

III MATERIAL UND METHODEN

Die Studie wurde nach Genehmigung durch die zuständige Behörde (Sen Ges Soz AZ SCHO 408/4-1) in den tierexperimentellen Einrichtungen des Rudolf Virchow Klinikums der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin, durchgeführt.

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 24 weibliche Schweine der „Deutschen Landrasse“ aus einer ortsansässigen Schlachtschweinezucht. Das Körpergewicht (KG) der zweieinhalb bis vier Monate alten Tiere lag zwischen 25 und 35 Kilogramm.

Sie wurden in der Woche vor Versuchsbeginn hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes tierärztlich beurteilt und zunächst alle gemeinsam in einem Auslauf mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser untergebracht. 24 Stunden vor Beginn des Experiments wurden jeweils zwei Schweine von den anderen getrennt und bis zum Versuchsbeginn nüchtern gehalten. Wasser stand den Tieren weiterhin ad libitum zur Verfügung.

3.2 Versuchsgruppen

Jeweils 12 der Tiere wurden prospektiv randomisiert der Spender- bzw. Empfängergruppe zugeordnet. Abhängig von der Ischämieform und –zeit der Spenderlebern erfolgte eine weitere Unterteilung der Empfängergruppe zu je gleichen Teilen (2x n = 6). Wurde die Leber vor der Transplantation lediglich einer vierstündigen kalten Ischämie unterzogen (Konservierung in UW-Lösung bei 0°C), gehörten die Tiere der Versuchsgruppe „Empfänger A“ an. Ging der kalten Ischämie zusätzlich eine einstündige warme Ischämie voraus, bei der das Organ im abgedeckten, körperwarmen Abdomen des Spenders verblieb, wurden die Schweine der Gruppe „Empfänger B“ zugeteilt.

3.3 Anästhesie

Noch im Stall erhielten die Tiere zur Prämedikation eine intramuskuläre Injektion von 4 mg/kgKG Azaperon (Stresnil^R, Janssen GmbH, Neuss) und 0,5 mg Atropinsulfat (Atropinsulfat Braun^R, Braun Melsungen AG, Melsungen) in die Nackenmuskulatur. 15 bis 20 Minuten später wurden die inzwischen ausreichend sedierten Schweine auf den Operationstisch getragen und in den Einleitungsraum des Operationstraktes gebracht. Dort erfolgte die Kanülierung beider Ohrvenen mit je einer Braunüle (18 G Vasofix Braunüle, Braun Melsungen AG, Melsungen), über die zur Narkoseeinleitung 4 mg/kgKG Metomidathydrochlorid (Hypnodil^R, Janssen GmbH, Neuss) und je nach Gewicht des Tieres 0,1 bis 0,2 mg Fentanyl (Fentanyl^R, Janssen GmbH, Neuss) als Bolus verabreicht wurden.

Nach Fixation in Rückenlage auf dem mit einer Wärmematte ausgestatteten Operationstisch konnte den schlafenden, spontan atmenden Tieren Hals und Bauch rasiert und gereinigt werden. Für die Elektrokardiographie wurden die drei bipolaren Extremitätenableitungen nach EINTHOVEN verwendet und zur Sicherstellung freier Atemwege erfolgte eine endotracheale Intubation (Hi-Contour™ Trachealtubus, ID 8,0 mm, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland).

Die Narkose wurde durch kontinuierliche intravenöse Infusion von Metomidathydrochlorid (Hypnodil[®], Janssen GmbH, Neuss) und Fentanyl (Fentanyl[®], Janssen GmbH, Neuss) aufrechterhalten (0,1 mg/kgKG/min Metomidate und 0,15 µg/kgKG/min Fentanyl). Zur Relaxation erfolgten bei Bedarf zusätzlich Repetitionsgaben von 1 bis 4 mg Pancuroniumbromid (Pancuronium Curamed[®], Schwabe-Curamed, Karlsruhe).

