Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

und dem

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Universitäres Herzzentrum, Klinik- und Poliklinik
für Herz- und Gefäßchirurgie

Untersuchungen zur Wirkung von Antithymozytenglobulin bei der Rekonditionierung von mit Magensaft/Blut-Gemisch vorgeschädigten Spenderlungen

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

vorgelegt von
Anja Elena Störmer geb. Lüke
Tierärztin aus Den Haag, Niederlande

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3703

mbvberlin | mensch und buch verlag

Aus dem Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin
und dem
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Universitäres Herzzentrum, Klinik- und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie

Untersuchungen zur Wirkung von Antithymozytenglobulin bei der Rekonditionierung von mit Magensaft/Blut-Gemisch vorgeschädigten Spenderlungen

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

vorgelegt von
Anja Elena Störmer geb. Lüke
Tierärztin aus Den Haag, Niederlande

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3703

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber
Zweiter Gutachter:	PD Dr. Florian Wagner
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
respiratory diseases; animal models; pigs; transplantation; gastric acid; aspiration; inflammation; peroxidase; immunosuppression

Tag der Promotion: 27.07.2017

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

ISBN: 978-3-86387-833-7
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

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

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

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved
© Mensch und Buch Verlag 2017
Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis v

1 Einleitung 1

2 Literaturübersicht 3

2.1 Hintergrund: Zur Relevanz der Lungentransplantation 3

2.2 Zur Geschichte der Lungentransplantation 4

2.3 Strategien zur Erweiterung des Spenderpools 6

2.3.1 Xenotransplantation 7

2.3.2 Lebendspender 7

2.3.3 Die *Non-Heartbeating-Donor* Strategie 7

2.3.4 Rekonditionierung geschädigter Lungen 8

2.4 Immunsuppressiva in der Lungentransplantation 10

2.4.1 Antithymozythenglobulin als Immunsuppressivum 10

2.5 Konservierung von marginalen Spenderlungen 12

3 Arbeitshypothese und Strategie dieser Arbeit 14

4 Material und Methoden 17

4.1 Material 17

4.1.1 Allgemein verwendete Geräte 17

4.1.2 Chemikalien 18

4.1.3 Reaktionskits 19

4.2 Methoden 20

4.2.1 Versuchstiere 20

4.2.2 Versuchsablauf 21

4.2.2.1 Prämedikation 21

4.2.2.2 Narkose 22

4.2.2.3 Im OP 22
4.2.2.4 Intubation 23
4.2.2.5 Beatmung 23
4.2.2.6 Venenverweilkanülen 24
4.2.2.7 Katheterisierung 24
4.2.2.8 Versuchsprotokoll in der Aspiration 26
4.2.2.8.1 Blutabnahme 26
4.2.2.8.2 Berechnung von hämodynamischen Parametern 27
4.3 Versuchsgruppen 29
4.4 Aspiration 31
4.5 Sternotomie 31
4.6 Biopsie 32
4.7 Präparation zur Explantation 33
4.8 Blutentnahme und Herstellung eines Erythrozytenkonzentrats 33
4.9 Perfusion 34
4.9.1 Antegrade Perfusion 35
4.9.2 Explantation 36
4.9.3 Retrograde Perfusion 37
4.10 Chirurgische Maßnahmen für die Integration der Lungen in das Reperfusionssystem 37
4.11 Reperfusion 39
4.11.1 Vorbereitung des Reperfusionssystems 39
4.11.1.1 Befüllung des Reperfusionssystems 41
4.11.1.2 Integration des Organblocks in das Reperfusionssystem 41
4.12 Intensivmedizinische Maßnahmen 42
4.13 Antithymozytenglobulin 44
4.14 Protokoll in der Reperfusion 44

4.15 Biopsieentnahme 45

4.16 Labordiagnostik 46

4.16.1 Methoden zur Bestimmung der Lungenqualität 46

4.16.1.1 *Wet and Dry Ratio* 46

4.16.1.2 Myeloperoxidase Assay 47

4.16.1.3 Histologie 49

4.17 Statistische Auswertungen 51

5 Ergebnisse 53

5.1 Compliance 53

5.2 Pulmonal vaskulärer Widerstand 54

5.3 Pulmonaler Oxygenierungsgrad 56

5.4 Pulmonaler Deflationsindex 57

5.5 Histologische Ergebnisse 61

5.6 *Wet and Dry Ratio* 66

5.7 Myeloperoxidase-Werte 68

6 Diskussion 70

6.1 Potentielle Bedeutung der Arbeitsergebnisse für die Lungentransplantation 70

6.2 Arbeitshypothese, Versuchsgruppen und kritische Ergebnisparameter 71

6.3 Ergebnisse der Antithymozytenglobulin-Applikation 75

6.4 Ischämie/Reperfusionsschaden 80

6.5 Maßnahmen zur Stabilisierung der Stickoxid-Verfügbarkeit 84

7 Ausblick 87

8 Zusammenfassung 89

9 Summary 92

10 Abbildungsverzeichnis 94

11 Tabellenverzeichnis 96

12 Literaturverzeichnis 97

13 Eigene Publikationen 110

14 Anhang 111

15 Danksagung 112

16 Selbständigkeitserklärung 113

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	**Abb**ildung
ACC	**Ac**etyl**c**ystein (ACC ist der Handelsname)
AF	**A**tem**f**requenz
AHV	**A**tem**h**ub**v**olumen
AK	**A**ujeszkysche **K**rankheit
ARDS	**A**kutes **R**espiratorisches **D**istress**s**yndrom
ATG	**A**nti**t**hymozyten**g**lobulin
BGA	**B**lut**g**as**a**nalyse
BHZP	**B**undes **H**ybrid **Z**ucht **P**rogramm
BO	**B**ronchiolitis **O**bliterans
E:I	**E**xspiration im Verhältnis zur **I**nspiration
EKG	**E**lektro**k**ardio**g**raphie
ESP	**E**uropäische **S**chweine**p**est
EVLP	***Ex-v**ivo* **L**ungen**p**erfusion
FiO_2	Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion (engl. ***f**raction of **i**nspired **o**xygen*)
Gr.	**Gr**uppe
HES	**H**ydroxy**e**thyl**s**tärke
H/E	**H**ämatoxylin/**E**osin
HZV	**H**erz**z**eit**v**olumen
IL	**I**nter**l**eukin
I/R	**I**schämie/**R**eperfusionsschaden
ISHLT	***I**nternational **S**ociety for **H**eart and **L**ung **T**ransplantation*
ITS	**I**n**t**en**s**ivmedizinische Massnahmen
LA	**L**inkes **A**trium
LAP	Druck im linken Atrium (engl. ***l**eft **a**trium **p**ressure*)

LIS	Lungenverletzungsgrad (engl. ***l**ung **i**njury **s**core*)
LML	**L**inker **M**ittel**l**appen
LOL	**L**inker **O**ber**l**appen
LUL	**L**inker **U**nter**l**appen
MAD	**M**ittlerer **a**rterieller Druck
MPO	**M**yelo**p**er**o**xidase
NHBD	Herztoter Spender (engl. ***n**on **h**eart**b**eating **d**onors*)
OKT 3	Muromonab-CD3 (OKT 3 ist der Handelsname)
PA	**P**ulmon**a**larterie
PAP	pulmonalarteriellen Druck (engl. ***p**ulmonal **a**rterial **p**ressure*)
PaO_2	arterieller Sauerstoffpartialdruck (engl. ***p**artial **a**rterial pressure in **o**xygen*)
PCVII	**P**orzines **C**irco**v**irus Typ **II**
PCWP	Pulmonal kapillarer Verschlussdruck (engl. ***p**ulmonary **C**apillary **W**edge **P**ressure*)
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck (engl. ***p**ositiv **e**nd **e**xpiratory **p**ressure*)
PDI	**P**ulmonaler **D**eflations**i**ndex (engl. ***p**ulmonary **d**eflation **i**ndex*)
P_{insp}mean	Mittlerer Druck in der Plateauphase (engl. ***p**ressure **ins**piratory **mean***)
P_{max}	Maximaler Inspirationsdruck (engl. ***p**ressure **max**imum*)
P_{min}	Minimaler Inspirationsdruck (engl. ***p**ressure **m**inimum*)
PMN	**P**oly**m**orphkernige **n**eutrophile Granulozyten
PMSF	**P**henyl**m**ethan**s**ulfonyl**f**luorid
POC	Pulmonaler Oxygenierungsgrad (engl. ***p**ulmonary **o**xygenation **c**apacity*)
ppm	***p**art **p**er **m**illion*
PRRS	**P**orzines **r**eproduktives und **r**espiratorisches **S**yndrom
PvO_2	Venöser Sauerstoffpartialdruck (engl. ***p**artial **v**enous pressure in **o**xygen*)
PVR	Pulmonaler vaskulärer Widerstand (engl. ***p**ulmonary **v**ascular **r**esistance*)
RML	**R**echter **M**ittel**l**appen

ROL	**R**echter **O**ber**l**appen
RUL	**R**echter **U**nter**l**appen
SPF	**S**pezifiziert **p**athogen**f**rei
SVR	Systemischer Gefäßwiderstand (engl. ***s**ystemic **v**ascular **r**esistance*)
Tab.	**Tab**elle
$TauNH_2$	**T**aurinchloramin
TC	***T**opical **c**ooling*
TNB	5-**T**hio-2-**N**itro**b**enzoesäure
TNF α	**T**umor**n**ekrose**f**aktor alpha
UKE	**U**niversitäts**k**linikum Hamburg-**E**ppendorf
W/D	Nass / Trocken-Gewichtsverhältnis (engl. ***W**et and **D**ry ratio*)
ZVD	**Z**entral**v**enöser **D**ruck

1 Einleitung

Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten, die Zahl verwendbarer Spenderlungen für Lungentransplantationen zu erhöhen.
Lungentransplantationen sind für Patienten mit Lungenkrankheiten im Endstadium oft die einzige Therapiemöglichkeit (Wilkes et al. 2005). Als Indikation für eine Lungentransplantation gelten schwerwiegende Lungenerkrankungen, wie z.B. die chronisch obstruktive Lungenerkrankung, zystische Fibrose, pulmonale Hypertonie oder alpha-1-Antitrypsinmangel (Moffat-Bruce 2009a).
Leider ist der Erfolg von Lungentransplantationen bislang aus verschiedenen Gründen limitiert. Ein wesentlicher Grund ist der Mangel an verwendbaren Spenderlungen (Van Raemdonck et al. 2009). Nur etwa 20 % der Spenderlungen können zur Transplantation genutzt werden (Ingemansson et al. 2009). Daher bleibt es vorrangiges Ziel, den Spenderpool zu erweitern (de Perrot et al. 2003) und so die Wartezeiten bis zu einer Lungentransplantation zu verkürzen.

Viele Spenderlungen können nicht mehr transplantiert werden, da sie so geschädigt sind, dass sie den Anforderungen für eine Transplantation nicht genügen. Eine häufige Ursache dafür ist Magensaftaspiration. Kurz nach dem Eintritt des Todes kann es zur Aspiration von Magensaft kommen, da der ösophageale Sphinkter erschlafft und seine schützende Funktion dann nicht mehr ausführt (Moro 2004). Solche Lungen werden von der Transplantation ausgeschlossen, da es durch die Aspiration zu einer möglichen Dysfunktion des Transplantates (Inci et al. 2008) und zu einer bronchialen Entzündungsreaktion kommen kann (Mertens et al. 2010).

Das Ziel dieser Arbeit ist es, durch Magensaftaspiration vorgeschädigte Lungen so zu rekonditionieren, dass sie wieder transplantationsfähig werden und so zu einer Erweiterung des Spenderpools beitragen können. Die Schädigungen durch Magensaftaspiration werden in der Praxis meist hervorgerufen durch ein Gemisch aus Magensaft und Blut, da sich bei den meisten Spendern aufgrund eines Traumas Blutungen entwickeln. Aus diesem Grunde wurde bei dieser Arbeit ein Magensaft/Blut-Gemisch zur Vorschädigung verwendet. Dabei baut die Arbeit auf früheren Arbeiten im Rahmen eines komplexen Forschungsprojektes zum Thema *ex-vivo*-Lungenperfusion (EVLP) im Arbeitskreis von Herrn PD Dr. F.Wagner auf, in denen andere Vorschädigungen bzw. andere Rekonditionierungspfade untersucht wurden (Wipper et

al. 2007, 2008abc, 2009ab, 2010ab). Insbesondere soll hier der Effekt einer Antithymozytenglobulin (ATG)-Applikation untersucht werden.

Nach Weiterentwicklung eines speziellen, von Wipper et al. (2008b) etablierten Reperfusionskreislaufs wird hier die Schädigung der menschlichen Spenderlunge durch Magensaftaspiration an Schweinelungen nachgeahmt (unter Verwendung eines Magensaft/Blut-Gemisches) und es werden verschiedene Rekonditionierungsstrategien verglichen. Dabei wird insbesondere der Effekt von zusätzlich verabreichtem ATG untersucht.
Zur Untersuchung der ATG-Effekte wurde unter anderem ein Myeloperoxidase (MPO) Assay durchgeführt. MPO ist ein Bestandteil von neutrophilen Granulozyten und wird als ein Marker für die Entzündungsreaktion gesehen (Baldus et al. 2003, Loria et al. 2008).
Um die Transplantabilität der Lungen zu beurteilen, wurden weiter histologische und makroskopische Beurteilungen durchgeführt und hämodynamische Parameter bestimmt.

Verglichen wurden drei Versuchsgruppen von durch Magensaftaspiration vorgeschädigten Lungen (Magensaft steht im Folgenden in dieser Arbeit für ein Magensaft/Blut-Gemisch). Die Versuchsdaten der Gruppe 1 und 2 wurden von Frau Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt.

Die Daten der Gruppe 3 wurden als Gegenstand dieser Arbeit bestimmt und gemeinsam mit den Daten der Gruppe 1 und 2 evaluiert:

1. aspirationsgeschädigte Lungen mit ausschließlicher *ex vivo* Perfusion;
2. aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung;
3. aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung und ATG-Gabe.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass mit Hilfe von intensivmedizinischer Behandlung und dem Einsatz von ATG eine weitgehende Rekonditionierung vorgeschädigter Spenderlungen möglich sein könnte. Insbesondere konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass durch eine ATG-Applikation bereits im Spender eine Transmigration von Leukozyten in das Gewebe der Spenderlungen und somit das Entzündungsrisiko reduziert wird. Dieser Effekt lässt die Erwartung zu, dass eine Behandlung von aspirationsgeschädigten Spenderlungen mit ATG bereits vor der Explantation und unmittelbar nach der Transplantation diese Lungen wieder transplantabel machen könnte und die Erfolgsaussichten einer Transplantation so erhöhen kann.

2 Literaturübersicht

2.1 Hintergrund: Zur Relevanz der Lungentransplantation

Eine Lungentransplantation ist häufig die letzte Therapiemöglichkeit für Patienten mit einer Lungenerkrankung im Endstadium (Wilkes 2005). Seit den frühen 90er Jahren sind weltweit mehr als 25.000 Lungentransplantationen durchgeführt worden (Moffatt-Bruce 2009a).
Grundsätzlich unterscheidet man zwischen drei verschiedenen Arten der Lungentransplantation: Einzellungentransplantation, Doppellungentransplantation und Herz-Lungentransplantation.

Nach den statistischen Erhebungen der International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT 2011) ist die Zahl der Lungentransplantationen inzwischen auf mehr als 2700 pro Jahr angestiegen. Dabei erhöhte sich vor allem die Zahl der Doppellungentransplantationen von 2000 bis 2010 um mehr als das Doppelte, während die Zahl der Einzellungentransplantationen mit etwa 770 pro Jahr nahezu konstant blieb. Die Zahl der Herzlungentransplantationen liegt mit weniger als 100/Jahr deutlich niedriger.

Ebenfalls nach den Angaben der ISHLT sind dabei die Hauptindikationen für Doppellungentransplantationen

- Alpha-1 Antitrypsinmangel mit 7 %,
- chronisch obstruktive Lungenerkrankung mit 26 %,
- Mukoviszidose mit 27 %,
- idiopathische pulmonale Fibrose mit 16 %,
- idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie mit 5 %
- und Retransplantation mit 2 %.

Nach den ISHLT Erhebungen haben sich die Überlebensraten bei den Transplantationen zwar kontinuierlich verbessert, sie sind aber nach wie vor eher niedrig: eine Überlebensrate von 50 % ist danach für Doppellungentransplantationen mit 6,8 Jahren angegeben, für Einzellungentransplantationen nur mit 4,7 Jahren.

Um die Bedeutung von Lungentransplantationen im Vergleich zu anderen Organtransplantationen besser deutlich werden zu lassen, sollen die folgenden Angaben dienen. 2007 wurden in 94 Ländern 5179 Herzen transplantiert und es wurden 19850 Lebertransplantationen

durchgeführt. Am häufigsten wurden Nieren transplantiert, insgesamt 68250. Demgegenüber stehen 3245 Lungentransplantationen (Matesanz et al. 2009).

Van Raemdonck et al. haben 2009 erneut darauf hingewiesen, dass der wichtigste limitierende Faktor für Lungentransplantationen der Mangel an geeigneten Spenderorganen ist. So starben 2007 in den USA circa 13 % der Patienten, während sie auf eine Spenderlunge warteten, und im selben Jahr starben ungefähr 15 % der Patienten, die bei Eurotransplant für eine Lungentransplantation registriert waren.

