5 (682.75)	1084.5 (119.5)	586.5 (179.25)	458 (106.5)	0.02
T4	803 (547.5)	893.5 (219.5)	501 (135.25)	385 (130.75)	0.006
T5	766 (239.75)	763 (230.5)	400 (137)	332 (67.75)	0.008
T6	773 (194.75)	714 (277.75)	362.5 (121.75)	272 (32.75)	0.006
pH					
T0	7.47 (0.13)	7.5 (0.09)	7.44 (0.12)	7.4 (0.13)	0.22
T3	7.19 (0.15)	7.2 (0.17)	7.22 (0.11)	7.3 (0.23)	0.66
T6	7.1 (0.1)	7.15 (0.16)	7.18 (0.21)	7.23 (0.31)	0.22
Oxygen Consumption [ml/min/g]					
T0	0.03 (0.02)	0.03 (0.02)	0.04 (0.01)	0.02 (0.02)	0.68
T3	0.04 (0)	0.04 (0)	0.05 (0)	0.04 (0.04)	0.19
T6	0.03 (0.01)	0.05 (0.02)	0.04 (0)	0.03 (0.02)	0.91
Portal Venous Pressure [mmHg]					
T0	5.55 (2.25)	6.55 (2.8)	4.45 (0.85)	5.2 (3.85)	0.26
T1	4.4 (2.68)	3.95 (2.8)	4.45 (0.63)	4.05 (1.68)	0.83
T2	4.95 (2.65)	4.05 (3.1)	4.7 (0.75)	4.35 (1.43)	0.74
T3	4.8 (2.6)	4.3 (2.73)	5.6 (0.75)	4.6 (1.65)	0.63
T4	4.85 (2.78)	4.45 (2.73)	5.55 (0.68)	5.15 (1.65)	0.64
T5	4.3 (3.18)	4.7 (2.98)	5.45 (0.83)	5.25 (1.9)	0.71
T6	4.65 (2.9)	4.8 (3.3)	5.2 (1.38)	5.45 (1.68)	0.87

Arterial Pressure [mmHg]					
T0	48.5 (9)	49.5 (18.5)	45 (18.75)	-	0.67
T1	43 (21.5)	49 (23)	48 (34.75)	-	0.54
T2	69.5 (54.5)	554 (29.5)	73 (18.5)	-	0.78
T3	90.5 (4.75)	71.5 (22.5)	140 (21.5)	-	0.007
T4	96.5 (25.75)	83.5 (9.75)	152 (26.75)	-	0.01
T5	91 (40.75)	87.5 (22.5)	160.5 (49.25)	-	0.02
T6	87.5 (29.25)	85 (26.25)	169.5 (24.75)	-	0.03