Mit Hilfe eines Respirators (Servo 900C Siemens Elema, Solna, Schweden) wurden die Tiere über den gesamten Untersuchungszeitraum volumenkontrolliert beatmet. Dabei betrug die kontinuierlich überwachte inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO₂) 1,0 und es wurde Normokapnie (CO₂-Partialdruck im arteriellen Blut: 36 bis 40 mmHg) angestrebt. Diese konnte durch regelmäßige Kontrollen der arteriellen Blutgase (ABL 3 Autoanalyzer, Radiometer, Kopenhagen, DK) sowie durch eine permanente Registrierung des endexpiratorischen Kohlendioxidpartialdrucks (HP CMS-Patientenmonitor Modell 66 S, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen) sichergestellt werden. Die Atemfrequenz lag bei 8 bis 10 Atemzügen/min und das Atemminutenvolumen je nach Gewicht des Schweines und den Ergebnissen der Blutgasanalysen zwischen 3,2 und 4 Litern.

Zur Aufrechterhaltung einer Normovolämie erhielten die Tiere als Flüssigkeitsersatz auf 38°C erwärmtes Jonosteril (Jonosteril[®], Fresenius, Bad Homburg) und Hydroxyethylstärke (HAES-steril[®] 10%, Fresenius, Bad Homburg) intravenös infundiert. Die Dosierung richtete sich nach den Messwerten des zentralvenösen sowie des systemischen arteriellen Druckes, die durch die Flüssigkeitssubstitution annähernd konstant gehalten werden sollten.

3.4 Präparation

3.4.1 Katheterisierung

Das kontinuierliche EKG-Monitoring sollte um invasive Methoden zur Messung hämodynamischer Parameter ergänzt werden. Hierfür wurde in Narkose perkutan ein arterieller Katheter (Laeder cath 20G, Vygon, Ecoen, Frankreich) in die linke Arteria carotis communis (zur Messung des arteriellen Blutdrucks und zur Blutentnahme) sowie ein Swan-Ganz-Katheter (Modell 93A-431-7.5 F, Baxter, Irvine, USA) über die linke Vena jugularis externa (zur Messung des zentralen Venendruckes, des Herzzeitvolumens, des Druckes in der Pulmonalarterie und des pulmonalkapillären Verschlussdrucks sowie zur Blutentnahme aus der Pulmonalarterie) eingebracht.

3.4.2 Laparotomie der Spender

Nach medianer Laparotomie wurde für entsprechende Blutentnahmen zunächst eine Sonde (16G Cavafix-Certo, Braun Melsungen AG, Melsungen) über die rechte Vena jugularis interna und Vena cava unter palpatorischer Positionskontrolle in einen Ast der Vv. hepaticae eingeführt. Die Kanülierung der Vena portae erfolgte nach Punktion der Vena gastroduodenalis durch intravasales Vorschieben eines Katheters (16G Cavafix-Certo, Braun Melsungen AG, Melsungen).

Durch perivaskuläre Platzierung jeweils einer Doppler-Mikrosonde um die Arteria hepatica (S-Series 6SS, Durchmesser 6mm, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) und um die Vena portae (A-Series TN16, Durchmesser 12 mm, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) wurden die Gefäße zur Bestimmung ihrer Blutflüsse vorbereitet.

Im Anschluss an das Versuchsprotokoll (s.u.) fand die Explantation der Leber statt. Dabei entsprach das chirurgische Vorgehen im Wesentlichen dem von Sir Roy Calne entwickelten Verfahren zur orthotopen Lebertransplantation (OLT) beim Schwein (Calne et al. 1967, Calne 1987). Vor dem Abklemmen der Gefäße zur Entnahme des Organs wurden die Tiere mit 500 IE Heparin (Liquemin^R, Roche, Grenzach)/kgKG intravenös antikoaguliert.

Unter Fortführung der Narkose erfolgte anschließend die Tötung des Spendertieres durch Entblutung über die Katheter in der Arteria carotis communis und der Vena jugularis externa. Das Blut wurde steril aufbewahrt, um, falls nötig, zur Transfusion für den Empfänger zur Verfügung zu stehen.

3.4.3 Leberischämie

Je nach Empfängergruppe folgten der Entblutung zunächst eine einstündige warme und anschließend eine vierstündige kalte Ischämie der Leber (Empfänger B), oder das Organ wurde sofort einer vierstündigen kalten Ischämie unterzogen (Empfänger A).