2.2 Zur Geschichte der Lungentransplantation

Woo beschrieb in einer Veröffentlichung von 2008, dass Charles Guthrie und Alexis Carrel 1906 erfolgreich das Herz und die Lunge eines Katzenwelpen in eine Katze verpflanzten. Die nächsten 50 Jahre wurden weitere Transplantationen an Tieren durchgeführt. Die Erfahrungen dabei haben unter anderem auch geholfen, die wichtige Rolle der Immunsuppression zu verstehen.
Sowohl Woo (2008) als auch Arcasoy (2009) erinnern daran, dass die erste Lungentransplantation an einem Menschen bereits im Jahre 1963, von Dr. James Hardy in Mississippi, durchgeführt wurde. Der Patient hatte ein Karzinom in seiner linken Lunge; daher wurde eine Einzellungentransplantation durchgeführt. Der Patient verstarb 18 Tage nach der Operation an Nierenversagen.

Zu einem Durchbruch in der Organtransplantation kam es in den frühen 80er Jahren durch die Entdeckung und Anwendung von immunsuppressiven Agenzien. Durch die Entwicklung von Immunsuppressiva, chirurgischen Techniken und postoperativen Management wurde die Transplantation von Lungen immer mehr als Therapiemethode etabliert. Wilkes et al. (2005) stellen zusammenfassend die Faktoren dar, die den Erfolg der Lungentransplantation begrenzen. Die bisherige Entwicklung der Lungentransplantation wird in einem Übersichtartikel der Arbeitsgruppe von Ng (2009) detailliert dargestellt. Von Yusen (2009) wurde allerdings eher kritisch hinterfragt, ob die Lebensqualität der Patienten durch eine Lungentransplantation nachhaltig verbessert wird.
Studer et al. (2004) fassen dagegen zusammen, dass eine Lungentransplantation für die Empfänger zwar einen Vorteil im Hinblick auf die Lebensqualität zu bieten scheint, allerdings verbunden mit erheblichen Kosten. Weitere Forschungsanstrengungen sind nach Studer daher

nötig, um insbesondere den Spenderpool zu erweitern und so eine breitere und weniger kostenintensive Anwendung dieser Therapiemethode zu ermöglichen.

Die erste erfolgreiche klinische Einzellungentransplantation gelang Dr. Joel Cooper 1983 in Toronto (Wada 1993, Toronto Group 1986). In diesem Fall wurde der Erfolg der Transplantation auf den Einsatz von Cyclosporin zurückgeführt. Ebenfalls in Toronto wurde 1986 von Dr. Alexander Patterson die erste erfolgreiche Doppellungentransplantation durchgeführt (Patterson 1988). Die erste erfolgreiche Herz-Lungentransplantation erfolgte 1981 in Stanford, wobei der Erfolg ebenfalls dem Einsatz von Cyclosporin zugeschrieben wurde (Moffatt-Bruce 2009a). Die Patientin lebte nach der Transplantation noch 5 Jahre.

Der Erfolg von Lungentransplantationen blieb trotz der Fortschritte limitiert, wofür verschiedene Ursachen genannt werden. So hebt die Arbeitsgruppe von Wilkes (2005) als limitierenden Faktor hervor, dass zu wenige Spenderlungen zur Verfügung stehen, sei es, dass es zu wenige Spender gibt oder dass die Lungen nicht mehr transplantabel sind. Nach Ingemansson et al. (2009), können nur etwa 20 % der Spenderlungen für Transplantationen verwendet werden. Das Langzeitüberleben nach erfolgter Transplantation wird dann wesentlich von der chronischen Transplantatabstossung begrenzt (Boehler 2004).

Orens et al. (2003) kritisieren die allgemein akzeptierten Kriterien zur Akzeptanz von Spenderlungen damit, dass sie eher auf klinischem Eindruck zu beruhen scheinen als auf fundiertem medizinischem Verständnis. Vor dem Hintergrund von mehr als 20 Jahren Transplantationserfahrungen lässt sich sagen, dass deutlich mehr Spenderlungen verwendet werden könnten als es die Standardkriterien zulassen. Daher wird vorgeschlagen, die traditionellen Spenderkriterien (s. Tab. 1) zu erweitern und anzupassen.

Moffatt-Bruce (2009a) betont in einer Veröffentlichung, dass eine Lungentransplantation auch heute noch eine komplexe Operation ist, die erhebliche Risiken für die perioperative Mortalität hat. Daher müsste jeder Patient hinsichtlich der Kontraindikationen individuell bewertet werden.

Die Konservierungsmethoden für Spenderlungen lassen nur einen engen Zeitraum vom Explantieren bis zur Transplantation zu. Zudem ist das Risiko einer Abstossungsreaktion oder einer postoperativen Infektion bei Lungentransplantationen wesentlich höher als bei Transplantationen anderer Organe, da allein die Lunge auch nach der Transplantation Einflüssen

Alter < 55 Jahre
ABO Blutgruppenkompatibilität
Klares Röntgenbild der Lunge
PaO2 >300 bei FiO2 = 1,0; PEEP 5cm H2O
Rauchervergangenheit< 20 Jahre
Kein Lungentrauma
Keine Hinweise auf Aspiration oder Sepsis
Keine Herz-Lungen Operationen
Sputum Gram-Färbung → keine Bakterien
Keine purulente Absonderungen bei Bronchoskopie

Tab. 1: Standardkriterien für den idealen Spender nach Orens et al. (2003)
(PaO2: arterieller Sauerstoffpartialdruck; FiO2: inspiratorische Sauerstoff-Fraktion; PEEP: positiver endexpiratorischer Druck)

der Außenwelt ausgesetzt bleibt (Griffith 2008). Die fünf-Jahres-Überlebensrate nach einer Lungentransplantation ist laut der Arbeitsgruppe von Ng (2009) seit den letzten 15 Jahren unverändert bei etwa 50 % stehengeblieben. Es ist daher entscheidend, die richtige immunsuppressive Therapie zu wählen, um Abstossungsreaktionen weitestgehend zu vermeiden.
Von Wilkes et al. (2005) wird berichtet, dass mehr Patienten sterben, während sie auf eine geeignete Spenderlunge warten, als an postoperativen Komplikationen. Dies wird von van Raemdonck et al. (2009) bestätigt. Auch bereits in einer Arbeit von Gottlieb (2008) wird darauf hingewiesen, dass zu wenig Spenderlungen zur Verfügung stehen und es daher vorrangiges Ziel bleiben muss, den Spenderpool zu erweitern.

2.3 Strategien zur Erweiterung des Spenderpools

Mögliche Strategien zur Erweiterung des Spenderpools werden von zahlreichen Arbeitskreisen diskutiert. Dazu gehören z.B. die Xenotransplantation als eher theoretische Option, die Transplantation einzelner Lungenlappen von lebenden Spendern, die Nutzung von

sogenannten NHBD (*Non-Heartbeating Donors*) Lungen und die Rekonditionierung geschädigter Lungen.

2.3.1 Xenotransplantation

Bei der sogenannten Xenotransplantation werden Organe von Tieren auf den Menschen übertragen. Griffith et al. weisen in einer Veröffentlichung von 2008 darauf hin, dass bereits 1964 Hardy einem 68 Jahre alten Mann ein Schimpansenherz eingepflanzt hat. Seither wurde nur über sechs weitere Versuche von Xenotransplantationen berichtet, die zwar alle nicht erfolgreich waren, aber zu einem verbesserten Verständnis der Methode beigetragen haben.

Griffith et al. (2008) sind der Ansicht, dass die Organe von nicht humanen Primaten für Xenotransplantationen am besten geeignet zu sein scheinen. Nicht humane Primaten sind allerdings relativ selten und ihre Nutzung ist aus ethischen Gründen weniger akzeptiert. Aus medizinischer Sicht ist auch das Risiko der Übertragung eines Primatenvirus auf den Menschen besonders kritisch zu bewerten. Von anderen Arbeitskreisen ist daher untersucht worden, ob Organe von Schweinen sich zur Xenotransplantation eignen. Petersen et al. (2009) fordern gezielte Genmodifikation bei Spenderschweinen, um Abstossungsreaktionen nach der Transplantation zu unterdrücken. Pierson (2009) weist darauf hin, dass in Neuseeland ein klinischer Test mit Pankreaszellen aus Schweinen genehmigt wurde. Auch Arcidiacono et al. (2010) berichten über den Einsatz von Pankreaszellen aus Schweinen in der Diabetestherapie.

2.3.2 Lebendspender

Barr und seine Mitarbeiter berichten 2005, dass die Transplantation von Lungenlappen lebender Spender für Patienten entwickelt wurde, die zu krank sind, um lange auf ein passendes Spenderorgan zu warten. Zwischen 1993 und 2004 wurde diese Methode von Barr und Mitarbeitern 133 mal mit Erfolg angewandt. Wegen des mit dieser Methode verbundenen Risikos für die Spender ist dieser Weg aus ethischen Gründen aber umstritten (Wells et al. 2005).

2.3.3 Die *Non-Heartbeating-Donor* Strategie

Als erfolgversprechendste Strategie zur Erweiterung des Spenderpools wird allgemein die verstärkte Nutzung von NHBD Lungen gesehen. Insbesondere geht es dabei darum, die Akzeptanz von nur marginal oder bisher nicht nutzbaren Lungen zu erhöhen bzw. wieder herzustellen.

So weisen Rega et al. (2004), de Perrot et al. (2004), de Antonio et al. (2008) und van de Wauwer et al. (2009) darauf hin, dass die NHBD Strategie eine Möglichkeit bietet, um den Spenderpool zu erweitern. Steen et al. (2003) hatten dies im Tiermodell bereits gezeigt.

Van de Wauwer sagt weiterhin, dass NHBD nach der Maastricht Klassifikation in vier Kategorien unterteilt werden können:

1. Tot bei der Ankunft.
2. Fehlgeschlagene Wiederbelebung.
   Hierbei erfolgt der Herztod unerwartet ausserhalb des Krankenhauses, daher ist die Situation für eine Organerholung unkontrolliert.
3. Abbruch der lebenserhaltenden Massnahmen in Erwartung des Herztodes
4. Herztod in hirntoten Spendern.
   Hierbei können die Organe unter kontrollierten Umständen regenerieren.

Auch wenn von vielen Autoren die NHBD Methode als vielversprechende Möglichkeit hervorgehoben wird, um den Spenderpool zu erweitern, ist die Nutzung von NHBD Spenderlungen umstritten. Als ein Schwachpunkt dabei wird z. B. die Instabilität der Lunge unmittelbar vor dem Tod des Spenders gesehen. Die Verletzungen in der Agoniephase könnten schwerwiegender sein als die Schäden, die während der warmen Ischämiephase auftreten (van de Wauwer et al. 2009).

2.3.4 Rekonditionierung geschädigter Lungen

Da bisher etwa 80 % der Spenderlungen wegen verschiedenster Schädigungen für Transplantationen nicht verwendet werden können (Cypel et al. 2009), eröffnet die Rekonditionierung solcher Lungen potentiell eine Möglichkeit zur signifikanten Erweiterung des Spenderpools.

2007 gab es eine Veröffentlichung der Arbeitsgruppe von Steen (Steen et al. 2007), in der die erste Transplantation einer rekonditionierten Lunge beschrieben wird. Hierbei wurde eine Einzellunge, welche ein Ödem, Einblutungen und atelektatische Bereiche zeigte, *ex vivo* rekonditioniert und bis zur Transplantation mit Sauerstoff versorgt. Die Lunge arbeitete nach der Transplantation erfolgreich. Nach drei Monaten zeigten CT-Bilder noch eine normal arbeitende Lunge. Nach elf Monaten starb der Patient an einer Sepsis.
2009 berichtet die Arbeitsgruppe von Steen über weitere Transplantationen rekonditionierter Lungen (Ingemansson 2009). Die Lungen wurden auch hierbei *ex vivo* beatmet und zusätzlich mit Steen-Lösung, die mit Erythrozyten vermischt war, durchspült. Alle sechs Patienten überlebten drei Monate. Ein Patient verstarb aufgrund einer Sepsis, ein weiterer durch eine Abstossungsreaktion. Die restlichen vier Patienten leben ohne Anzeichen einer Abstossungsreaktion seit der Transplantation.

Im Arbeitskreis von Wagner haben Wipper et al. an gezielt vorgeschädigten Schweinelungen verschiedene Rekonditionierungsstrategien untersucht (Wipper et al. 2007, 2008abc, 2009ab). Sie entwickelten zunächst einen Reperfusionskreislauf, in dem die explantierten Schweinelungen nach Perfusion mit Perfadex® über sechs Stunden rekonditioniert werden können (Wipper et al. 2007, 2008b). In der ersten Versuchsreihe induzierten sie bei Schweinen durch intracranielle Balloninflation einen Hirntod, um die Lungen gezielt zu schädigen. Anschließend wurden die Lungen mit Hilfe des Reperfusionskreislaufs rekonditioniert (Wipper et al 2008a).
In einer weiteren Reihe von Versuchen (Wipper et al. 2009ab) wurden die Schweinelungen durch eine intratracheale Magensaftapplizierung gezielt geschädigt und anschließend rekonditioniert. Es wurden zwei Versuchsgruppen evaluiert. Die erste Gruppe wurde nach demselben Protokoll wie Versuchsgruppe 3 dieser Arbeit, aber ohne intensivmedizinische Maßnahmen (ITS) und ohne Antithymozytenglobulin (ATG) Applikation rekonditioniert. Die zweite Gruppe wurde zusätzlich intensivmedizinisch behandelt. Eingesetzt wurden dabei die Stickoxid (NO)-Beatmung, Acetylcystein (ACC), Antibiotika und Methylprednisolon. Beide Versuchsreihen wurden hier als Vergleichsgruppen (Gruppe 1 und 2) verwendet, wobei die Versuchsdaten von Frau Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt wurden.

Von Wipper et al. wurden erste Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit den genannten Versuchsgruppen 1 und 2 publiziert (Wipper et al. 2011a-d).

Magensaftaspiration ist ein häufiger Grund für die Schädigung von Spenderlungen. Dazu kommt es im Tod, da der ösophageale Sphinkter bei Bewusstlosigkeit erschlafft und die verbundenen Schutzreflexe ausfallen (Moro 2004). Eine Folge der Magensaftaspiration ist die Aspirationspneumonitis (Mendelson Syndrom), eine chemische Verletzung, die durch das Inhalieren von sterilen Magenkomponenten verursacht wird (Marik 2001). Nach experimentellen Untersuchungen wird die Verletzung der Lunge dabei umso intensiver, je größer das aspirierte Volumen und je niedriger der pH-Wert sind. Die meisten Autoren stimmen überein, dass eine Aspirationspneumonitis entsteht, wenn der pH kleiner als 2,5 ist und das Volumen 0,3 ml/kg Körpergewicht (KG) übersteigt.

Die Aspiration von Magensaft verursacht eine tiefgreifende Entzündungsreaktion des Parenchyms.
Nach einer Studie mit Ratten verläuft die Lungenschädigung durch Aspiration von Magensaft in zwei Phasen. Die erste Phase hat ihren Peak ein bis zwei Stunden *post aspirationem,*

wahrscheinlich verursacht durch den Angriff des sauren Aspirates auf die Zellen der Blut-Luft-Schranke. Die zweite Phase hat ihren Peak nach vier bis sechs Stunden und ist charakterisiert durch eine Infiltration mit Neutrophilen in die Alveolen und das Interstitium.

Bei der Lungenschädigung aufgrund einer Magenaftaspiration ist ein breites Spektrum von Entzündungsmediatoren, Entzündungszellen, Adhäsionsmolekülen und Enzymen involviert, unter anderen TNF-α (Tumornekrosefaktor-α), IL 8 (Interleukin 8), Cyclooxygenase, lipoxygenase Produkte und reaktive Sauerstoffmoleküle. Dabei scheinen Neutrophile und das Komplementsystem eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Lungenschädigung zu spielen (Marik 2001).

Die Schädigungen durch Magensaftaspiration werden in der Praxis meist hervorgerufen durch ein Gemisch aus Magensaft und Blut, da sich bei den meisten Spendern aufgrund eines Traumas Blutungen entwickeln. Wie schon erwähnt, wurde aus diesem Grunde bei dieser Arbeit ein Magensaft/Blut-Gemisch zur Vorschädigung verwendet.

Auch die Arbeitsgruppe von Inci beschrieb 2008 den Versuch, eine Schweinelunge, die durch Magensaftaspiration geschädigt wurde, zu rekonditionieren. Hierzu wurde während der Perfusion der Lunge verdünntes Surfactant zugeführt, um Aspiratreste auszuwaschen. Die Ergebnisse zeigten eine funktionelle Verbesserung des Transplantates.

2.4 Immunsuppressiva in der Lungentransplantation

Ein Durchbruch bei klinischen Organtransplantationen wurde durch die Entdeckung und Anwendung moderner Immunsuppressiva in den 80er Jahren eingeleitet. In den 90er Jahren war dann eine größere Zahl von Immunsuppressiva untersucht worden, die eine Abstossungsreaktion verhindern oder verzögern können.

In einer neueren Übersichtsarbeit von 2009 fassen Korom et al. den Stand der immunosuppressiven Therapie bei Lungentransplantationen zusammen.

2.4.1 Antithymozytenglobulin als Immunsuppressivum

In ihrer Übersichtsarbeit stellen Korom et al. auch dar, dass die neuere Forschung vor allem polyklonale (ATG) und monoklonale (OKT 3) antilymphozyte Antikörper als Immunsuppressiva untersucht, neben Antizytokin-Rezeptor Antikörpern, Cortikosteroiden und speziellen Inhibitoren. Die Anwendung von OKT 3 ist wegen seiner Nebeneffekte begrenzt geblieben. Dagegen zeigen die Antizytokin-Rezeptor Antikörper (z.B. Daclizumab) weniger

Nebeneffekte und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen, vor allem im Vergleich zu ATG.