	Dual Vessel Metamizole On demand	Dual Vessel Metamizole Hourly Infusion	Dual Vessel w/o Metamizole	p-Value	Post hoc Test
Rat Weight [g]	329 (37)	335 (11.5)	329.5 (13.5)	0.58	
Liver Weight [g]	15.1 (1.33)	17.35 (2.75)	15.65 (1.2)	0.15	
Cold Ischemic Time [min]	52.5 (14)	55 (3.75)	50 (10)	0.17	
Macroscopic Flush	10 (0.75)	10 (0.75)	9.5 (1)	0.58	
ALT [U/l]					
T0	30 (14.75)	39 (17.75)	39 (15)	0.04	1 vs. 3 (p = 0.048)
T3	88 (31.5)	129.5 (69)	110 (37.25)	0.09	
T6	193 (108.25)	343.5 (343.25)	372 (382)	0.17	
AST [U/l]					
T0	53 (34.5)	70.5 (42)	77.5 (27.25)	0.39	
T3	196 (96.25)	274.5 (232.25)	310 (73.75)	0.16	
T6	459 (176.25)	833.5 (754.25)	927 (682)	0.07	
Urea [mmol/l]					
T0	9 (6.5)	11.5 (5.25)	11.5 (9.25)	0.79	
T3	36 (5.25)	28.5 (9.75)	26.5 (13)	0.1	
T6	44 (5)	40 (8.75)	37.5 (45.25)	0.32	
Glucose [mg/dl]					
T0	320 (65.75)	319 (146.5)	351.5 (113.25)	0.55	
T3	250 (98.5)	296 (86.5)	242 (101.5)	0.31	
T6	256 (107.5)	326 (58.5)	230.5 (123.75)	0.17	
Sodium [mmol/l]					
T0	136 (4.25)	135.5 (3.25)	136.5 (4.75)	0.79	
T3	135 (5.5)	136 (7)	132.5 (1.75)	0.11	
T6	137 (5.75)	139.5 (10.5)	132 (2.25)	0.02	2 vs. 3 (0.04)
Potassium [mmol/l]					
T0	4.9 (1.25)	4.95 (1.4)	5.35 (2.85)	0.81	
T3	3.9 (0.48)	3.95 (0.33)	4 (0.8)	0.9	
T6	4.6 (0.35)	4.6 (0.3)	4.55 (0.58)	0.86	
Lactate [mg/dl]					
T0	27 (7.25)	35 (3.75)	31.5 (7)	0.25	
T3	14.5 (7)	10 (8.5)	15 (5)	0.3	
T6	7.5 (8.5)	8 (5)	12.5 (6.25)	0.14	
Bile Production [mg]					
T1	672.5 (272)	583.5 (152.5)	628.5 (73.75)	0.58	
T2	541.5 (179.5)	1021 (312.5)	605 (175)	0.02	1 vs. 2 (0.02)
T3	878.5 (682.75)	1084.5 (119.5)	586.5 (179.25)	0.06	
T4	803 (547.5)	893.5 (219.5)	501 (135.25)	0.02	2 vs. 3 (0.04)
T5	766 (239.75)	763 (230.5)	400 (137)	0.02	1 vs. 3 (0.04)
T6	773 (194.75)	714 (277.75)	362.5 (121.75)	0.02	1 vs. 3 (0.03)
pH					
T0	7.47 (0.13)	7.5 (0.09)	7.44 (0.12)	0.23	
T3	7.19 (0.15)	7.2 (0.17)	7.22 (0.11)	0.78	
T6	7.1 (0.1)	7.15 (0.16)	7.18 (0.21)	0.14	
Portal Venous Pressure [mmHg]					
T0	5.55 (2.25)	6.55 (2.8)	4.45 (0.85)	0.09	
T1	4.4 (2.68)	3.95 (2.8)	4.45 (0.63)	0.78	
T2	4.95 (2.65)	4.05 (3.1)	4.7 (0.75)	0.69	
T3	4.8 (2.6)	4.3 (2.73)	5.6 (0.75)	0.49	
T4	4.85 (2.78)	4.45 (2.73)	5.55 (0.68)	0.6	
T5	4.3 (3.18)	4.7 (2.98)	5.45 (0.83)	0.51	
T6	4.65 (2.9)	4.8 (3.3)	5.2 (1.38)	0.76	

Arterial Pressure [mmHg]					
T0	48.5 (9)	49.5 (18.5)	45 (18.75)	0.67	
T1	43 (21.5)	49 (23)	48 (34.75)	0.54	
T2	69.5 (54.5)	54 (29.5)	73 (18.5)	0.78	
T3	90.5 (4.75)	71.5 (22.5)	140 (21.5)	0.007	2 vs. 3 (p = 0.005)
T4	96.5 (25.75)	83.5 (9.75)	152 (26.75)	0.01	2 vs. 3 (p = 0.01)
T5	91 (40.75)	87.5 (22.5)	160.5 (49.25)	0.02	2 vs. 3 (p = 0.03)
T6	87.5 (29.25)	85 (26.25)	169.5 (24.75)	0.03	-