Im Falle der **warmen Ischämie** verblieb die Leber vor der endgültigen Explantation im mit Klemmen verschlossenen und mit sterilen Tüchern abgedeckten Bauch des Spendertieres. Mit Hilfe einer Wärmematte wurde die Körperkerntemperatur bei über 35°C gehalten.

Für die **kalte Ischämie** wurde die Leber mithilfe von sterilen Plastikkanülen via Arteria hepatica und Vena portae mit UW-Lösung perfundiert, in eine sterile, mit UW-Lösung gefüllte Plastiktüte verbracht und nachfolgend einer vierstündigen Konservierung bei 0°C (Eisbad !) unterzogen.

3.4.4 Laparotomie der Empfänger

Auch die Präparation der Empfängertiere richtete sich überwiegend nach dem von Sir Roy Calne entwickelten Vorgehen zur orthotopen Lebertransplantation beim Schwein (Calne et al. 1967, Calne 1987).

Nach der Explantation der tiereigenen Leber wurde das bis zu diesem Zeitpunkt kalt ischämische Spenderorgan transplantiert. Der End-zu-End Anastomosierung der suprahepatischen Vena cava inferior und der Vena portae folgte zunächst ein Flushen mit etwa 100 ml Vollblut der Spender und dann die Reperfusion der Leber. Anschließend wurden nacheinander die infrahepatische Vena cava inferior, die Arteria hepatica und der Ductus choledochus jeweils End-zu-End anastomosiert.

Die anhepatische Phase der Empfänger dauerte ca. 30 bis 45 Minuten, die transplantierten Organe blieben insgesamt vier (Empfänger A) bzw. fünf (Empfänger B) Stunden plus 30 bis 45 Minuten ischämisch.

Die Instrumentierung der Empfängertiere für die nachfolgenden Messungen entsprach der der Spender.

3.5 Postoperative Versorgung der Empfänger

Blieben die Tiere nach der Extubation hämodynamisch und respiratorisch stabil, wurde die Intensivüberwachung 12 Stunden nach Ende der Operation abgeschlossen und die Schweine zurück in den Stall gebracht. Anderenfalls wurde die Intensivüberwachung bis zum Erreichen dieser Stabilität fortgeführt. 24 Stunden nach Ende der Operation erhielten die Tiere wieder Wasser und Futter ad libitum. Zudem wurden Medikamente zur Infektionsprophylaxe, Säurehemmung und Immunsuppression verabreicht.

Bei Überleben erfolgte am 14. postoperativen Tag die Euthanasie mit Thiopental (Trapanal^R, Byk Gulden, Konstanz).

3.6 Messmethoden

3.6.1 Hämodynamische Messungen

Die Herzfrequenz wurde anhand des Elektrokardiogramms ermittelt, die Bestimmung und Aufzeichnung des zentralen Venendrucks, des mittleren arteriellen Blutdrucks, des mittleren pulmonalarteriellen Drucks sowie des pulmonalkapillären Verschlussdrucks erfolgte mit Hilfe von Druckwandlern und einem Monitoringsystem (HP CMS-Patientenmonitor Modell 66 S, Hewlett-Packard GmbH, Böblingen). Das Herzzeitvolumen wurde mittels der standardisierten Thermodilutionstechnik mit einem geschlossenen Injektatsystem (Baxter) gemessen und als Mittelwert aus vier Messungen mit jeweils 10 ml kalter (1-5°C) physiologischer Kochsalzlösung errechnet.

Die Blutflüsse in der Arteria hepatica und der Vena portae wurden mit Hilfe der Doppler-Flowmetrie (Dual Channel Model T206, Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) ermittelt. Die hepatische Gesamtdurchblutung ergab sich aus der Summe dieser beiden Flüsse.

3.6.2 Bestimmung der Parameter der Sauerstoffversorgung

Arterielle, gemischt-, portal- und lebervenöse Blutproben wurden unter Luftabschluss entnommen, eisgekühlt und unter Verwendung eines herkömmlichen Gerätes zur Blutgasanalyse (ABL 3 Autoanalyzer, Radiometer, Kopenhagen, DK) untersucht. Die Analyse der Blutproben mit einem versuchstierspezifischen Photospektrometer (OSM 3 Hemoximeter, Radiometer, Kopenhagen, DK) diente ferner der Bestimmung von Hämoglobingehalt und arterieller, gemischt-, portal- sowie lebervenöser Sauerstoffsättigung.