Hachem et al. (2005) und Burton et al. (2006) fanden Vorteile für ATG bezüglich der Verhinderung von akuter Abstossung. Bei einer retrospektiven Analyse von Nierentransplantationen zeigte sich aber (Goligher et al., 2009), dass ATG auch zu einem erhöhten Risiko von ARDS (akutes respiratorisches Distress-Syndrom) führen kann. In seltenen Fällen war ATG möglicherweise auch der Grund für eine Reihe von Lungenverletzungen, von transienten Infiltraten bis zum vollständigen ARDS.
Um die Wirkungsweise von ATG besser zu verstehen, ist es erforderlich, zunächst zu verstehen, wie der Organismus auf fremdes Gewebe reagiert.
Gewebeschädigungen durch endogene oder exogene Noxen verursachen eine Entzündungsreaktion. Es kommt zur Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten.
Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind wichtige Protagonisten der angeborenen Immunantwort mit der Fähigkeit zur Migration und Extravasation - einer notwendigen Voraussetzung zur Pathogenabwehr.
Daraufhin kommt es zur Produktion von proinflammatorischen Mediatoren, wie Histamin, Serotonin, Bradykinin, Zytokinen, Chemokinen und proteolytischen Enzymen. Diese Mediatoren verursachen eine erhöhte Permeabilität des Endothels und eine Expression von Adhäsionsmolekülen. Es kommt zu einer Expression der NO-Synthase; durch das NO, Bradykinin und Histamin wird eine Vasodilatation hervorgerufen. Der Blutstrom wird dadurch verlangsamt und die Entzündungszellen, wie die neutrophilen Granulozyten, gelangen an die Gefäßwand. Ihre Migration wird durch Chemotaxine induziert, die ein Rollen entlang der Endothelzellen bewirkt. Dabei docken die neutrophilen Granulozyten mit ihren Adhäsionsmolekülen an das Endothel an und transmigrieren in das Gewebe (Klinke 2009).

Die Wirkung von ATG auf diesen Mechanismus erklären Beiras-Fernandez et al. (2009) wie folgt: bei der Organtransplantation kommt es zunächst durch Ischämie, einem akuten Entzündungsprozess, zu Organschädigungen und später durch Reperfusion zu Zellfehlfunktionen und schließlich zum Zelltod. Dabei ist die Aktivierung von endothelialen Zellen und Leukozyten in den ersten Stunden nach der Organtransplantation einer der im Hintergrund ablaufenden Vorgänge. Dadurch wird die Expression von Zelloberflächenadhäsionsmolekülen eingeleitet, welche kritisch sind für die Einwanderung von Effektorzellen in das transplantierte Gewebe. Weiter ist damit verbunden die Erzeugung von freien Radikalen, welche die

Zellmembran schädigen, so dass der Ausstoß von Adhäsionsmolekülen weiter beschleunigt wird.

Es konnte gezeigt werden, dass ATG diese Effekte reduziert und in den zellulären und humoralen Mechanismus des Immunsystems eingreift. Es verursacht eine Blockade von Adhäsionsmolekülen und endothelialen Entzündungsmolekülen. Beiras-Fernandez et al. konnten mit früheren Untersuchungen (2004, 2006) zeigen, dass ATG die Leukozyten-infiltration unterdrückt. Weiter konnten Sie nachweisen, dass ATG das Ausmaß der Bindung von Leukozyten an endotheliale Zellen vermindert. Entsprechend haben sie die Hypothese aufgestellt, dass eine direkte Wirkung von ATG auf die endothelialen Zellen dazu führt, dass die Expression von Adhäsions- und Entzündungsmolekülen unterdrückt wird und es dadurch zu einer verminderten Gewebezerstörung kommt (Beiras-Fernandez et al. 2009).

Die immunsuppressive Wirkung von ATG wurde bislang bei einer Lungentransplantation erst *post transplantationem* im Empfänger genutzt (Knoop et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit kann nun gezeigt werden, dass eine ATG Gabe schon im Spender einen positiven Einfluss auf das Transplantat haben könnte. Weitere Arbeiten zur Absicherung dieser These sind aber erforderlich.

2.5 Konservierung von marginalen Spenderlungen

Egan beschrieb 2004, dass bereits in Tiermodellen (Hunde) gezeigt werden konnte, dass Lungen auch von vor einigen Stunden verstorbenen Spendern nach der Transplantation adäquat arbeiten.

Bei der Nutzung von NHBD Lungen ist die Konservierung der Spenderlungen nach der Entnahme aber oft problematisch. Deshalb sind zahlreiche experimentelle Studien ausgeführt worden, um neue Konservierungstechniken zu entwickeln. Kutschka et al. haben 2003 mit der Methode des *Topical Cooling* (TC) gezeigt, dass ein schneller Organschutz für Spenderlungen möglich ist. *Topical Cooling* beschreibt das Füllen des Thorax mit eiskalter Kristalloidlösung (Moffatt-Bruce 2009b). Kutschka hat die Wirksamkeit seiner Methode durch Einzellungen-transplantationen mit Schweinelungen nachgewiesen. *In situ* TC scheint danach eine zuverlässige Methode zu sein, um Lungen bis zu 24 Stunden zu konservieren.

Neben den Arbeiten der Arbeitsgruppe um Wagner am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) wurde von Keshavjee und Mitarbeitern (Cypel et al. 2009) ebenfalls eine Methode entwickelt, die eine *ex vivo* Behandlung vorgeschädigter Lungen erlaubt. Es konnte

an Schweinelungen gezeigt werden, dass eine fortgesetzte (12 Stunden), normothermische, zellfreie, *ex-vivo* Lungenperfusion (EVLP) eine erfolgreiche Methode zur Stabilisierung von Spenderlungen ist. Dabei wurden die Schweinelungen mit kalter Perfadex® Lösung konserviert, anschließend bei 37 °C weitere 12 Stunden mit Steen™ Lösung perfundiert und schliesslich transplantiert. Diese EVLP-Behandlung ergab deutlich bessere Ergebnisse als beispielsweise eine zuvor häufig praktizierte hypothermische Langzeitkonservierung. Keshavjee konnte weiter zeigen, dass EVLP fortgesetzte ischämische Schädigungen verhindert und die Erholung der transplantierten Lunge beschleunigt.

Im Dezember 2008 teilte das Toronto General Hospital mit, dass es Dr. Keshavjee zum ersten Mal gelungen war, eine nach seiner Methode behandelte Lunge erfolgreich einem Menschen zu transplantieren (University Health Network 2008).

In neueren Arbeiten (Cypel et al. 2011, 2012) wird berichtet, dass die Transplantation von nicht optimalen Spenderlungen durch Stabilisierung mit EVLP auf Basis umfangreicher klinischer Untersuchungen zu ähnlich guten Ergebnissen führen kann wie bei Einsatz konventionell selektierter Lungen.

3 Arbeitshypothese und Strategie dieser Arbeit

Aus den Ergebnissen früherer Versuche im Arbeitskreis von Wagner kann man ableiten, dass in rekonditionierten vorgeschädigten Spenderlungen noch eine große Anzahl von Entzündungszellen aufgrund der Vorschädigung vorhanden ist. Um Wege zur Lösung dieses Problems zu entwickeln, liegt der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung der antiinflammatorischen Effekte einer Behandlung mit ATG bei der Rekonditionierung durch Magensaftaspiration vorgeschädigter Schweinelungen.
Die Arbeitshypothese stützt sich auf Arbeiten von Beiras-Fernandez et al. (2004, 2006, 2009), die zeigen, dass ATG Entzündungsreaktionen hemmen kann. Danach sollte eine Behandlung mit ATG zu einer Senkung der Zahl von Entzündungszellen auch im Lungengewebe führen können, so dass entsprechend behandelte Lungen im größeren Umfang als transplantabel zur Verfügung stehen könnten.

Die Versuche wurden mit Schweinen durchgeführt, da die Lungen des Schweines anatomisch, biochemisch, physiologisch, von der Größe und den Genen, den menschlichen Lungen am ähnlichsten sind. Diese Ähnlichkeit wurde bereits 2008 in einer Studie von Rogers et al. hervorgehoben, die zeigt, dass Schweine exzellente Tiermodelle für kardiovaskuläre Erkrankungen bieten und dass gerade auch Schweinelungen hervorragend für experimentelle Studien geeignet sind. Schweinelungen wurden bereits häufig als Modell eingesetzt, z.B. von Kutschka et al. 2003, von der Arbeitsgruppe von van Raemdonck (Rega et al. 2004; van de Wauwer et al. 2009), von Erasmus et al (2006) und von Inci et al. 2008.
Der Grad der Ähnlichkeit zwischen der Anatomie des Menschen und des Schweines zeigt sich z.B. beim Vergleich des Aufbaus der jeweiligen Lungen: die linke Lunge des Schweines besteht aus einem kranialen Lungenlappen, welcher in einen kranialen und kaudalen Abschnitt untergliedert ist und aus einem kaudalen Lappen. An der rechten Lunge findet man einen kranialen, medianen und kaudalen Lungenlappen. Zudem gibt es noch einen *lobus accessorius*. Eine Besonderheit besteht darin, dass direkt aus der Trachea der *Bronchus trachealis* entspringt, der den kranialen rechten Lappen versorgt.
Der linke Lungenlappen des Menschen ist in zwei Lungenlappen untergliedert. Die rechte Lunge ist beim Menschen ebenfalls in drei Lappen aufgeteilt.
Die Zahl und Art der Versuchsgruppen dieser Arbeit ergab sich aus den bereits zitierten Ergebnissen vorliegender Arbeiten im Arbeitskreis von Wagner am UKE:

1. Wipper und Wagner konnten an ihrem Aspirationsmodell zeigen, dass die häufige Vorschädigung von Lungen mit Magensaft die Transplantabilität deutlich herabsetzt.
2. Die Stabilität so vorgeschädigter Lungen konnte durch Reperfusion allein nicht ausreichend erhöht werden.
3. Auch mit intensivmedizinischen Massnahmen (NO-Beatmung, ACC, Antibiotika und Methylprednisolon) konnte keine ausreichende Stabilität erreicht werden.
4. Der Einsatz von ATG wird nun als Option betrachtet, die bisher untersuchten Transplantationsstrategien zu erweitern.

Danach sollte die Arbeitshypothese mit drei Versuchsgruppen folgenden Aufbaus zu testen sein. Die Versuchsdaten der Gruppe 1 und 2 wurden von Frau Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt:

1. aspirationsgeschädigte Lungen mit ausschließlicher *ex vivo* Perfusion;
2. aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung;
3. aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung und ATG-Gabe.

Um auf eine Wirkung von ATG zu prüfen, das Hauptziel der Arbeit, wurde ein Myeloperoxidase-Assay durchgeführt. Myeloperoxidase, MPO, ist ein Protein, welches hauptsächlich in der azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten und im geringen Maße in Monozyten expressiert wird. Bei einer Aktivierung dieser Entzündungszellen wird MPO freigesetzt, dass damit als ein Marker für neutrophile Infiltration genutzt werden kann (Lau et al. 2006) und es so gestattet, potentielle entzündungsunterdrückende Effekte von ATG nachzuweisen.

Bei der Reperfusion kommt es zu Zellschädigungen durch eine verminderte Konzentration von Stickoxid (NO). NO hat eine antiinflammatorische Wirkung, indem es die Anhaftung von Leukozyten inhibiert und Thrombozytenaggregation verhindert. Zudem besitzt NO einen vasodilatatorischen Effekt (Baldus et al. 2004).
Viele Studien haben gezeigt, dass die Konservierung und Reperfusion von Lungen zu einem NO-Defizit führen (Liu et al. 2000).
Bei einer Entzündungsreaktion werden neutrophile Granulozyten aktiviert, welche MPO exprimieren. Das MPO transmigriert in die subendotheliale Matrix. Hier katalysiert MPO die Oxidation von Chloridionen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu hypochloriger Säure (HOCl).

Die Bindung von MPO an die Zellwand ist Voraussetzung zur Entfaltung der oxidativen Wirkung des Enzyms (Lau et al. 2006). HOCl ist der eigentliche Vermittler der mikrobioziden und viruziden Eigenschaften der neutrophilen Granulozyten (Lau et al. 2006). Es wird angenommen, dass etwa 50 % des H_2O_2, welches von aktiven neutrophilen Granulozyten produziert wird, an der MPO-katalysierten Oxidation von Chlorid zu HOCl teilnimmt. Bei einer entzündlichen Reaktion kann die Konzentration von HOCl dabei so hoch werden, dass sie das Gewebe schädigt (Zhang et al. 2001).

Ein weiteres physiologisch bedeutendes Substrat für MPO ist NO. NO ist nach neueren Erkenntnissen ein wesentlicher Faktor bei der körpereigenen Abwehr der Zellschädigung, da es schnell durch Reaktion mit freien Radikalen zu einer Reihe von wirksamen Oxidantien mit vielfacher biologischer Wirkung reagieren kann (Pacher et al. 2007). MPO aber katalysiert die Oxidation des Moleküls NO selbst (Eiserich et al. 2002) und reduziert so seine Bioverfügbarkeit (Baldus et al. 2006). Nach Lau et al. (2006) erfolgt diese Oxidation indirekt, indem zunächst Tyrosyl- und Ascorbylradikale oxidiert werden, die dann ihrerseits NO oxidieren.

Das Verständnis, dass MPO in pathophysiologisch relevantem Ausmaß NO oxidieren kann, war ein wichtiger Schritt zu der Erkenntnis, dass dieses Enzym so auch die Bioverfügbarkeit dieses wichtigen vasoaktiven und antiinflammatorischen Moleküls reduziert (Baldus et al. 2004, Klinke 2009). Rudolph et al. (2010) konnten an Schweinen bestätigen, dass MPO *in vivo* den vaskulären Tonus deutlich beeinflusst. Sie leiten daraus ab, dass MPO als kritischer systemischer Regulator der Vasomotilität beim Menschen wirkt und damit als potentielles therapeutisches Zielobjekt gesehen werden sollte. Ein entzündungshemmender Effekt von ATG sollte daher die Exprimierung von MPO weitgehend verhindern und die Bioverfügbarkeit von NO aufrechterhalten. Dieser Effekt soll in dieser Arbeit mit Hilfe eines MPO-Assays nachgewiesen werden.

Zur weiteren Beurteilung der Transplantabilität der Lungen wurden hämodynamische und respiratorische Parameter protokolliert. Es wurden histologische und makroskopische Beurteilungen durchgeführt. Der Ödemgehalt der Lungen wurde unter anderem durch Bestimmung des *Wet and Dry Ratio* (W/D) analysiert.

Um die Arbeitshypothese zu testen, dass die Behandlung mit ATG zu einer Senkung der Zahl von Entzündungszellen führt, wurde der Schwerpunkt der Messungen auf folgende Felder gelegt:

Compliance, PVR, POC, PDI, Histologie, *Wet and Dry Ratio*, MPO.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Allgemein verwendete Geräte

Bezeichnung	**Hersteller**
Aortenkanüle (DLP® One-Piece Pediatric Arterial Cannulae 16 fr)	Medtronic (Düsseldorf)
6F arterielle Schleuse (11 cm Einführschleuse mit hämostatischem Ventil und Sideport und 18 G Einführungskanüle)	B.Braun (Melsungen)
Beatmungsgerät (Puritan® Bennett, 7200 series ventilatory system)	Covidien-Nellcor™ and Puritan Bennett™ Boulder, USA
BGA Spritzen (Picco50 Arterial Blood Sampler)	Radiometer® (Willich)
Blutgasanalysator (ABL800 FLEX)	Radiometer® (Willich)
Braunüle, Vasofix® (1,1mm, G20, rosa)	B.Braun (Melsungen)
Braunüle Vasofix®, (1,3mm G18, grün)	B.Braun (Melsungen)
Cirrus Vernebler	Intersurgical (Berkshire, UK)
Dideco Compact Advanced Cell Saver	Sorin Group (München)
Dreifachdruckmesssystem (DPS)	Medex medical Ltd. (Lancashire, UK)
Druckmesskatheter (Maquet® cardiopulmonary Pressure Monitoring Catheter 3,6 FR 1,2mm	MAQUET (Bensheim)
Elektrocauter Valleylab Force 40	Pfizer (Berlin)
Erdungselektrode (3M™ Universalelektrode)	3M (Neuss)
Falkonröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
32F Kanüle DLP®	Medtronic (Düsseldorf)
Kühlzentrifuge (Centrifuge 5810 R)	Eppendorf (Hamburg)
Leukozytenfilter (Pall LeukoGuard™ LG)	Terumo (Eschborn)
Lichtmikroskop (Leica DMIRE 2)	Leica (Wetzlar)
96 Lochplatte (Low 96-well clear)	BioRad (München)
Monitor Transcope 12® Marquette	Electronics Inc (Indiana, USA)
Multiflow Rollerpumpe	STÖCKERT (München)
Oxygenator (Lilliput)	Sorin Group (München)

Tab. 2: Verwendete Geräte

Perfusionsleitung (HTK-Perfusions-Set double line (2x 1/16 1x ¼))	Meddev (Texas, USA)
Perfusor® fm	B.Braun (Melsungen)
Perfusorspritze (BD Discardit™ II)	B.Braun (Melsungen)
Picco Plus® Gerät	Pulsion Medical Systems (München)
Pigtail Katheter F5	B. Braun (Melsungen)
pH-Meter CG840,	SCHOTT (Mainz)
Red Dot™ EKG-Elektroden	3M (Neuss)
Safe Lock Tubes	Eppendorf (Hamburg)
Stahlkugeln (Stainless Steel Beads 5 mm)	Qiagen (Hilden)
Swan-Ganz-Katheter (PV 2047 VoLEF Catheter 7 F, Pulmonary artery thermodilution right ventricular ejection fraction catheter)	Pulsion Medical Systems (München)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tissue-Lyser	Qiagen (Hilden)
8F venöse Schleuse (Intradyn, 11,5 cm Einführschleuse mit hämostatischem Ventil und Sideport)	B.Braun (Melsungen)
Wärmeschrank (Julabo BIOTHERM 37)	Qiagen (Hilden)