	Dual Vessel Metamizole On demand	Single Vessel	p-Value
Rat Weight [g]	329 (37)	318 (47.75)	0.69
Liver Weight [g]	15.1 (1.33)	14.8 (7.2)	1.0
Cold Ischemic Time [min]	52.5 (14)	55 (10)	0.49
Macroscopic Flush	10 (0.75)	10 (1)	0.69
ALT [U/l]			
T0	30 (14.75)	77 (84.25)	0.06
T3	88 (31.5)	123.5 (210.5)	0.03
T6	193 (108.25)	335.5 (485.5)	0.11
AST [U/l]			
T0	53 (34.5)	121 (121.25)	0.11
T3	196 (96.25)	314 (306.25)	0.06
T6	459 (176.25)	705 (1253.75)	0.03
Urea [mmol/l]			
T0	9 (6.5)	12 (10.25)	0.49
T3	36 (5.25)	33.5 (20.5)	0.89
T6	44 (5)	39 (24.75)	0.89
Glucose [mg/dl]			
T0	320 (65.75)	338 (225.75)	0.89
T3	250 (98.5)	215 (141.5)	0.49
T6	256 (107.5)	218 (137.5)	0.69
Sodium [mmol/l]			
T0	136 (4.25)	134 (3.75)	0.34
T3	135 (5.5)	131.5 (1.75)	0.11
T6	137 (5.75)	131.5 (4)	0.03
Potassium [mmol/l]			
T0	4.9 (1.25)	5 (1.33)	0.89
T3	3.9 (0.48)	3.75 (0.8)	0.69
T6	4.6 (0.35)	4.25 (1)	0.34
Lactate [mg/dl]			
T0	27 (7.25)	28.5 (30)	1.0
T3	14.5 (7)	13.5 (7.75)	0.69
T6	7.5 (8.5)	14 (7)	0.11
Bile Production [mg]			
T1	672.5 (272)	433.5 (281.75)	0.2
T2	541.5 (179.5)	498.5 (302.75)	0.29
T3	878.5 (682.75)	458 (106.5)	0.11
T4	803 (547.5)	385 (130.75)	0.03
T5	766 (239.75)	332 (67.75)	0.03
T6	773 (194.75)	272 (32.75)	0.03
pH			
T0	7.47 (0.13)	7.4 (0.13)	0.2
T3	7.19 (0.15)	7.3 (0.23)	0.49
T6	7.1 (0.1)	7.23 (0.31)	0.2
Portal Venous Pressure [mmHg]			
T0	5.55 (2.25)	5.2 (3.85)	0.89
T1	4.4 (2.68)	4.05 (1.68)	1.0
T2	4.95 (2.65)	4.35 (1.43)	0.69
T3	4.8 (2.6)	4.6 (1.65)	0.69
T4	4.85 (2.78)	5.15 (1.65)	0.69
T5	4.3 (3.18)	5.25 (1.9)	0.49
T6	4.65 (2.9)	5.45 (1.68)	0.69

	Dual Vessel Metamizole On demand	Dual Vessel w/o Metamizole	Single Vessel	Dual Vessel Metamizole Hourly Infusion	p-Value
LDH					
T1	33.45 (10.53)	21.85 (22.18)	45.85 (88.5)	27.5 (14.4)	0.11
T2	31.65 (18.33)	25.85 (19.3)	40.75 (68.65)	53.5 (40.08)	0.05
T3	80.6 (60.28)	63 (27.6)	63.3 (84.15)	66.35 (54.6)	0.88
T4	87.35 (122.8)	116 (43.5)	94.9 (141.5)	76.85 (72.23)	0.76
T5	127.5 (113.5)	242.65 (82.63)	203.35 (479.5)	85.8 (84.53)	0.08
T6	148.6 (93.63)	420.95 (202.55)	234.9 (76-470.3)	96.25 (96.75)	0.05
yGT					
T1	910.4 (492.47)	965.95 (741.4)	897.3 (477.55)	816.8 (167.6)	0.73
T2	544.05 (168.97)	724.3 (236.92)	578.45 (605.72)	151.6 (77.8)	0.03
T3	518.45 (665.15)	1286.4 (704.05)	978.4 (821.15)	321 (290.25)	0.03
T4	722.7 (975.33)	1534.5 (1498.65)	1402.6 (877.05)	518.4 (641.55)	0.06
T5	1005.25 (992.9)	1983.1 (3848.2)	2030.6 (2384.15)	10349.01 (612.6)	0.07
T6	1117.15 (2325.98)	2982 (3042.2)	2392.7 (2280.45)	887.7 (491.5)	0.04
Necrosis	0	2 (3.5)	2.25 (4.63)	1 (5.75)	0.36
Sinusoidal Dilat.	10 (0)	15 (32.5)	30 (30)	20 (20)	0.05
TUNEL+	0.03 (0.07)	0.26 (0.44)	0.22 (0.55)	0.11 (0.71)	0.07

	Dual Vessel Metamizole On demand	Single Vessel	p-Value
LDH			
T1	33.45 (10.53)	45.85 (88.5)	0.11
T2	31.65 (18.33)	40.75 (68.65)	0.34
T3	80.6 (60.28)	63.3 (84.15)	1
T4	87.35 (122.8)	94.9 (141.5)	0.69
T5	127.5 (113.5)	203.35 (479.5)	0.34
T6	148.6 (93.63)	234.9 (76-470.3)	0.4
yGT			
T1	910.4 (492.47)	897.3 (477.55)	0.89
T2	544.05 (168.97)	578.45 (605.72)	1.0
T3	518.45 (665.15)	978.4 (821.15)	0.34
T4	722.7 (975.33)	1402.6 (877.05)	0.34
T5	1005.25 (992.9)	2030.6 (2384.15)	0.2
T6	1117.15 (2325.98)	2392.7 (2280.45)	0.2
Necrosis	0	2.25 (4.63)	0.02
Sinusoidal Dilat.	11 (3.75)	30 (30)	< 0.001
TUNEL+	0.03 (0.07)	0.22 (0.55)	0.03