Aus den Messwerten wurden nach den im Anhang angegebenen Formeln folgende Parameter berechnet:

- Sauerstoffgehalt: arteriell, gemischtvenös, kapillär, Vena portae, Vena hepatica
- Sauerstoffangebot: total systemisch, Leber gesamt, Vena portae, Arteria hepatica
- Sauerstoffverbrauch: total systemisch, Leber
- alveolärer Sauerstoffpartialdruck
- Shunt-Fraktion

3.7 Versuchsprotokoll

Das Versuchsprotokoll wurde unmittelbar vor (Spender) bzw. nach der Lebertransplantation (Empfänger) durchgeführt. Hierfür folgte der Instrumentierungsphase und einer Stabilisierungsphase von etwa 30 Minuten zunächst die Messung der Ausgangswerte aller oben beschriebenen Parameter (Messpunkt „Baseline“). Anschließend erhielten die Tiere je 30 Minuten lang eine kontinuierliche intravenöse Infusion von 5 ng/kgKG/min Prostacyclin (Flolan^R, Wellcome Foundation LTD, London) und 15 Minuten später von 0,6 µg/kgKG/min Noradrenalin (Arterenol^R, Hoechst AG, Frankfurt) in einer Konzentration von 1:10000. Jeweils 15 und 30 Minuten nach Beginn der Medikamentengabe (Messpunkte „PGI₂1+2“ und „NA1+2“) wie auch 15 Minuten nach Ende der Noradrenalininfusion (Messpunkt „Abschluss“) wurden erneut sämtliche Daten der Hämodynamik und der Sauerstoffversorgung erhoben (Tab. 1).

| Zeitpunkt (min) | Parametererhebung | Infusionen |
|-----------------|--------------------|-----------------------------|
| 0 | Baseline | Beginn Prostacyclininfusion |
| 15 | PGI ₂ 1 | Prostacyclin |
| 30 | PGI ₂ 2 | Ende Prostacyclininfusion |
| 45 | | Beginn Noradrenalininfusion |
| 60 | NA1 | Noradrenalin |
| 75 | NA2 | Ende Noradrenalininfusion |
| 90 | Abschluss | |