Tab. 2 (fortgeführt): Verwendete Geräte

4.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	**Hersteller**
ACC® injekt 300 mg/3 ml	Hexal (Holzkirchen)
ATG Fresenius S®	Fresenius Biotech (München)
Atropin (Atropinsulfat 100 mg®)	Köhler (Koblenz)
Cefuroxim Fresenius 1500mg,	Fresenius Kabi (Oberursel)
Dormicum®	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Ecobag Click NaCl 0,9 %,	B. Braun (Melsungen)
Fentanyl®-Janssen	Janssen (Neuss)
4 % Formalin (Roti® -Histofix 4 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10000 I.E./ml	B. Braun (Melsungen)

Tab. 3: Verwendete Chemikalien

Isotonie Kochsalz-Lösung 0,9 %	B. Braun (Melsungen)
Ketamin Gräub	Albrecht (Aulendorf)
Metronidazol Fresenius Infusionslösung	Fresenius Kabi (Oberursel)
Narcoren®	Merial (Hallbergmoos)
Natrium-Bikarbonat (7,5%)	GIBCO BRL Life Technologie (Eggenstein-Leopoldshafen)
Nitrolingual® infus	G. Pohl-Boskamp (Hohenlockstedt)
Perfadex®	Vitrolife (Göteborg, Sweden)
Phenylmethanesulfonyl fluoride	Sigma-Aldrich (München)
Ringer-Infusionslösung	B. Braun (Melsungen)
Steen Solution™	Vitrolife (Göteborg, Schweden)
Stresnil®	Janssen (Neuss)
Tris 36,34%	B.Braun (Melsungen)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (München)
Urbason solubile forte 1000 mg	Sanofi-Aventis (Frankfurt)
Voluven®	Fresenius Kabi (Oberursel)

Tab. 3 (fortgeführt): Verwendete Chemikalien

4.1.3 Reaktionskits

Bezeichnung	**Hersteller**
MPO-412	Applied Bioanalytical Labs (Florida, USA)
Pierce BCA- Protein Assay Kit	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)

Tab. 4: Verwendete Reaktionskits

4.2 Methoden

4.2.1 Versuchstiere

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden in dieser Arbeit nur an den Schweinen der Gruppe 3 durchgeführt. Dabei wurde aber nach demselben Versuchsprotokoll vorgegangen, dass für Gruppe 1 und 2 von Dr. S. Wipper angewendet wurde (Wipper et al. 2007, 2008b). Die Versuche wurden an deutschen Hybridschweinen (*sus scrofa domestica*) durchgeführt. Die Tiere hatten ein durchschnittliches Gewicht von 70 kg und waren unterschiedlichen Geschlechts. Die Einzelgewichte der Schweine für Gruppe 3 sind in Anhang 13 aufgeführt. Das Alter der Tiere ergibt sich ebenfalls aus den Angaben in Anhang 13. Alle Schweine kamen aus der Tierzucht Lüneburg (der BHZP, Bundes Hybrid Zucht Programm GmbH). Dieser Betrieb züchtet unter Beachtung besonderer Gesundheitsvorsorgemaßnahmen in allen Bereichen der Produktion sowie der vor- und nachgelagerten Stufen, um Infektionskrankheiten weitestgehend zu verhindern. Die Zuchteber werden zu über 90 % in eigenen Basisbetrieben oder in BHZP-Vertragsbetrieben erzeugt. Diese Betriebe werden regelmäßig auf relevante Erkrankungen und Erreger, insbesondere PRRS (porzines reproduktives und respiratorisches Syndrom), untersucht. Anschließend werden diese Tiere mit speziellen Zuchttierfahrzeugen der VzF GmbH auf die BHZP-Quarantänestation gebracht. Während der 30 tägigen Quarantäne werden alle Tiere erneut untersucht auf ESP (Europäische Schweinepest), AK (Aujeszkysche Krankheit), Brucellose und zweifach auf PRRS. Zudem werden alle Tiere gegen Parvovirose, Rotlauf, Influenza und PCVII (Porzines Circovirus Typ II) geimpft. In der Besamungsstation werden die Eber einmal pro Jahr auf ESP, AK und Brucellose untersucht. Außerdem werden mindestens je zehn Tiere pro Station mindestens einmal monatlich auf PRRS untersucht. Die Impfungen gegen oben erwähnte Erkrankungen werden zweimal jährlich wiederholt. Regelmäßige Untersuchungen der Ejakulate und Hygiene-Trainingsmaßnahmen der Mitarbeiter sichern den hohen Standard der Spermaqualität.
Alle Bereiche werden über strenge Zugangsbeschränkungen von Keimen abgeschirmt. Sie sind durch eine aufwendige hygienische Barriere geschützt. Alle Versorgungsgüter (Luft, Wasser, Futter, Käfige, Einstreu, u.a.) werden zuvor sterilisiert, während das Personal über eine dreistufige Schleuse unter Benutzung einer Luft- oder Wasserdusche den Bereich betreten. Das Personal stellt das größte Risiko im Hinblick auf eine mikrobiologische Kontamination dar.

Alle Besamungsstationen sind als PRRS-unverdächtig zertifiziert. Alle Schweine befinden sich in SPF (spezifiziert pathogenfrei) Haltung. Dabei sind die Tiere frei von bestimmten,

einzeln zu benennenden (spezifizierten) Bakterien, Viren, Parasiten und/oder Pilzen. Bei SPF-Tieren ist die Keimflora also nicht, wie oftmals angenommen, vollständig definiert, sondern es sind lediglich die Erreger benannt, welche in einer Population mit den eingesetzten Methoden nicht nachgewiesen wurden. In dem Gesundheitszeugnis der SPF-Tiere sind diese Befunde aufgeführt. Die Verwendung des Begriffes „SPF“ für einen Tierbestand setzt voraus, dass das Freisein von definierten Erregern und entsprechenden Antikörpern durch regelmäßige Untersuchungen einer ausreichend großen Tierzahl (Stichprobe) im richtigen Alter mit geeigneten Methoden nachgewiesen ist. Die entsprechenden Informationen werden einschließlich des Hygienestatus einer Population in einem Gesundheitszeugnis dokumentiert.

Die Haltung, Fütterung und Pflege der Tiere am Universitätsklinikum Eppendorf wurde von der zentralen Tierzuchthaltung des Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg übernommen.
Die Haltung sowie die Tierversuche und die Tötung entsprachen den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetztes vom 24.07.1972, zuletzt geändert am 15.07.2009. Die Versuche wurden unter der Vorgangsnummer 11/08 vom Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Hamburg mit Schreiben vom 18.6.2008 genehmigt. Außerdem wurden alle Versuche in Übereinstimmung mit der „Position of the American Heart Association on Research Animal Use“ (1985) durchgeführt.

4.2.2 Versuchsablauf

4.2.2.1 Prämedikation

Am Tag des Versuches waren die Schweine seit zwölf Stunden nüchtern und wurden mit einer intramuskulären Injektion in die Nackenmuskulatur sediert. Über diese intramuskuläre Injektion bekamen die Schweine folgende Medikation:

1. Atropin (Atropinsulfat 100 mg® 1 %, Köhler) in einer Dosierung von 0,15 mg/kg KG. Dieses Parasympatholytikum wird in der Prämedikation eingesetzt, um vor vagalen Kreislaufregulationsstörungen und Bradykardie zu schützen. Zudem hemmt es die Speichelsekretion sowie die Bronchialsekretion.
2. Ketamin (Ketamin Gräub [Ketaminhydrochlorid], Albrecht), für das eine Dosierung von 5 mg/kg KG verabreicht wurde. Ketamin ist ein sogenanntes dissoziatives Anästhetikum, welches zu Analgesie, oberflächlichem Schlaf und Katalepsie führt. Es kommt zu keiner Muskelrelaxation. Ein großer Vorteil ist, dass es durch Ketamin nicht zu einer atem- und kreislaufdepressiven Wirkung kommt.

3. Stresnil® der Firma Janssen mit dem Wirkstoff Azaperon (4 mg/kg KG). Es handelt sich hierbei um ein Sedativum für Schweine. Es ist das einzige Neuroleptikum, welches bei Schweinen eine ausreichende Sedation auslöst.
4. Midazolam als Dormicum® der Firma Roche (Roche) mit einer Dosierung von 0,3 mg/kg KG. Midazolam gehört zu den Benzodiazepinen und wirkt somit anxiolytisch, muskelrelaxierend, sedierend, hypnotisch und antikonvulsiv.

Sobald sich das Tier im sedierten Zustand befand, wurde ein intravenöser Zugang gelegt. Hierfür wurde eine Venenverweilkanüle (Braunüle, Vasofix® 1,1 mm, G20, rosa, B.Braun) in eine Ohrvene eingebracht. Die Narkose wurde mit Pentobarbital (Narcoren®, Merial) mit einer Dosierung von 8 mg/kg KG eingeleitet. Pentobarbital gehört zu den klassischen Barbituraten. Es ist das einzige langwirkende Injektionsnarkotikum.

4.2.2.2 Narkose

Während des Versuches wurde die Narkose über einen peripheren intravenösen Zugang aufrechterhalten. Hierfür wurde eine Venenverweilkanüle (Braunüle Vasofix®, 1,3 mm G18, grün, B.Braun) in eine Vene im Flankenbereich des Tieres gelegt. Fentanyl®-Janssen (Janssen) und Dormicum® wurden zusammen als Neuroleptanalgesie eingesetzt. Fentanyl ist ein Opioid, welches 80fach potenter ist als Morphin. Dormicum® ist ein Benzodiazepin und wurde bereits in 4.2.2.1. beschrieben. Die Narkose wurde wie folgt zusammengesetzt: Opioid Fentanyl®-Janssen (0,01 mg/kg KG /h) und Dormicum® (0,1 mg/kg KG/h), die in eine 50 ml Perfusorspritze (BD Discardit™ II, B.Braun) aufgezogen wurde. Mit 0,9 % NaCl-Lösung (Isotone Kochsalz-Lösung, B.Braun®) wurde das Volumen auf 40 ml aufgefüllt. Die Narkose wurde mit einer Geschwindigkeit von 15-25 ml/h in das Tier infundiert.

4.2.2.3 Im OP

Dem sedierten Tier wurde im OP eine Erdungselektrode (3M™ Universalelektrode, 3M Deutschland GmbH, Neuss) für die Nutzung des Elektrocauters (Valleylab Force 40, Pfizer) auf den Rücken geklebt und das Schwein dann an ein EKG Gerät angeschlossen. Hierfür wurden 3 Elektroden (Red Dot ™; 3M Deutschland GmbH) auf das Tier aufgebracht (links und rechts parasternal; rechts ~20 cm weiter kaudal in der Axillarlinie), um so den Herzschlag über einen Monitor (Transcope 12® Marquette Electronics Inc) kontrollieren zu können.

Alle chirurgischen Schnitte in der Haut und Unterhaut wurden mit einem Elektrocauter (Valleylab Force 40, Pfizer) durchgeführt.

4.2.2.4 Intubation

Nachdem der Herzschlag stabil war, wurde das Tier intubiert. Hierfür wurde das Schwein in Rückenlage fixiert und mit Hilfe des Elektrocauters ein circa 10 cm langer Hautschnitt unterhalb des Kehlkopfes nach kaudal gesetzt. Die weitere Präparation bis zur Trachea erfolgte stumpf. Mit einer spitzen Schere wurde ein Schnitt zwischen zwei Knorpelspangen kurz unterhalb des Kehlkopfs durchgeführt, durch den ein Tubus in die Trachea vorgeschoben und anschließend geblockt und fixiert wurde.

4.2.2.5 Beatmung

Die Beatmung erfolgte durch den Tubus, welcher durch einen flexiblen Beatmungsschlauch mit dem Beatmungsgerät (Puritan® Bennett 7200 series, ventilatory system, Covidien-Nellcor™ and Puritan Bennett™) verbunden war. Zwischen Tubus und Beatmungsschlauch waren ein Filter und ein Vernebler (Cirrus® in-line Vernebler Set 22 mm, Intersurgical) zwischengeschaltet, über den später eine Acetylcystein (ACC; ACC® injekt 300 mg/3 ml Hexal) Vernebelung vorgenommen wurde.

Das Beatmungsprotokoll sah wie folgt aus (Tab. 5):

FiO2	50%
Atemfrequenz (AF)	16/min
PEEP	7cm H2O
E:I	1:1

Tab. 5: Beatmungsprotokoll in der Aspiration
(FiO2: inspiratorische Sauerstoff-Fraktion;
PEEP:positiver endexspiratorischer Druck;
E:I: Exspiration im Verhältnis zur Inspiration)

Die Beatmung erfolgte druckkontrolliert mit einem maximalen Inspirationsdruck von PEEP + 15 cm H_20; das Atemminutenvolumen wurde über die Atemfrequenz so adjustiert, dass physiologische Werte im arteriellen Blutgas hinsichtlich pH, pO_2 und pCO_2 im Spendertier erreicht wurden. Diese Werte wurden dann als Zielvorgabe für die Beatmung während der *ex-vivo* Zirkulation übernommen. Das Atemhubvolumen AHV sowie P_{max} (maximaler Inspirationsdruck) und P_{min} (minimaler Inspirationsdruck) wurden nach Protokoll regelmäßig kontrolliert und protokolliert.

4.2.2.6 Venenverweilkanülen

Beidseitig wurden in eine Vene der Leistengegend Braunülen (Braunüle Vasofix®, 1,3 mm G18, grün, B.Braun) geschoben. Über diese venösen Zugänge konnte bei Bedarf Pentobarbital (Narcoren®) gegeben werden. Zudem waren an beide Braunülen während der gesamten Operation Infusionen angeschlossen, zum einen 0,9 % Natrium-Chlorid Lösung (B. Braun) und zum anderen Ringer Infusionslösung (B. Braun). Zu Beginn des Versuches wurde über einen dieser Zugänge 300 IE/kg KG Heparin (Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10000 I.E./ml Injektionslösung, B. Braun) appliziert.

4.2.2.7 Katheterisierung

Zur Erhebung von Messwerten wurden verschiedene Katheter gelegt. Über den Schnitt der Intubation erfolgte eine stumpfe Präparation der *Arteria carotis communis* und der *Vena jugularis interna*. Daraufhin wurde die Arterie mit einem Overhold untertunnelt und eine Ligatur (Ethicon® 2-0) weit cranial um die Arterie gelegt, ohne diese vorerst fest zu verschließen. Einige Zentimeter weiter kaudal von der ersten Ligatur wurde eine weitere Ligatur doppelt um die *Arteria carotis communis* geschlungen. Nun wurde die craniale Ligatur fest zugeknüpft. Mit Hilfe einer Pinzette wurde das Gefäß in Höhe der kaudal liegenden Ligatur abgeklemmt, damit zwischen den Ligaturen die Arterie einige Milimeter lang eingeschnitten werden konnte. Durch diesen Einschnitt wurde eine 6 F arterielle Schleuse (11 cm Einführschleuse mit hämostatischem Ventil und Sideport und 18 G Einführungskanüle; B.Braun) gelegt und nach kaudal eingeführt (Abb. 1). Mit der kaudalen Ligatur konnte nun die Schleuse im Gefäß fixiert werden. Durch dieselbe Vorgehensweise wurde an der Vene eine 8F venöse Schleuse (Intradyn, 11,5 cm Einführschleuse mit hämostatischem Ventil und Sideport; 18 G Einführungskanüle; B.Braun) gelegt. Über den venösen Katheter wurde ein Swan-Ganz-Kathether (PV 2047 VoLEF Catheter 7 F, Pulmonary artery thermodilution right ventricular ejection fraction catheter, Pulsion Medical Systems) eingeschwemmt. Dieser war mit einem Dreifachdruckmesssystem (DPS, medex medical Ltd®) verbunden, welches sich auf Herzhöhe befinden muss und dann auf Null geeicht wird. Zudem war das System mit einem Monitor verbunden, über den es möglich war, die Kurvenverläufe zu beobachten.