	Dual Vessel Metamizole On demand	Dual Vessel w/o Metamizole	Dual Vessel Metamizole Hourly Infusion	p-Value	Post hoc Test
LDH					
T1	33.45 (10.53)	21.85 (22.18)	27.5 (14.4)	0.33	
T2	31.65 (18.33)	25.85 (19.3)	53.5 (40.08)	0.02	
T3	80.6 (60.28)	63 (27.6)	66.35 (54.6)	0.60	
T4	87.35 (122.8)	116 (43.5)	76.85 (72.23)	0.58	
T5	127.5 (113.5)	242.65 (82.63)	85.8 (84.53)	0.04	2 vs. 3 p < 0.001 1 vs. 2 p = 0.002
T6	148.6 (93.63)	420.95 (202.55)	96.25 (96.75)	0.02	2 vs. 3 p < 0.001 1 vs. 2 p < 0.001
yGT					
T1	910.4 (492.47)	965.95 (741.4)	816.8 (167.6)	0.5	
T2	544.05 (168.97)	724.3 (236.92)	151.6 (77.8)	0.01	2 vs. 3 p = 0.01
T3	518.45 (665.15)	1286.4 (704.05)	321 (290.25)	0.04	2 vs. 3 p = 0.05
T4	722.7 (975.33)	1534.5 (1498.65)	518.4 (641.55)	0.04	2 vs. 3 p = 0.03
T5	1005.25 (992.9)	1983.1 (3848.2)	1034.90 (612.6)	0.08	
T6	1117.15 (2325.98)	2982 (3042.2)	887.7 (491.5)	0.049	2 vs. 3 p = 0.04
Necrosis	0	2 (3.5)	1 (5.75)	0.09	-
Sinusoidal Dilat.	10 (0)	15 (32.5)	20 (20)	0.01	1 vs. 3 p = 0.01
TUNEL+	0.03 (0.07)	0.26 (0.44)	0.11 (0.71)	0.06	

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen
Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

15. Publikationsliste

Publikation	Impactfaktor
1. <i>Dual versus single vessel normothermic ex vivo perfusion of rat liver grafts using metamizole for vasodilatation.</i> Claussen F, Gassner JMGV, Moosburner S, Wyrwal D, Nösser M, Tang P, Wegener L, Pohl J, Reutzel-Selke A, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N.. PLoS One. 2020 Jul 2;15(7): e0235635	2,776*
2. <i>Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine.</i> Gassner JMGV, Nösser M, Moosburner S, Horner R, Tang P, Wegener L, Wyrwal D, Claussen F, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Liver Transpl. 2019 Feb;25(2):275-287	4,604*
3. <i>Development of a Rat Liver Machine Perfusion System for Normothermic and Subnormothermic Conditions.</i> Nösser M, Gassner JMGV, Moosburner S, Wyrwal D, Claussen F, Hillebrandt KH, Horner R, Tang P, Reutzel-Selke A, Polenz D, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part A. 2020 Jan;26(1-2):57-65	3.776*
4. <i>Prevalence of Steatosis Hepatis in the Eurotransplant Region: Impact on Graft Acceptance Rates.</i> Moosburner S, Gassner JMGV, Nösser M, Pohl J, Wyrwal D, Claussen F, Ritschl PV, Dragun D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. HPB Surg. 2018 Nov 1;2018:6094936	2,869*

* Impactfaktor zum Zeitpunkt der Akzeptanz

16. Danksagung

Ich danke PD Dr. Nathanael Raschzok und Prof. Dr. Igor Sauer für die Möglichkeit der Bearbeitung des Promotionsthemas. Ich danke PD Dr. Nathanael Raschzok für die konstante Unterstützung und gewissenhafte Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Ich danke Joseph Gassner und Peter Tang für die unermüdliche Anleitung und Hilfestellung im Labor. Auch David Wyrwal und Maximilian Nösser möchte ich danken, deren Gesellschaft die langen Labortage sehr viel freudvoller gemacht hat.

Ich danke dem gesamten Team der Experimentellen Chirurgie für die ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung, ohne die ich das alles nicht zustande gebracht hätte.

Zu guter Letzt danke ich Jane Vormbäumen für ihre Zuversicht, ihre Unterstützung und ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und meine Arbeit.