Tabelle 1: Zeitpunkte der Parametererhebungen und Medikamentengaben

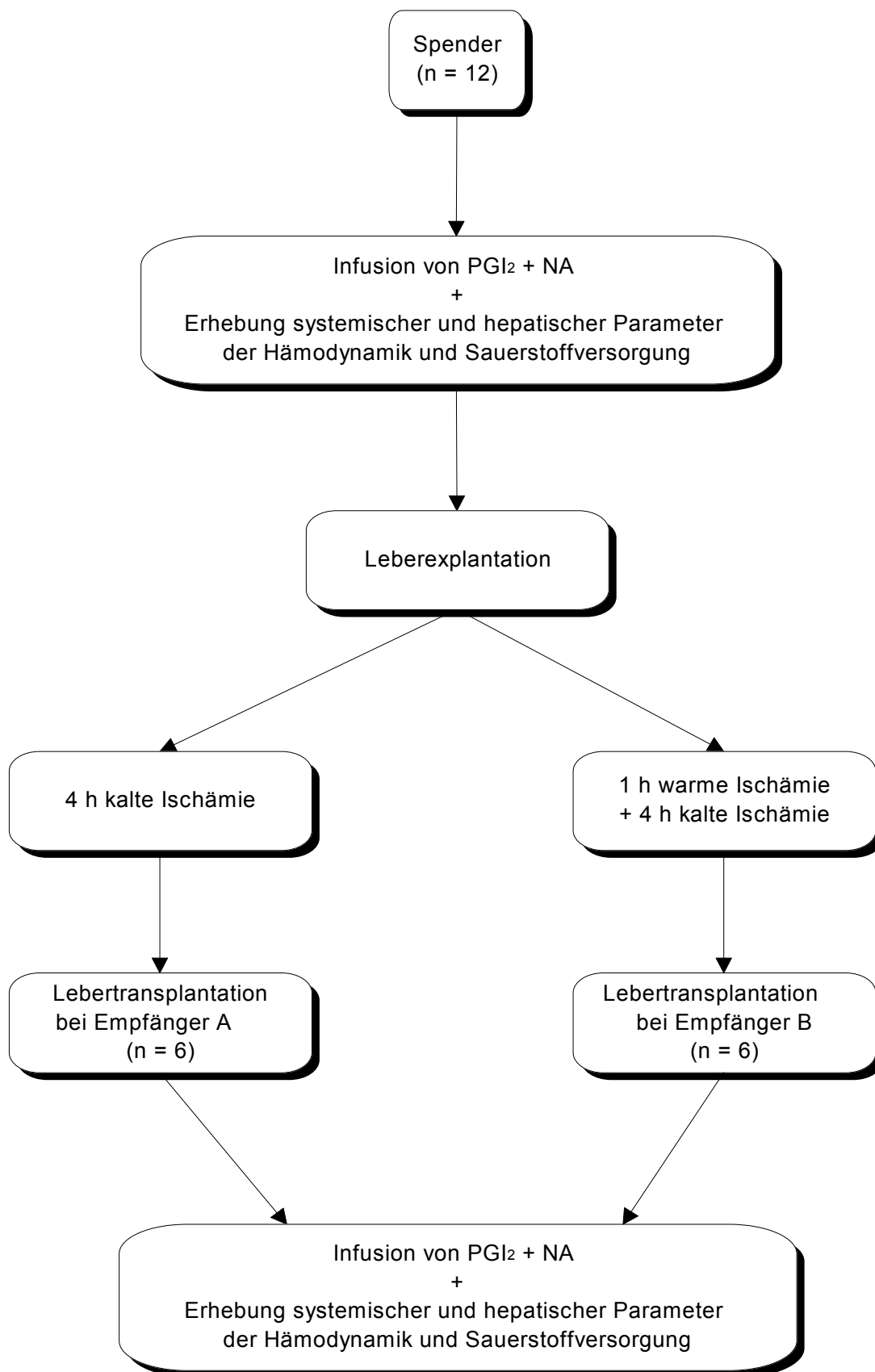


Abb. 5: Schematischer Versuchsablauf

3.8 Statistik und Ergebnisdarstellung

Die Prüfung der globalen Nullhypothese innerhalb einer Untersuchungsgruppe („Es besteht im Mittel kein Unterschied zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Messzeitpunkte ($\alpha = 0,05$)“) erfolgte unter Anwendung des Friedman Tests. Bei Ablehnung der Nullhypothese wurden jeweils zwei Messzeitpunkte paarweise mit Hilfe der Student-Newman-Keul Methode für verbundene Stichproben verglichen ($\alpha = 0,05$). Es wird von unterschiedlichen Ergebnissen zu zwei Messzeitpunkten gesprochen, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit bei diesen Vergleichen kleiner als 0,05 ($p < 0,05$) ist.

Unterschiede zwischen den drei Untersuchungsgruppen zu einem Messzeitpunkt wurden mittels Kruskal Wallis Varianzanalyse gefolgt von der „All Pairwise Multiple Comparison Procedure“ nach der Methode von Dunn für nicht verbundene Stichproben auf Signifikanz überprüft ($\alpha = 0,05$).

Die statistischen Testverfahren wurden im Sinne der explorativen Statistik verwendet, d.h. sie dienen als Hilfsmittel zur Beschreibung der Versuchsergebnisse. Verallgemeinerungen sind nicht ohne weiteres möglich.

Da die p-Werte hier lediglich dazu dienen, nachvollziehbare Kriterien zur Definition von Gruppenunterschieden zu erhalten, wurde auf eine α -Korrektur bei den multiplen Vergleichen verzichtet.

Die statistischen Analysen wurden mit dem Software-Programm SigmaStat Version 3.0 der Firma Jandel Scientific durchgeführt.

Die Ergebnisse werden als Mediane und Perzentile (25, 75) angegeben und sind tabellarisch oder graphisch dargestellt. Die Tabellen und Diagramme wurden unter Anwendung des Software-Programmes Microsoft Excel Version 6.0 erstellt.