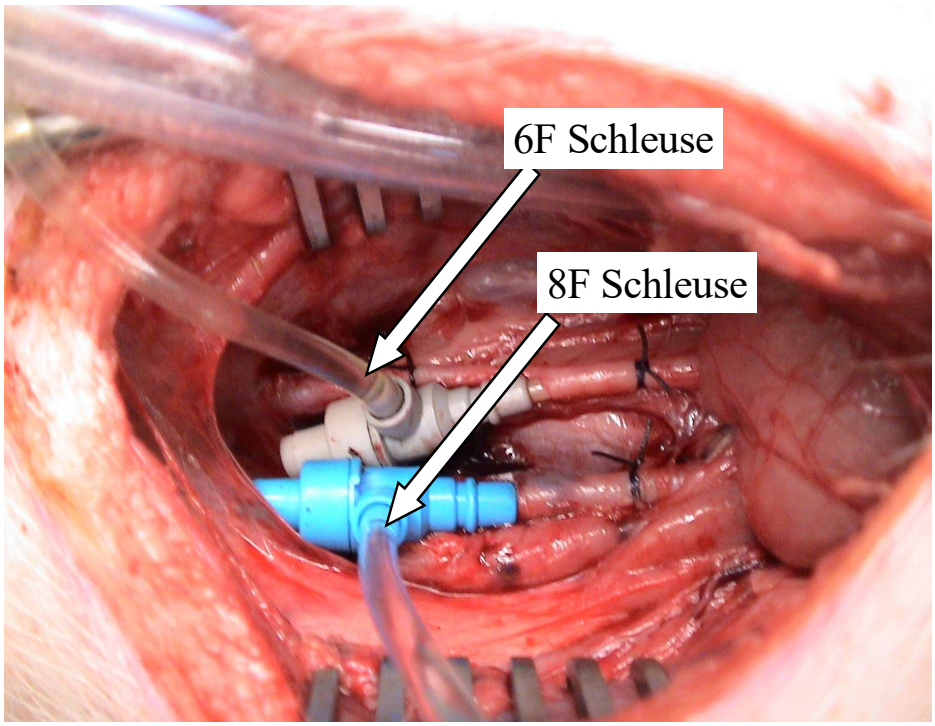


Abb. 1 : Präparation der 6F arteriellen Schleuse und 8F venösen Schleuse *Die 6F Schleuse wird in die Arteria carotis communis gelegt, um den arteriellen Blutdruck zu erfassen; die 8F Schleuse wird in die Vena jugularis interna gelegt, um den pulmonalen Verschlussdruck, den pulmonal arteriellen Druck, den zentralvenösen Druck und das Herz-Zeit-Volumen zu protokollieren.* (Quelle: A. Störmer)

Der Katheter wurde nun vorsichtig vorgeschoben. Auf Höhe der *Vena cava superior* wurde der endständige Ballon des Katheters aufgeblasen. Der Katheter wurde weiter über den Vorhof und die rechte Herzkammer bis in einen Ast der Pulmonalarterie geschoben, welche durch den Ballon verschlossen wird. Das distale Lumen des Katheters lag nun im Ast der Pulmonalarterie und mit dem proximalen Lumen im rechten Vorhof. Nun wurde der Ballon entblockt. Über den Swan-Ganz-Katheter war es so möglich, verschiedene Drücke zu protokollieren. Bläst man den Ballon auf, kann man den sogenannten pulmonal kapillaren Verschlussdruck (PCWP), auch wedge-Druck genannt, messen. Dieser entspricht dem Druck im linken Vorhof (LAP). Den zentralvenösen Druck (ZVD) erhält man, indem man das Druckmesssystem an den proximalen Schenkel des Katheters anlegt. Dadurch wird der Druck im rechten Vorhof messbar.

Insgesamt wurden so mit Hilfe des Katheters der pulmonalarteriellen Druck (PAP), der zentralvenösen Druck (ZVD), das Herz-Zeit-Volumen (HZV) und der pulmonalkapillare

Verschlussdruck (PCWP) und somit auch indirekt der Druck des linken Vorhofes (LAP) kontrolliert. Der systemische Gefäßwiderstand (SVR) sowie der pulmonale Gefäßwiderstand (PVR) können berechnet werden (Abb. 2a-d).

Die arterielle Schleuse in der *Arteria carotis communis* war ebenfalls mit dem Druckmesssystem verbunden, wodurch das EKG synchronisiert wurde und die arteriellen Blutdruckkurven auf dem Monitor gesichert waren. Um weitere kritische Daten zu erfassen, wurde an den Sideport der Schleuse ein Injektattemperatursensor angeschlossen, der mit einem Picco plus® (Pulsion Medical Systems, München) Gerät verbunden war.

Ein Picco Katheter wurde in die Femoralarterie gelegt. Die Präparation der Arterie erfolgte analog zu den Präparationen an den Halsgefäßen. Dieser Katheter war ebenfalls mit dem Picco Plus® Gerät (Pulsion Medical Systems AG, München) verbunden. Zudem war über einen Einwegdruckaufnehmer eine Verbindung zu dem oben erwähnten Dreifachdruckmesssystem gewährleistet. Über den Injektattemperatursensor wurde das Picco Plus Gerät geeicht. Hierzu wurden 20 ml kalte Natriumchloridlösung schnell in die Schleuse der Carotis gespritzt. Das Gerät misst die Zeit, in der die kalte Natriumchloridlösung von der Carotis bis in die Femoralarterie gelangt.

Durch Messung des Blutflusses in einem bestimmten Zeitintervall konnte so die Auswurfleistung des Herzens gemessen werden, das sogenannte Herzzeitvolumen (HZV). Außerdem wurden durch das Picco Plus Gerät noch die Herzfrequenz, der arterielle Blutdruck, der zentralnervöse Druck und der systemische Gefäßwiderstand (SVR) erfasst. Somit konnten die hämodynamischen Parameter während des ganzen Versuches überwacht und gegebenenfalls stabilisiert werden, um standardisierte Versuchungsbedingungen zu gewährleisten. Der Vergleich der erfassten Werte des Picco plus Gerätes und des Swan-Ganz-Katheters schützt vor Messfehlern. Werte, die sich auf beiden Monitoren zeigten, wurden anhand des Swan-Ganz-Katheters protokolliert.

4.2.2.8 Versuchsprotokoll in der Aspiration

4.2.2.8.1 Blutabnahme

Zu den nachfolgend aufgeführten Messzeitpunkten wurde Blut abgenommen, um eine Blutgasanalyse durchzuführen.

Baseline	0 min	30 min	60 min	120 min	180 min

Zur Bestimmung der Blutgase wurde arterielles, venöses und gemischt-venöses Blut entnommen. Weitere Parameter wurden im venösen Blut bestimmt (s.Tab. 6).

Parameter	arteriell	gemischt-venös	venös
Sauerstoffpartialdruck	x	x	x
Kohlendioxidpartialdruck	x	x	x
pH-Wert	-	-	x
Sauerstoffsättigung	-	-	x
Basenüberschuss	-	-	x
Hämoglobin	-	-	x
Bikarbonat	-	-	x
Natrium	-	-	x
Kalium	-	-	x
Calcium	-	-	x
Laktat	-	-	x
Glucose	-	-	x

Tab. 6: Protokoll der Blutgasauswertung

Im Blutgasanalysator (ABL800 FLEX, Radiometer®) wurden Parameter bestimmt, wie sie in Tab. 6 aufgeführt sind.

Das arterielle Blut wurde direkt aus der Carotisschleuse entnommen. Das venöse Blut wurde aus dem proximalen Schenkel des Swan-Ganz-Katheters, welcher im rechten Vorhof lag, entnommen. Für die Entnahme des gemischt-venösen Blutes wurde der Ballon des Swan-Ganz-Katheters geblockt und das Blut aus dem distalen Lumen (im Ast der Pulmonalarterie liegend) gewonnen.

Die Blutabnahme erfolgte mit BGA-Spritzen (Picco50 Arterial Blood Sampler, Radiometer®).

4.2.2.8.2 Berechnung von hämodynamischen Parametern

Die hämodynamischen Parameter werden berechnet wie in den folgenden Abbildungen angegeben:

Pulmonaler Gefäßwiderstand (PVR)

$$PVR = \frac{PAP - LAP}{HZV} \times 80$$

PAP: Druck in der *arteria pulmonalis* in mm Hg

LAP: Druck im linken Atrium in mm Hg

HZV: Herz-Zeit-Volumen in l/min

Der Faktor 80 kommt zustande, weil zur Berechnung des PVR für PAP und LAP Werte genutzt werden, die in mm Hg gemessen werden und ein Wert für den HZV, der in l/min ermittelt wird. Um dabei auf die gewünschte Einheit für den PVR [dyn*s*cm-5] zu kommen, muss man die Dimensionen entsprechend umrechnen:

mit 1 mm Hg = 133,3 N/m² und 1 N = 105 dyn ergibt sich
(nur für die Dimensionen)

$$\frac{133{,}3\ \mathrm{N/m^2}}{\mathrm{l/min}} = \frac{133{,}3 \times 10^5 \mathrm{dyn}/10^5\ \mathrm{cm^2}}{10^3\ \mathrm{cm^3}/60\ \mathrm{s}} =$$

$$133{,}3 \times 10^5\ \mathrm{dyn} \times 60 \frac{\mathrm{s}}{10^7 \mathrm{cm}^{-5}} = 80\ \mathrm{dyn} \times \mathrm{s} \times \mathrm{cm}^{-5}$$

Abb. 2a: Berechnung des PVR

Compliance

$$Compliance = \frac{AHV}{P_{insp.mean}}$$

$P_{insp.mean}$: mittlerer Druck in der Plateauphase in mm Hg

AHV : Atemhubvolumen in ml

Abb. 2b: Berechnung der Compliance

Pulmonaler Oxygenierungsgrad (POC)

$$POC = \frac{Pa_{2} - PvO_2}{FiO_2}$$

PaO_2: arterieller Sauerstoffpartialdruck in mm Hg

PvO_2: venöser Sauerstoffpartialdruck in mm Hg

FiO_2: inspiratorische Sauerstofffraktion (50%)

Abb. 2c: Berechnung des pulmonalen Oxygenierungsgrads (POC)

Systemischer Gefäßwiderstand (SVR)

$$SVR = \frac{MAD - ZVD}{HZV} \times 80$$

ZVD: zentralvenöser Druck in mm Hg

MAD: mittlerer arterieller Druck in mm Hg

HZV: Herz-Zeit-Volumen in l/min

Abb. 2d: Berechnung des systemischen Gefäßwiderstandes (SVR)

4.3 Versuchsgruppen

In einer früheren Studie von Wipper et al. (2009ab) wurden Untersuchungen an Schweinelungen durchgeführt, die für diese Arbeit als Vergleichsgruppen dienen.

In der ersten Versuchsreihe von Wipper wurde mit sechs Schweinen eine Rekonditionierung der mit Magensaft /Blut-Gemisch geschädigten Lungen durchgeführt (Versuchsdaten wurden in dieser Arbeit als Gruppe 1 verwendet).

In der zweiten Versuchsgruppe (Gruppe 2) von Wipper, die aus sieben Tieren bestand, sollten zusätzliche intensivmedizinische Maßnahmen eine weitere Verbesserung der rekonditionierten Lungen bewirken. (Versuchsdaten wurden in dieser Arbeit als Gruppe 2 verwendet).

Gruppe	Anzahl Versuchs-tiere	Aspiration	Intensiv-medizinsche Maßnahmen	Anti-thymozyten-globulin
1	6	ja	nein	nein
2	7	ja	ja	nein
3	7	ja	ja	ja

Tab. 7: Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll (Daten der Gruppen 1 und 2 wurden von Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt und hier mit aufgeführt, um so eine bessere Übersicht über die diskutierten Untersuchungen zu ermöglichen).

Die dritte Versuchsgruppe, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert und untersucht wurde, bestand ebenfalls aus sieben Tieren. In dieser Gruppe (Gruppe 3) wurde nach dem Protokoll der zweiten Gruppe vorgegangen, um eine bessere Vergleichbarkeit sicher zu stellen. Abweichend davon wurde aber zusätzlich Antithymozytenglobulin (ATG Fresenius S®, Fresenius Biotech GmbH, München) eingesetzt, um die postulierte verstärkte Eindämmung von Entzündungsreaktionen zu erreichen und nachzuweisen, das eigentliche Ziel dieser Arbeit.

Die Versuchsprotokolle aller Gruppen sind in Tabelle 7 dargestellt.

4.4 Aspiration

Unter Aspiration versteht man die Aufnahme von körpereigenen Sekreten, wie Speichel oder Mageninhalt, sowie körperfremden festen und flüssigen Substanzen in den Respirationstrakt.

Bei den Versuchen wurde den Schweinen direkt nach der Baseline Messung ein Magensaft/-Blut-Gemisch intratracheal appliziert. Hierzu wurde Magensaft von anderen Schweinen gewonnen. Der Magensaft wurde zentrifugiert und der Überstand in ein Falkonröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert. Der pH Wert wurde mittels eines pH-Meters (pH-Meter CG840, SCHOTT) ermittelt und gegebenenfalls durch Zusatz von HCl reguliert, so dass der Magensaft einen pH-Wert von 2 hatte. Die zu verabreichende Menge wurde wie folgt ermittelt: 0,5 ml Aspirat/kg KG. Der Magensaft wurde mit frisch entnommenem Blut aus der *Arteria carotis communis* in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt. Damit wird eine tatsächliche Aspirationssituation simuliert, in der durch Blutungen bei einem hirntoten Spender eine Vermischung von Magensaft und Blut erfolgt. Durch die Pufferkapazität des Blutes hat das Gemisch einen pH Wert von etwa 6.

Nachdem das Aspirat vorbereitet worden war, wurde der Tubus von der Beatmungsmaschine diskonnektiert und ein Pigtail Katheter (F5 B. Braun) circa 15 cm weit durch den Tubus vorgeschoben, durch welchen das Aspirat zügig injiziert wurde. Um eine bessere Verteilung des Aspirates zu gewährleisten, wurde die Lunge 3-5 mal mit einem Ampubeutel manuell gebläht, und nachdem das Beatmungsgerät wieder angeschlossen war, wurde das Tier von links nach rechts gerollt.

4.5 Sternotomie

Drei Stunden nach der Aspiration wurden die Vorbereitungen zur Explantation getroffen. Es wurde ein medianer Hautschnitt entlang des Sternums gesetzt. Durch stumpfe Präparation wurde das Sternum so präpariert, dass eine Aortenklemme mit einem kleinen Kugeltupfer versehen retrosternal von caudal nach cranial vorgeschoben werden konnte. In die Spitze der Aortenklemme wurde eine circa 30 cm lange Kompresse eingeklemmt. Das Ende der Kompresse in der Aortenklemme wurde nach caudal gezogen, das andere Ende verblieb cranial, so dass die Kompresse retrosternal zu liegen kam. Durch Ziehen an beiden Enden der Kompresse konnte das Sternum während der Sternotomie etwas angehoben werden, um eine Verletzung des Herzens und der Lunge zu verhindern. Eine weitere Maßnahme, um Verlet-

zungen während der Sternotomie zu verhindern, bestand in der kurzeitigen Unterbrechung der Beatmung. Das Sternum wurde mit Hilfe einer oszillierenden Säge median eröffnet. Die Beatmung wurde sofort wieder angeschlossen und der Thorax mit einem Thoraxspreizer weit eröffnet. Das Bindegewebe sowie der Thymus wurden stumpf entfernt. Das Perikard wurde eröffnet und weitestgehend entfernt, um eine bessere Übersicht zu ermöglichen.

4.6 Biopsie

Nachdem der Thorax eröffnet war, wurde bei einigen Versuchen 3,5 Stunden *post aspirationem* jeweils eine Biopsie der Lunge genommen (s. Tab. 8), welche aber nur als Prae-Proben zur Orientierung über den Zustand der Lunge vor der Rekonditionierung Hinweise geben sollten

Ob eine Prae Probe genommen wurde, entschied sich nach der makroskopischen Beurteilung. Nur wenn ein repräsentabler Lappen, d.h. mit Aspiratansammlung zu sehen war, wurde die Biopsie durchgeführt, da ansonsten das Risiko eines Flüssigkeitsverlustes während der Rekonditionierung durch die Biopsiestelle zu groß war.

Schwein	88	89	91	92	93	94	95
Prae-Probe	ja	ja	nein	ja	nein	nein	nein

Tab. 8: Zuordnung der Prae-Proben der Gruppe 3 zu den Versuchstieren
Bei drei Versuchstieren wurde eine Biopsie 3,5 h post aspirationem entnommen.

Zunächst wurde durch das Durchtrennen der tiefen *Ligamentae pulmonale* die unteren Lungenlappen mobilisiert, um sie besser beurteilen zu können. Aus einem Lungenlappen, der makroskopisch geeignet schien, da er besonders viel des Aspirats enthielt, wurde ein kleines Stück Lunge (ca. 2 x 2 x 2 cm) entnommen.

Die eröffnete Lokalisation der Lunge wurde anschließend mit einem 5-0 PDSII Faden doppelt zugenäht. Die entnommene Probe wurde unmittelbar in Flüssigstickstoff schockgefroren und danach bis zum Versuchsende in Flüssigstickstoff zwischengelagert. Nach Ende des Versuches wurden die Proben in einem –80 °C Schrank gelagert, bis weitere Untersuchungen erfolgen konnten.

4.7 Präparation zur Explantation

Um eine störungsfreie Explantation gewährleisten zu können, mussten einige Vorbereitungen getroffen werden. Die *Vena cava superior et inferior* wurden jeweils mit einem Overhold untertunnelt und zweimal in einem kleinen Abstand von circa 1cm ligiert (Ethicon® 2-0), um die Gefäße später zwischen diesen Ligaturen durchtrennen zu können. Zunächst wurden die Ligaturen allerdings noch nicht verschlossen. Die *Vena azygos et hemiazygos* wurde auf gleiche Art und Weise ligiert.
Die Aorta wurde nun von der Pulmonalarterie vorsichtig getrennt. Die Pulmonalarterie wurde mit einer Peonklemme fixiert, damit eine klappennahe intramurale Tabaksbeutelnaht (4-0 Prolene) mit einem Radius von etwa 1cm gesetzt werden konnte. Durch diese Naht konnte später die Kanüle zur antegraden Perfusion eingeführt und fixiert werden. Die langen Enden des Fadens wurden durch einen Torniquet gezogen und mit einer Peonklemme fixiert. Die gleiche Präparation erfolgte an der Aorta.

4.8 Blutentnahme und Herstellung eines Erythrozytenkonzentrats

Für die spätere Reperfusion des Herz-Lungen Paketes wurde ein Gemisch aus Erythrozyten-konzentrat und Steen Lösung verwendet. Hierfür musste Vollblut abgenommen werden, das dann in einem Cell Saver (Dideco Compact Advanced Cell Saver, Sorin Group Deutschland GmbH) zum Erythrozytenkonzentrat verarbeitet wurde. In das Zentrum der Tabaksbeutelnaht der Aorta wurde hierfür eine kleine Inzision gesetzt, durch die dann eine Aortenkanüle (DLP® One-Piece Pediatric Arterial Cannulae 16 fr.) eingeschoben wurde. Durch Anziehen der Fadenenden war eine gute Fixierung möglich. So konnte eine große Menge Blut (ca.1,5 l) in einer vorher gereinigten und desinfizierten Nierenschale aufgefangen werden und hieraus über eine Saugvorrichtung in den Cellsaver übertragen werden.

Um einen Schock des Tieres durch die rasche Blutabnahme zu verhindern, wurde währenddessen eine zentralvenöse und periphere Flüssigkeitssubstitution in Form von 6 %igem HES (Voluven®, HES-Steril 6 %, kochsalzfrei mit 5 % Glucose [Poly(0-2-hydroxyethyl) Stärke], Fresenius Kabi) und Ringerlösung (B. Braun) sichergestellt.
So fand eine Hämodilution statt.
Über einen Sauger wurde das entnommene Blut in den Cell Saver geleitet. Dieser diente dazu, aus Vollblut ein Erythrozytenkonzentrat herzustellen. Hierfür wurde das Blut zunächst in einem Reservoir gesammelt. Um eine Blutgerinnung zu vermeiden, werden 500 ml isoto-

nische Natriumchloridlösung (B.Braun), die mit 40.000 IE Heparin (Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10000 I.E./ml) versetzt wurde, an die Absaugvorrichtung angeschlossen, so dass diese vor dem und während des Absaugens mit der Lösung gespült werden konnte. Das Blut wurde dann in einer Glocke bei 5600 x g zentrifugiert und so nach der spezifischen Dichte aufgetrennt. Die Erythrozyten gelangten an den Aussenrand der Glocke und die restlichen Blutbestandteile wurden abzentrifugiert. Nachdem die Glocke gefüllt war, wurde das Blut gewaschen. Hierfür wurden 3000 ml 0,9 % Natriumchloridlösung (Ecobag Click NaCl 0,9 %, B.Braun) an den Cell Saver angeschlossen. Das so entstandene Erythrozytenkonzentrat wurde dann über eine Rollerpumpe in einen Retransfusionsbeutel gefüllt, so dass es zum Befüllen des Reperfusionssystem zur Verfügung stand.

4.9 Perfusion

Nach der Blutabnahme wurden die Vorbereitung zur ante- und retrograden Perfusion mit Perfadex® (Vitrolife, Göteborg, Schweden) Lösung getroffen. Perfadex® ist eine kolloidosmotische Elektrolytlösung, die gepuffert ist und eine niedrige extracelluläre Kaliumkonzentration aufweist. Es ist die einzige Konservierungslösung, die speziell für die Lungentransplantation entwickelt wurde (de Perrot et al. 2004). Die niedrige Kaliumkonzentration ist laut de Perrot et al. (2003) weniger schädlich für die funktionelle und strukturelle Integrität der Endothelzellen, was zu einer geringeren Produktion von Oxidantien und einer verminderten Freisetzung von pulmonalen Vasokonstriktoren führen soll.

Dextran 40 ist ein Makromolekül mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 40000. Dextran verbessert die Erythrozyten Verformbarkeit, verhindert Erythrozytenaggregation und führt zur Disaggregation bereits aggregierter Zellen. Es hat weiter einen antithrombotischen Effekt, der auf der Benetzung von endothelialen Oberflächen und Plättchen beruht. Diese Effekte verbessern die pulmonare Mikrozirkulation und schützen die endotheliale-epitheliale Barriere, die als Sekundäreffekt das *no-reflow* Phänomen verhindern und das Ausmaß der Wasser- und Proteinextravasation während der Reperfusion reduzieren könnte (de Perrot et al. 2003). Zudem führt eine zusätzlich zur antegraden Perfusion durchgeführte retrograde Perfusion mit Perfadex® zu einer besseren Funktion des Transplantates (de Perrot et al. 2004).

Zusammensetzung von 1000 ml Perfadex®	
Dextran 40 (MW 40.000)	5 %
K^+	6,0 mmol
Mg^{2+}	0,8 mmol
$H_2PO_4^- + HPO_4^{2-}$	0,8 mmol
Glucose	5,0 mmol

Tab. 9: Zusammensetzung Perfadex®

Die Perfadex® Lösung hat einen pH- Wert von 5,5. Um diesen auf den physiologischen pH-Wert von 7,4 zu erhöhen, ist es notwendig, vor der Perfusion 1 mmol Trometamol zuzugeben. 0,6 ml Tris 36,34 % (B. Braun Melsungen AG) entsprechen 1 mmol Trometamol und wurden kurz vor der Perfusion zu je 1000 ml Perfadex® Lösung hinzugegeben. Zusätzlich wurde in jeden 1000 ml Beutel Perfadex 1,2 mg Glyceroltrinitrat in Form von Nitrolingual® infus (Pohl Boskamp) (1,2 ml) gegeben. Dieses bewirkt eine Vasodilatation, wodurch die Durchblutung und somit auch die Sauerstoffversorgung verbessert werden. Zuletzt wurde dann noch ATG (200 mg in 1000 ml Perfadex®) zugefügt. Insgesamt wurden zwei Beutel á 1000 ml Perfadex® auf diese Weise vorbereitet und an eine Perfusionsleitung (HTK-Perfusions-Set double line MEDDEV 2x 1/16 1x ¼) angeschlossen. Die vorbereitete Perfusion wurde entlüftet, um das Risiko einer Lungenembolie zu vermeiden.

4.9.1 Antegrade Perfusion

Um die antegrade Perfusion durchführen zu können, mussten noch einige chirurgische Maßnahmen vorgenommen werden. Mit Hilfe eines Stichskalpells wurde in das Zentrum der Tabaksbeutelnaht der Pulmonalarterie eine kreuzförmige Inzisur gesetzt und eine Aortenkanüle (DLP® One-Piece Pediatric Arterial Cannulae 16 fr.) hineingeschoben. Durch Anziehen der Tabaksbeutelnaht konnte die Kanüle fixiert werden. Eine weitere Stichinzision wurde im rechten Herzohr gesetzt, damit hier die Perfusionslösung ihren Ausgang fand. Das Ende des Perfusionsschlauches konnte nun an die Kanüle konnektiert werden. Um die Peripherie vom Herz-Lungen Paket abzutrennen, wurde die *Vena cava superior et inferior* und die *Vena azygos et hemiazygos* durch vorbereitete Ligaturen verschlossen. Mittels einer Aorten-

klemme wurde die Aorta verschlossen. Mit einer Satinskiklemme wurde der *Sinus coronarius* verschlossen. Zu Beginn der Perfusion wurde an der linken Herzkammer mit Hilfe des elektrischen Kauters ein Herzflimmern produziert, damit der pulmonalarterielle Druck bei der Abklemmung der Aorta nicht ansteigt. Zudem wurde für eine hypotherme Ischämie Eiswasser in den Thorax gefüllt. Dies bezeichnet man als *Topical Cooling* (TC). Nach Kutschka et al. (2003) soll TC eine zuverlässige Methode sein, um Lungen bis zu 24 Stunden zu konservieren.

Nun konnte die antegrade Perfusion gestartet werden. Die Zeitdauer und Menge der Perfusion wurde protokolliert, ebenso die Zeitpunkte der Verschlüsse der Gefäße, um die Ischämiezeiten zu protokollieren. Die Perfusionslösung wurde so durch die Lunge gespült und trat aus der Inzision im rechten Herzohr aus. Erst als die Lösung klar war, wurde die Perfusion gestoppt.

Schwein	Ischämiezeit
88	1 Stunde 45 Minuten
89	1 Stunde 50 Minuten
91	1 Stunde 32 Minuten
92	1 Stunde 36 Minuten
93	1 Stunde 28 Minuten
94	1 Stunde 41 Minuten
95	1 Stunde 7 Minuten

Tab.10: Ischämiezeiten der Gruppe 3

In allen Versuchen zur Gruppe 3 betrug die Ischämiezeit im Mittel 90 Minuten.

4.9.2 Explantation

Nach erfolgter Perfusion wurden die *Vena cava superior et inferior* zwischen den vorher gelegten Ligaturen durchtrennt. Um die Lunge zu schützen, wurde zunächst der rechte Lungenflügel mit einem feuchten Bauchtuch abgedeckt und vorsichtig nach ventral und links gedrückt, damit der Blick auf den Ösophagus möglich war. Nun wurde auf der rechten Seite die Pleura und das Mediastinum retroperitoneal von kaudal nach kranial abpräpariert und die *Vena azygos* wurde zwischen den bereits gesetzten Ligaturen durchtrennt. Das feuchte

Bauchtuch wurde dann um die linke Lungenhälfte geschlagen und diese nach ventral und rechts geschoben, um den Blick in die linke Thoraxhälfte zu gewährleisten. Hier wurden ebenfalls die Pleura und das Mediastinum abpräpariert und die *Vena hemiazygos* zwischen ihren Ligaturen durchtrennt. Verbleibendes mediastinales Gewebe am Herz-Lungenblock wurde vorsichtig entfernt. Der Herz-Lungenblock wurde kaudal mobilisiert und der kutane Schnitt nach kranial bis an den Schnitt der Tracheotomie verlängert. Die Kopfgefäße wurden von der Aorta abgetrennt und die Aorta selber kaudal des Aortenbogens abgesetzt. Die Trachea wurde durch stumpfe Präparation bis zum Tubus dargestellt. Nun konnte das Herz-Lungen-Paket vollständig aus dem Thorax entnommen werden. Um entstandene Atelektasen zu entfernen, wurde die Lunge eine Zeitlang mit einem Peep von 10 cm H_2O und einem Inspirationsdruck von 15 mmHg gebläht. In maximaler Inspiration wurde der Tubus mit einer Maschinenklemme abgeklemmt und die Lunge von der Beatmung diskonnektiert. Zur weiteren Präparation wurde die Lunge nun in einer Edelstahlschale, die mit 0-2 °C kalter 0,9 % Natriumchloridlösung (B.Braun) gefüllt war, gelagert. Somit wurde die Ischämiephase, welche sich aus der Differenz der Zeit der Abklemmung der Aorta bei der Explantation und dem Start der Reperfusion errechnet, aufrechterhalten. Weitere Präparationsschritte waren für die Reperfusion nötig.

4.9.3 Retrograde Perfusion

Zunächst wurde aber eine retrograde Perfusion durchgeführt. Hierfür wurde die Aortenkanüle aus der Pulmonalarterie entfernt und in die Inzision im rechten Vorhof geschoben. Die Perfusion wurde erneut mit den auf gleiche Art und Weise wie bei der antegraden Perfusion vorbereiteten Perfadex® Lösungen gestartet und Zeit und Menge protokolliert. Die Flüssigkeit konnte über die Inzision in der Pulmonalarterie abfließen. Dies wurde ebenfalls so lange durchgeführt, bis die abfließende Flüssigkeit klar wurde.

4.10 Chirurgische Maßnahmen für die Integration der Lungen in das Reperfusionssystem

Zunächst wurden die Bronchialarterien, die direkt von der Aorta abgehen, ligiert, um einen Blutverlust zu verhindern. Die Aorta wurde von der Pulmonalarterie abgetrennt und dann am aufsteigenden Ast kurz abgesetzt. Nun wurden die Koronararterien mit Hilfe eines Overholds aufgespürt. Hierfür wurde der schmale Overhold durch die Aorta in die Ostien eingeführt, so dass man die Koronararterien leichter aufspüren konnte. Das Gewebe um die Koronararterien

wurde kurz nach dem Abgang aus der Aorta mit dem Overhold freipräpariert, so dass beide Koronararterien mit einem 2-0 Vicryl Faden ligiert werden konnten. Nun wurde die Aorta verschlossen. Mit einem 4-0 Prolene Faden wurde erst eine fortlaufende Matratzennaht durchgeführt. Die zweite Nahtreihe wurde mit einer rückläufigen Matratzennaht ausgeführt. Die V*ena cava superior et inferior* wurden daraufhin mit einem 2-0 Vicryl Faden quer abgebunden. Um weitere Blutungsquellen auszuschliessen, wurde die für die Perfusion gesetzte Inzision im linken Atrium mit einem 4-0 Prolene Faden und doppelt fortlaufender Matratzennaht verschlossen. Auch die *Vena cavae superior et inferior* wurden mit einer zusätzlichen Ligatur (2-0 Vicryl®) verschlossen.

Für die Integration in das Reperfusionssystem war es nötig, zwei Kanülen und zwei Messkatheter in das Herz zu legen. Hierfür wurde im linken Ventrikel eine intramurale Tabaksbeutelnaht mit einem 3-0 Prolene Faden gelegt, dessen Durchmesser circa 2 cm betrug. Mit Hilfe eines Stichskalpells wurde im Zentrum das Myokard durchstochen und diese Inzision mit einem Overhold gespreizt, so dass eine 32 F Kanüle (Medtronic DLP®) durch die Inzision in das linke Atrium (LA) vorgeschoben werden konnte. Die Tabaksbeutelnaht wurde angezogen und die Kanüle mehrmals mit dem Faden umschlungen, um diese zu fixieren. Auf die gleiche Weise wurde der rechte Ventrikel präpariert und hier ebenfalls eine 32 F Kanüle bis in die Pulmonalarterie vorgeschoben und fixiert. Zudem wurde die Kanüle extern durch ein Tubusband, das um die Pulmonalarterie gebunden wurde, fixiert.

Für die Perfusion wurde die Pulmonalarterie bereits inzisiert. In diese Inzision wurde mit einem 3-0 Prolene Faden eine Tabaksbeutelnaht gelegt. In die Inzision konnte nun ein LA-Katheter (Druckmesskatheter, Manquet® cardiopulmonary Pressure Monitoring Catheter 3,6 FR 1,2 mm) vorgeschoben werden. Dieser diente dazu, den Anschluss an das Dreifachdruckmesssystem (DPS, medex medical Ltd.®) herzustellen, um so den pulmonalarteriellen Druck messen zu können. Durch Anziehen der Tabaksbeutelnaht und mehrmaligem Umschlingen des Katheters mit dem Faden wurde dieser fixiert. Eine letzte Tabaksbeutelnaht wurde intramural mit einem Durchmesser von etwa 1 cm in die Wand des linken Atriums gelegt. Auch hier wurde ein Druckmesskatheter (Manquet® cardiopulmonary Pressure Monitoring Catheter 3,6 FR 1,2 mm) eingeführt. Dieser hatte am Ende seines Führungsdrahtes eine Stechkanüle, mit dessen Hilfe das Zentrum der Tabaksbeutelnaht punktiert wurde, und der Katheter vorgeschoben wurde. Auch hier erfolgte die Fixierung des Katheters durch die Tabaksbeutelnaht.

4.11 Reperfusion

4.11.1 Vorbereitung des Reperfusionssystems

Das verwendete Reperfusionssystem (Abb. 3) wurde bereits in früheren Versuchen etabliert (Wipper et al. 2008b). Es besteht aus einem Plexiglaskasten, der etwa 20 cm vom Boden entfernt einen zweiten Boden hat, auf den das Herz-Lungen-Paket gelegt wird (Abb. 4, 5).

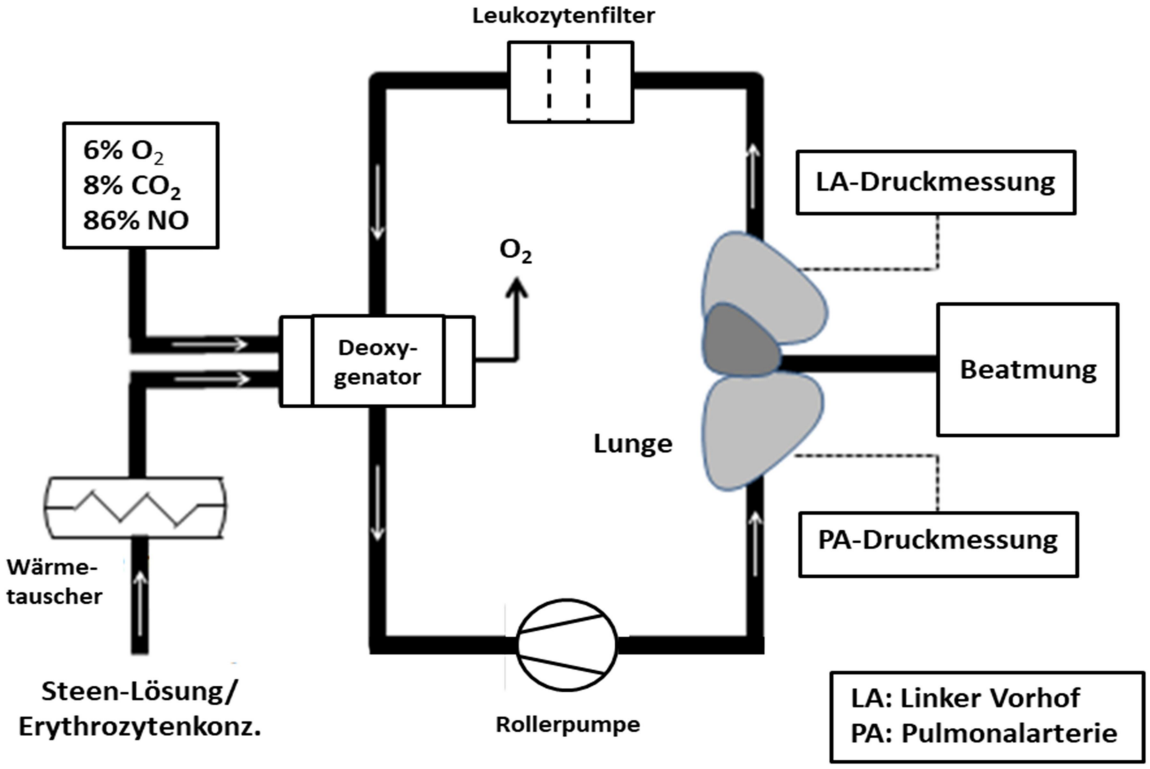


Abb. 3: Reperfusionssystem, schematisch (nach Wipper, Privatmitteilung)

Dieser zweite Boden ist so geformt, dass er der Form des Organpaketes angepasst ist, um eine möglichst gleichmäßige Druckverteilung zu erzielen. Ein Deckel verhindert einen Feuchtigkeitsverlust der Lungenoberfläche. Eine vordere kleine Öffnung, kranial des Herz-Lungen-Paketes, erlaubt, dass der Tubus mit dem externen Beatmungsgerät verbunden sein kann. Zwei untere Öffnungen, kaudal des Organs, sind vorhanden, um die 32F Kanülen mit der Herz-Lungenmaschine zu verbinden. Die Herz-Lungenmaschine besitzt ein Reservoir, das vor Beginn der Reperfusion mit einem Gemisch aus Erythrozytenkonzentrat und Steen Lösung (Steen Solution™, Vitrolife, Götheburg, Schweden) befüllt wurde. Durch die Steen Lösung kann die Lungenfunktion bei 37 °C für mindestens zwei Stunden ohne Ödembildung

stabilisiert werden. Steen et al. (2007) hatten gezeigt, dass durch die Steen Lösung ödematöse Bereiche während einer *ex vivo* Perfusion dehydriert werden können.

Vor Beginn der Reperfusion wurden 5000 IE Heparin in das Reperfusionssytem eingebracht, so dass eine Blutgerinnung verhindert werden konnte. Die Flüssigkeit wird durch die Heparin beschichtete Schläuche mit Hilfe einer Rollerpumpe (Multiflow Rollerpumpe, STÖCKERT Instrumente GmbH, München) durch den Kreislauf bewegt. Nachdem die Flüssigkeit die Rol-

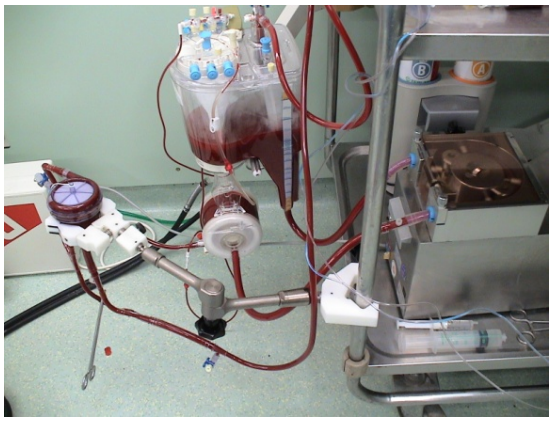


Abb. 4: Reperfusionssystem
(Quelle A. Störmer)

Abb. 5: Lunge während der Reperfusion
(Quelle A. Störmer)

lerpumpe passiert hat, wird sie durch einen Oxygenator (Lilliput, Sorin Group Deutschland, GmbH) geleitet, in dem eine Deoxygenierung des Blutes durchgeführt wird. Hierzu wird an den ursprünglichen Gasanschluss des Oxygenators ein Gasgemisch aus 6 % Sauerstoff, 8 % Kohlendioxid und 86 % Stickstoff angeschlossen. Nun gelangt das deoxygenierte Blutgemisch über die 32F Kanüle in der *Arteria pulmonalis* in die Lunge und über die 32F Kanüle im linken Vorhof wieder aus der Lunge in einen Leukozytenfilter (Pall LeukoGuard™ LG, Terumo Deutschland GmbH, Eschborn), in dem die Leukozyten abgefangen werden. Hiernach gelangt das Blutgemisch erneut in das Reservoir. In die Schläuche, die in die Lunge (PA= Pulmonalarterie) bzw. aus der Lunge (LA= linkes Atrium) führten, wurde jeweils ein Dreiwegehahn zwischengeschaltet. Damit war eine Blutabnahme für Blutgasanalysen des venösen und arteriellen Schenkels gewährleistet.
Damit das Blutgemisch auf Körpertemperatur gebracht werden konnte, war ein Wärmeaustauscher ebenfalls Bestandteil des Kreislaufs.

4.11.1.1 Befüllung des Reperfusionssystems

Bevor das Organpaket in das Reperfusionssystem integriert wurde, mussten alle Leitungen so mit dem Gemisch aus Blut und Steen Lösung gefüllt werden, dass keine Luft in die Lunge gelangen konnte.

Hierfür wurden zunächst die beiden Schläuche, die später in bzw. aus der Lunge führen (PA- und LA-Schlauch), miteinander verbunden. Zunächst wurde der Leukozytenfilter aus dem Kreislauf mit Hilfe von zwei Maschinenklemmen ausgeschlossen, da der Leukozytenfilter eine Halbwertszeit von 6 Stunden hat und daher erst zu Reperfusionsbeginn befüllt wurde. Durch zwei Y-Konnektoren und ein kurzes Schlauchstück konnte ein Bypass geschaffen werden, der an dem Leukozytenfilter vorbeiführt. Der Ausgang des Reservoirs wurde ebenfalls mit einer Maschinenklemme verschlossen. Das Reservoir wurde zunächst mit 1 l Steen Lösung und circa 500 ml des im Cell Saver hergestellten Erythrozytenkonzentrates befüllt. Die Rollerpumpe wurde bei langsamem Fluss 0,5 l/min angeschaltet und die Maschinenklemme vom Ausgang des Reservoirs gelöst. Nachdem alle Schläuche mit Flüssigkeit befüllt waren, wurde kurz vor Beginn der Reperfusion nun auch der Leukozytenfilter retrograd befüllt, indem die Maschinenklemme vom unteren Ende des Leukozytenfilters an den Schlauch, der am Filter vorbeiführt, umgesetzt wurde. Nachdem der Filter vollständig gefüllt war, konnte die Luft über einen Dreiwegehahn am oberen Pol des Filters über eine 50 ml Perfusorspritze (B.Braun) abgezogen werden, bis der Filter luftleer war. Nun wurde auch die obere Klemme abgenommen. Während der Reperfusion verschloss die ganze Zeit eine Maschinenklemme den alternativen Weg am Filter vorbei. Die große Menge an Flüssigkeit, mindestens 1 l im Reservoir, sollte ein Ansaugen von Luft im Falle eines Leerlaufes verhindern. Der Hämoglobinwert im System sollte zwischen 3 und 5 mg/dl liegen. Dieses wurde über eine Blutgasanalyse kontrolliert und durch Zugabe von Erythrozytenkonzentrat bzw. Steen Lösung korrigiert.

Der pH-Wert wurde ebenfalls kontrolliert und im Falle einer Azidose mit Natriumbicarbonat (Natrium-Bikarbonat 7,5 %, Gibco®) ausgeglichen, so dass der pH-Wert immer im physiologischen Bereich (7,35-7,45) lag.

Der Wärmeaustauscher wurde mit kaltem Leitungswasser befüllt, welches zunächst kontrolliert auf 21°C erwärmt wurde.

4.11.1.2 Integration des Organblocks in das Reperfusionssystem

Sobald das Reperfusionssystem fertig vorbereitet war und das Herz-Lungen Präparat erfolgreich präpariert war, konnte der Organblock an das Reperfusionsmodell angeschlossen werden. Zunächst wurde der Organblock auf den zweiten Boden des Plexiglaskastens

gebettet. Der PA und der LA Schlauch wurden mit je einer Maschinenklemme abgeklemmt und die Verbindung zwischen diesen Schläuchen getrennt. Zu dieser Zeit lief die Rollerpumpe nicht. Die Rollerpumpe wurde langsam gestartet (0,05 l/min) und die Maschinenklemme des PA Schlauches vorsichtig gelöst, so dass die Flüssigkeit bis ans Ende des Schlauches gelangen konnte und dieser luftleer war. Nun wurde die Kanüle aus dem rechten Ventrikel mit dem Schlauch verbunden. Die Rollerpumpe transportierte die Flüssigkeit langsam durch die Lunge, bis sie aus der Kanüle des linken Ventrikels austrat. Es wurden ca. 150 ml der Flüssigkeit mit Hilfe einer Nierenschale aufgefangen, um Restblut mit Radikalen auszuschwemmen. Anschließend wurde der LA Schlauch ebenfalls mit der Kanüle verbunden.
Der Fluss wurde nun zum Reperfusionsstart auf 0,1 l/min erhöht. Die beiden Druckmesskatheter wurden an das Dreifachdruckmesssystem (DPS, medex medical Ltd.®) mittels Druckmessleitungen angeschlossen, welches schon *in vivo* verwendet wurde. So konnten die Werte pulmonalarterieller Druck und der Druck im linken Atrium auch jetzt über den angeschlossenen Monitor (Transcope 12® Marquette Electronics Inc.) verfolgt werden. Das Dreifachdruckmesssystem musste auch jetzt auf Herzhöhe eingestellt werden.

Alle zwei Minuten wurde die Temperatur des Wärmeaustauschers um 1 °C erhöht, bis eine Temperatur von 37 °C erreicht war. Der Fluss wurde in dieser Zeit ebenfalls erhöht, nach 30 min auf 1 l/min und nach 60 min auf 1,5 l/min.
Bei einer Temperatur von 32 °C wurde die Lunge an das Beatmungssystem angeschlossen (PEEP: 7 cm H_2O, AF: 16/min). Ab dem 180 Minuten Wert bis zum Ende des Versuches wurde der PEEP jeweils 10 Minuten vor den Messzeitpunkten auf 10 cm H_2O erhöht.

4.12 Intensivmedizinische Massnahmen

Urbason

Direkt zu Versuchsbeginn, nachdem die Schweine intubiert wurden, bekamen sie 500 mg Urbason (Urbason solubile forte 1000 mg, Sanofi-Aventis, Frankfurt) *intra venös* durch eine der peripher gelegten Venenverweilkanülen. Urbason ist ein Methylprednisolon. Methylprednisolon hat eine etwa viermal stärkere glukokortikoide Wirkung als Cortison. Es wirkt entzündungshemmend und abschwellend und ist zudem schmerzlindernd. Weitere 500 mg wurden zu Beginn der Reperfusion in das System appliziert.

Antibiotika

Nach der Aspiration wurden den Schweinen zwei verschiedene Antibiotika verabreicht. Zum einen 1,5 g Cefuroxim (Cefuroxim Fresenius 1500mg, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) und zum anderen 500 mg Metronidazol (Metronidazol Fresenius Infusionslösung, 500 mg/100 ml, Fresenius Kabi Deutschland GmbH). Beide Medikamente wurden als Kurzzeitinfusion über die peripheren Venenverweilkanülen appliziert.
Cefuroxim ist ein Cephalosporin der zweiten Generation. Die antibiotische Wirkung wird durch die Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese über die Störung des Peptidoglycanaufbaus erzielt. Es hat eine gute Wirkung auf den Atemtrakt.

Metronidazol ist der Hauptvertreter der Nitroimidazole. Es wirkt bakterizid auf Anaerobier und Protozoen, indem es zum DNA-Bruch bei den Bakterien führt.

In das befüllte Reperfusionsmodell wurden vor Beginn der Reperfusion noch einmal 250 mg Metronidazol und 1,5 g Cefuroxim eingespeist. Weitere 250 mg Meronidazol wurden nach 180 Minuten hinzugegeben.

ACC Vernebelung

In vivo wurde vier Stunden nach der Aspiration eine ACC Vernebelung gestartet. Es wurden zweimal 2 ml ACC (ACC® Injekt 300mg/3ml [Acetylcystein] Hexal AG) innerhalb von 30 Minuten vernebelt. Hierfür verfügt das Beatmungsgerät über eine Funktion zur Medikamentenvernebelung, welche manuell aktiviert werden kann. Während der Reperfusion wurde nach dem Beatmungsbeginn alle zwei Stunden auf die gleiche Art und Weise erneut jeweils 4 ml ACC vernebelt. Acetylcystein bewirkt eine Sekretolyse, wodurch der Schleim in den Atemwegen gelöst wird und somit abgesaugt werden kann.

Glyceroltrinitrat (Nitrolingual® infus)

Glyceroltrinitrat (Nitrolingual®infus, G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG, Hohenlockstedt) wurde zu Beginn der Reperfusion über einen Perfusor (Perfusor®fm, B.Braun Melsungen AG) verabreicht. Hierzu wurden 50 ml Nitrolingual in eine Perfusorspritze aufgezogen, was bei einer Konzentration von 1 mg/ml 50 mg Glyceroltrinitrat entspricht und die Spritze in den Perfusor eingespannt. Die Verbindung zum Organpaket erfolgte über eine Infusionsleitung, die über einen Dreiwegehahn (Discofix® B.Braun Melsungen AG) mit der pulmonalarteriellen 32F Kanüle (Medtronic DLP 32FR Kanüle) verbunden war. Das Glyceroltrinitrat

wurde bis zum Beatmungsbeginn, das einem Zeitintervall von 30 Minuten entspricht, mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/h direkt in die Pulmonalarterie appliziert. Insgesamt wurde also eine Menge von 5 mg Glyceroltrinitrat infundiert. Dieses wirkt als Vasodilatator, wodurch es zu einer Erweiterung der Gefäße und somit zu einer verbesserten Sauerstoffzufuhr kommt.

NO-Beatmung

Ab dem 240 Minuten Wert *in vivo,* also noch im Spendertier*,* wurde eine Beatmung mit Stickstoffmonoxid angeschlossen. Die NO-Inhalation wurde mit einem Fluss von 15-20 ppm für 60 min durchgeführt. Auch während der Reperfusion wurde mit Beginn der Beatmung eine Stickstoffmonoxid-Beatmung ebenfalls mit 15-20 ppm über die gesamte Reperfusionszeit angeschlossen. Stickstoffmonoxid hat eine dilatative Wirkung auf die Blutgefäße der Lunge; es kann somit einem erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand entgegenwirken.

4.13 Antithymozytenglobulin

In der Gruppe 3 wurde zusätzlich Antithymocytenglobulin (ATG Fresenius S®, Fresenius Biotech GmbH, München) eingesetzt. Bei Gruppe 3 wurde ATG jeweils in 3 Gaben zugeführt. Die erste Gabe erfolgte 240 Minuten nach Aspiration. Es wurden 200 mg ATG in 500 ml 6 % HES als Kurzinfusion über 30 min intravenös verabreicht.
Die zweite Applikation erfolgte während der antegraden als auch der retrograden Perfusion, indem die hierfür genutzte Perfadex® Lösung zuvor mit 200 mg ATG pro 1000 ml Perfadex® versehen wurde.
Die dritte Applizierung erfolgte in der Reperfusion. 100 mg ATG wurden, nachdem das Reperfusionssystem befüllt worden war, hinzugegeben. Weitere 100 mg wurden nach 180 Minuten über den LA Schenkel in das Modell gespeist.

4.14 Protokoll in der Reperfusion

Auch während der Reperfusion konnte zu den gleichen Zeitpunkten wie *in vivo* über die Druckmesskatheter der pulmonalarterielle Druck und der Druck im linken Atrium gemessen werden. Zudem gab der Fluss der Rollerpumpe das HZV an.
Der PVR und die Compliance wurden aus den Messdaten berechnet.

Das Beatmungsprotokoll entsprach dem in der Aspiration (s. Tab. 5). Allerdings wurde zum Zeitpunkt 180, 240, 300 und 360 min eine Rekrutierung durchgeführt. Hierzu wurde der PEEP kurzzeitig auf 10 cm H_2O eingestellt. Das Atemhubvolumen sowie P_{max} (maximaler Inspirationsdruck) und P_{min} (minimaler Inspirationsdruck) wurden wie in der Aspiration regelmäßig kontrolliert und protokolliert.

Die Blutuntersuchungen wurden entsprechend der Blutuntersuchungen in der Aspiration durchgeführt (s. Tab. 6).

Zusätzlich wurde während der Reperfusion zu den Messzeitpunkten eine makroskopische Beurteilung der Lungen vorgenommen. Der dafür verwendete Parameter (PDI= Pulmonary Deflation Index) wurde von unserer Forschungsgruppe in früheren Versuchen etabliert

Grad	1	2	3	4	5
Ödem	kein	interstitiell, ein Lappen	interstitiell, mehrere Lappen	intraalveolär	Regurgitation durch die Trachea
Kollabierung	vollständig	vollständig	vollständig	inkomplett	keine

Tab. 11: Lungenbewertung nach pulmonalem Deflationsindex (PDI)
Die Lunge wurde makroskopisch nach Zustand von Ödem und Kollabierung beurteilt und in PDI-Grade eingeteilt.

(Wipper et al. 2010ab). Hierbei handelt es sich um ein Bewertungsschema, mit dem makroskopisch der Ödemgehalt der Lunge und die Kollabierungsfähigkeit nach der Diskonnektion der Lunge vom Ventilator beurteilt werden kann. Die Bewertung erfolgt nach einer mehrstufigen Bewertungsskala. Die Lunge wurde zu den definierten Zeitpunkten nach entsprechend der in Tab. 11 dargestellten Bewertungsskala eingestuft.

4.15 Biopsieentnahme

Nach 360 Minuten Reperfusion wurde der Versuch beendet. Die Herz-Lungenmaschine wurde gestoppt.

Um Material für weitere Auswertungen zu gewinnen, wurden aus jedem Lungenlappen Biopsien entnommen. Insgesamt wurden aus jedem Lungenlappen fünf Proben benötigt. Mit einer Präparierschere und einer Pinzette wurde hierfür aus jedem Lungenlappen, d.h. aus dem Linken Ober-, Mittel- und Unterlappen (LOL, LML, LUL) sowie aus dem rechten Ober-, Mittel- und Unterlappen (ROL, RML, RUL), ein großes Stück Lungengewebe entnommen. Die Proben wurden subjektiv nach dem makroskopischen Erscheinungsbild ausgewählt und wie folgt eingeteilt:

1. Kryokonservierungs-Proben

Zwei etwa gleich große Biopsien von circa 2 x 2 x 2 cm wurden in eine kleine Plastikbox gelegt und noch im Operationssaal in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Proben wurden weiter bei – 80 °C gelagert.

2. Histologie

Für die histologische Auswertung wurden die Lungenbiopsien (von jedem Lappen drei repräsentative Areale) mit einer Größe von etwa 1 x 2 x 1 cm entnommen und in mit 4 % Formalin (Roti® -Histofix 4 %, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) gefüllten Falcon-röhrchen (BD Falcon® 50 ml, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) untergebracht.

3. *Wet and Dry Ratio*

Für die Bestimmung des Ödemgehaltes der Lunge wurde das W/D bestimmt. Hierfür wurde ein circa 4 x 3 x 3 cm grosses Lungenstück jeden Lappens entnommen und in einen kleinen Plastikbecher gelegt.

4.16 Labordiagnostik

4.16.1 Methoden zur Bestimmung der Lungenqualität

4.16.1.1 *Wet and Dry Ratio*

Nach der Entnahme der Proben wurden die einzelnen Lungenstücke gewogen. Die Proben wurden dann in einem Wärmeschrank (Julabo BIOTHERM 37) bei 60 °C gelagert und nach 48 Stunden und nach 72 Stunden erneut gewogen. Der Quotient aus dem Ausgangsgewicht und dem 72 Stunden Wert wurde ermittelt. So konnte der relative Wassergehalt und somit der Grad eines Ödems der jeweiligen Lungenlappen ermittelt werden.

4.16.1.2 Myeloperoxidase Assay

Für diese Untersuchung wurde eine der entnommenen Kryokonservierungs-Proben (s. 4.15.) verwendet.

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, das bei Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle spielt. Es katalysiert die Oxidation von Chloridionen durch Wasserstoffperoxid zu hypochloriger Säure:

$$H_2O_2+Cl^- +H^+ \rightarrow H_2O+HOCl$$

Die Fähigkeit, diese Reaktion zu katalysieren, ist einzigartig unter Säugetierenzymen und wird als Schlüsselfunktion bei der *in vivo* Wirkung der Myeloperoxidase betrachtet.

Die gebildeten hypochlorige Säure wirkt antimikrobiell und verursacht somit erhebliche Gewebeschäden, die durch neutrophile Granulozyten vermittelt wird.

MPO weist weiter auch eine Peroxidase-Aktivität auf, was sich in der Oxidation einer Vielzahl von Substraten durch Wasserstoffperoxid zeigt. Diese Aktivität ist häufig genutzt worden, um die Konzentration von MPO zu ermitteln. Um dabei nur die spezifische MPO Aktivität zu ermitteln, sind entsprechende Bedingungen bei der Bestimmung, wie z.B. ein neutraler pH-Wert einzuhalten. Die Messung selbst erfolgt kolorimetrisch. Dafür wurde ein spezielles Kit benutzt (Applied Bioanalytical Labs, MPO-412). Die zugrunde liegende Methode wurde von Weiss et al. 1982 beschrieben. Sie beruht auf der oben beschriebenen MPO-katalysierten Reaktion von Chlorid mit Wasserstoffperoxid zu hypochloriger Säure. Diese Säure wird dabei durch ß-Aminosäuretaurin abgefangen und bildet ein stabiles Taurinchloramin ($TauNH_2$). Dadurch wird verhindert, dass höhere Konzentrationen von hypochloriger Säure das MPO deaktivieren bzw. die katalytische Wirkung des MPOs beeinträchtigen.

Nach einer festgelegten Inkubationszeit wird die MPO katalysierte Reaktion durch Katalasezusatz gestoppt. Danach wird 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, TNB, zugesetzt, mit dem das gebildete Taurinchloramin reagiert. TNB selbst hat eine starke Absorbtionsbande bei 412 nm; dass Reaktionsprodukt mit Taurinchloramin ist farblos. Die ursprüngliche MPO-Aktivität kann demnach gemessen werden, indem der Abfall der Absorbtion bei 412 nm gemessen wird. Als Einheit wird hierbei die Menge MPO definiert, die 1 mmol Taurinchloramin bei pH 6,5 und 25 °C innerhalb von 30 Minuten in Gegenwart von 100 mmol Chlorid und 100 µmol Wasserstoffperoxid erzeugt.

Der Ablauf der gesamten Messung lässt sich mit folgenden Reaktionsgleichungen beschreiben (Weiss 1982):

$$H_2O_2+Cl^-+H^+ \rightarrow HOCl+H2O$$
$$HOCl+TauNH_2 \rightarrow TauNHCl+H_2O$$

Reaktionsabbruch durch Wasserstoffperoxidabbau nach Katalasezusatz

$$TauNHCl+2TNB \rightarrow DTNB+Cl^-+TauNH_2$$

Um Die MPO-Aktivität messen zu können, mussten die entsprechenden Kryokonservierungsproben zunächst homogenisiert werden.
Im ersten Schritt gab man in 2 ml Eppendorf Gefäße (2 ml SafeLock Tubes, Eppendorf) je eine kleine Stahlkugel (Stainless Steel Beads 5 mm QIAGEN). Nun wurde ein Puffer angesetzt, der aus 10 ml Homogenisierungspuffer (121g Tris-HCl; 4,28 g Sucrose; 0,057 g EGTA; 0,292 g EDTA), einer Tablette eines Inhibitoren-Mixes (10 µl Leupeptin 5mg/ml; 10 µl Pepstatin 2 mg/ml; 100 µl Aprotinin 1 mg/ml), 50 µl PMSF (Phenylmethanesulfonyl-fluoride, Sigma) und 50 µl Tritin X (Triton X-100, Sigma) bestand. 300 µl dieses Puffers wurden in die jeweiligen 2 ml Eppendorf Gefäße pipettiert.
Mit Hilfe eines Mörsers wurden die Proben zerstoßen und anschließend ein etwa 2 mm großes Stück in das Eppendorf Gefäß überführt. In einem Tissue-Lyser (Qiagen) wurden die Proben zweimal 1 min bei 30/s zerkleinert. Die Proben wurden anschließend in einer Kühlzentrifuge (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) 30 Minuten bei 4 °C und 8000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß (Safe Lock Tubes 1,5 ml, Eppendorf) überführt und auf Eis gestellt.

Anschließend folgte die Proteinbestimmung und Faktorberechnung. Hierfür wurde von dem vorher überführten Überstand 5 µl in ein neues 1,5 ml Eppendorf Gefäß pipettiert und mit 245 µl des bereits angesetzten Puffers vermischt. Das Working Reagenz des BCA Pierce Kits (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) wurde hergestellt, indem eine 1:50 Verdünnung von Reagenz A zu Reagenz B angerührt wurde.

Im nächsten Schritt wurden die Standards (A-I) aufgetaut und jeweils 25 µl auf eine 96-Loch-Platte im Doppelansatz pipettiert. Anschließend wurden 25 µl der Proben ebenfalls im Doppelansatz dazu pipettiert. Zuletzt wurden noch 200 µl des Working Reagenz hinzugefügt. Die so vorbereitete Platte musste nun 30 Minuten bei 37 °C in einem Wärmeschrank auf einem Schüttler inkubieren und danach für 10 Minuten bei 4 °C abkühlen. Die Proteinbe-

stimmung und Faktorberechnung wurde mit Hilfe eines Computerprogrammes durchgeführt. Die vorbereitete Platte wurde hierzu in den Plattenreader des PC's gesetzt.
Schließlich konnte mit dem MPO-412 von Applied Bioanalytical Labs die Aktivität der Myeloperoxidase bestimmt werden. Die nötigen Lösungen wurden nach Kit Protokoll vorbereitet.
Um eine Kontrolle der Ergebnisse zu erhalten, wurden zwei sogenannte blank Proben mit vorbereitet. Diese haben keine MPO-Aktivität und dienen somit zur Bestimmung der Baseline-Absorbtion bei 412 nm. Die blank Proben wurden ebenfalls nach dem Kit Protokoll vorbereitet.
Zu Beginn wurde ein Thermomixer (Thermomixer comfort 1,5 ml, Eppendorf) auf 25 °C eingestellt. Nun wurden 880 µl des Assay-Puffers in jedes Eppendorf Gefäß pipettiert und 80,0 µl der MPO-Probe bzw. 80,0 µl des Assay-Puffers für die blank Proben in das entsprechende Gefäß überführt und für 5 Minuten auf dem Heizblock erwärmt.

Nach diesen fünf Minuten wurde zu jeder Probe 40,0 µl der Wasserstoffperoxid Lösung hinzugefügt. Danach wurden die Proben durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 25 °C inkubiert. Es wurden 40 µl der Katalase-Lösung hinzugefügt und nochmals 5 Minuten auf dem Heizblock erwärmt. Im letzten Schritt wurden 100 µl der TNB Lösung bzw. bei den blank Proben 100 µl des Assay-Puffers hinzugefügt.

Die Messung der MPO-Aktivität bei 412 nm wurde mit Hilfe eines PC-Programmes durchgeführt. Zunächst wurde die blank Probe gemessen, um eine Baseline zu setzten. Anschließend werden die einzelnen Proben gemessen.

4.16.1.3 Histologie

Um die Ergebnisse histologisch ergänzen zu können, wurden die in 4.15. beschriebenen Histologieproben verwendet. Die Aufarbeitung der Proben zu histologischen Hämatoxylin/-Eosin (H/E) Schnitten wurde in Standardtechnik durchgeführt. Die Standardtechnik besteht aus mehreren Schritten.

Zunächst müssen die Proben fixiert werden, um die postmortale Autolyse des Gewebes zu verhindern. Durch das Einlegen der Proben in 4 % Formalin wurden die Proben bereits fixiert.

Der zweite Schritt besteht aus dem Entwässern, das durch eine aufsteigende Alkoholreihe geschieht. Daraufhin werden die Proben in Paraffin gegossen und auf einer Kühlplatte gekühlt. Das anschließende Schneiden geschieht mit der Hilfe eines Kryotoms, um dünne ca.

1-10 µm dicke Schnitte zu erhalten. Diese Schnitte werden anschließend in ein mit destilliertem Wasser gefüllten Paraffinstreckbad überführt. Zum Trocknen werden die Schnitte auf beschichtete Objektträger gelegt und über Nacht im Wärmeschrank fixiert.

Die Färbung beginnt mit dem Entparaffinieren und Hydratisieren der Schnitte. Hierfür werden die Schnitte zwei Mal für jeweils 15 Minuten in Xylol getaucht. Anschließend werden die Schnitte in Alkohol mit absteigender Konzentration getaucht.

Danach werden die Präparate in destilliertes Wasser überführt und für die Färbung in Hämalaunlösung nach Mayer getränkt, bevor sie mit Eosin gefärbt und abschließend mit Alkohol ansteigender Konzentration entwässert werden.

Die Herstellung der Schnitte vom Schneiden mit einem Kryotom bis zur Färbung und Entwässerung und die Erstellung der mikroskopischen Bilder wurde vom Labor des UKE durchgeführt.

100er Vergrößerung	400er Vergrößerung
Atelektasen	alveoläre Infiltration
Ödem	interstitielle Infiltration
Emphysem	Alveolarsepten

Tab. 12: Kriterien zur histologischen Bewertung von Lungen bei unterschiedlichen Vergrößerungen

Zur Beurteilung der Präparate erfolgte eine ausführliche Schulung durch eine Oberärztin der Pathologie, die auch stichprobenartig Qualitätskontrollen während der Auswertung durchführte.

Die histologischen Präparate wurden von zwei geblindeten Untersuchern (Dr. S.Wipper, UKE und A. Störmer) nach den Kriterien in Tab. 12 analysiert. Bei unterschiedlicher Beurteilung wurde der Mittelwert verwendet.
Bei allen Präparaten wurde mit einem Lichtmikroskop (Leica DMIRE 2) gearbeitet. Es wurden pro Präparat immer fünf verschiedene repräsentative Gesichtsfelder mit Hilfe eines Lung Injury Score (LIS) nach Rotta analysiert (Rotta et al. 1999). Der LIS ist ein semiquantitativer Ansatz, um die Beurteilung inhomogener histologischer Präparate zu erleichtern.

Grad	Ausmaß der Schädigung
1	keine Schädigung
2	Schädigung <25% pro Gesichtsfeld
3	Schädigung <50% pro Gesichtsfeld
4	Schädigung <75% pro Gesichtsfeld
5	Schädigung >75% pro Gesichtsfeld

Tab. 13: Bewertungsskala Histologie
Jedes Gesichtsfeld wird nach Rotta bewertet und ein LIS zugeordnet; dann wird über alle untersuchten Gesichtsfelder erneut gemittelt und das Ausmaß der Schädigung als Gesamt LIS (Grad) bestimmt

In Absprache mit der Abteilung für Pathologie (Frau Dr. S. Koops, Oberärztin) wurde bewusst auf eine quantitative Auswertung mittels Auszählung verzichtet. Zum einen kann die Verteilung spezifischer Zellen auch innerhalb eines Präparates sehr inhomogen sein und dadurch nicht repräsentativ, zum anderen hat der LIS den Vorteil, dass neben zellulären auch strukturelle Aspekte berücksichtigt werden können.

4.17 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung wurde im Rahmen dieser Arbeit für alle Daten der Gruppen 1, 2 und 3 von Herrn J.F. Kersten (Wissenschaftler im Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie des UKE) durchgeführt.

Für kontinuierliche Variable sind Mittelwerte mit einem 95 %-Konfidenzintervall angegeben. Für kategoriale Variable werden absolute und relative Häufigkeiten angegeben. Den Analysen der schließenden Statistik wurde eine visuelle Überprüfung der Daten auf Erfüllung der erforderlichen Normalverteilungsvoraussetzungen vorausgeschickt. Wo erforderlich, wurden die kontinuierlichen Variablen vor der Analyse logistisch transformiert, und für die Ergebnisdarstellung rücktransformiert.
PDI, POC, PVR und Compliance wurden mit Hilfe hierarchischer Kovarianzanalyse-Modelle (ANCOVA) unter Berücksichtigung der individuellen Verläufe der einzelnen Versuchstiere analysiert, um die unterschiedlichen Verläufe der Versuchsgruppen vergleichen zu können.

Wet/Dry-Ratio und Histologie wurden mit Hilfe baseline-adjustierter hierarchischer Modelle, unter Berücksichtigung der individuellen Lunge, analysiert; hierdurch lassen sich unter Berücksichtigung individueller Eigenschaften der Lungenseiten und -lappen die interessierenden Gruppeneffekte als geschätztes Randmittel darstellen. In den Graphen sind die gruppenbasierten geschätzten Randmittel mit 95 % Konfidenzintervallen angegeben.

Nominelle p-Werte werden angegeben; zweiseitige P-Werte <0,05 werden als signifikant angenommen, <0,01 als sehr signifikant und <0,001 als hoch signifikant.

Die statistischen Analysen wurden mit den Programmen SPSS 19.0 und dem Statistical Package R Version 2.15.1 (R Development Core Team 2010) durchgeführt.

5 Ergebnisse

Alle Ergebnisse beziehen sich auf die Untersuchungen dieser Arbeit (Gruppe 3) im Vergleich zu den von Frau Dr. Wipper zur Verfügung gestellten Versuchsdaten der Gruppen 1 und 2 (die deshalb hier auch im Ergebnisteil bewusst zum besseren Verständnis mit aufgeführt sind) mit folgendem Aufbau:

Gruppe 1: aspirationsgeschädigte Lungen mit ausschließlicher *ex vivo* Perfusion;

Gruppe 2: aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung;

Gruppe 3: aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung und ATG-Gabe.

Angaben zu den Versuchstieren sind im Anhang zusammengestellt.

Einzelne Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert (Wipper et al. 2011a-d).

5.1 Compliance

Die Compliance stellt ein Maß für die Dehnbarkeit der Lunge dar. Sie wird durch das pulmonale Volumen und die Elastizität bestimmt. Das Lungenvolumen ist vom Druck abhängig. Die Compliance ist definiert als Einheit Volumenveränderung pro Einheit Druckänderung. Ein hoher Wert der Compliance deutet auf einen Verlust der Integrität hin. Die Lunge verliert an Elastizität. Dies ist z.B. die Folge bei einem Emphysem. Ein niedriger Wert hingegen weist darauf hin, dass ein größerer Druck nötig ist, um das Lungenvolumen zu verändern, wie zum Beispiel bei der Lungenfibrose.

Aus der Graphik (Abb. 6) ist deutlich zu erkennen, dass die Compliance der dritten Versuchsgruppe zum Zeitpunkt der Aspiration (=Baseline) signifikant höher ausfällt als die der Gruppen 1 und 2.

Zu Beginn der Rekonditionierung ist in allen drei Gruppen ein Abfall der Compliance zu beobachten. Dies ist die Folge der Entstehung eines Lungenödems bei der Reperfusion. Nach Kuhnle et al.1998, findet man bei einer Ischämie und Reperfusion der Lunge in den alveolären Kapillaren und in den Arterien und Venen Leukozyten, die zur Entstehung eines Reperfusionsödems führen.

Im Laufe der Rekonditionierung unterscheidet sich die Compliance der zweiten und dritten Gruppe nicht wesentlich (59±8 vs. 59±13 ml/mbar). Die Compliance der ersten Gruppe ist im Gegensatz dazu signifikant niedriger (32±16 ml/mbar). Die Lungen der Gruppe 2, die nur intensivmedizinisch behandelt wurden, lassen eine Verbesserung der Lungencompliance auf das Niveau der ATG behandelten Lungen (Gruppe 3) erst wieder während der Reperfusion erkennen.

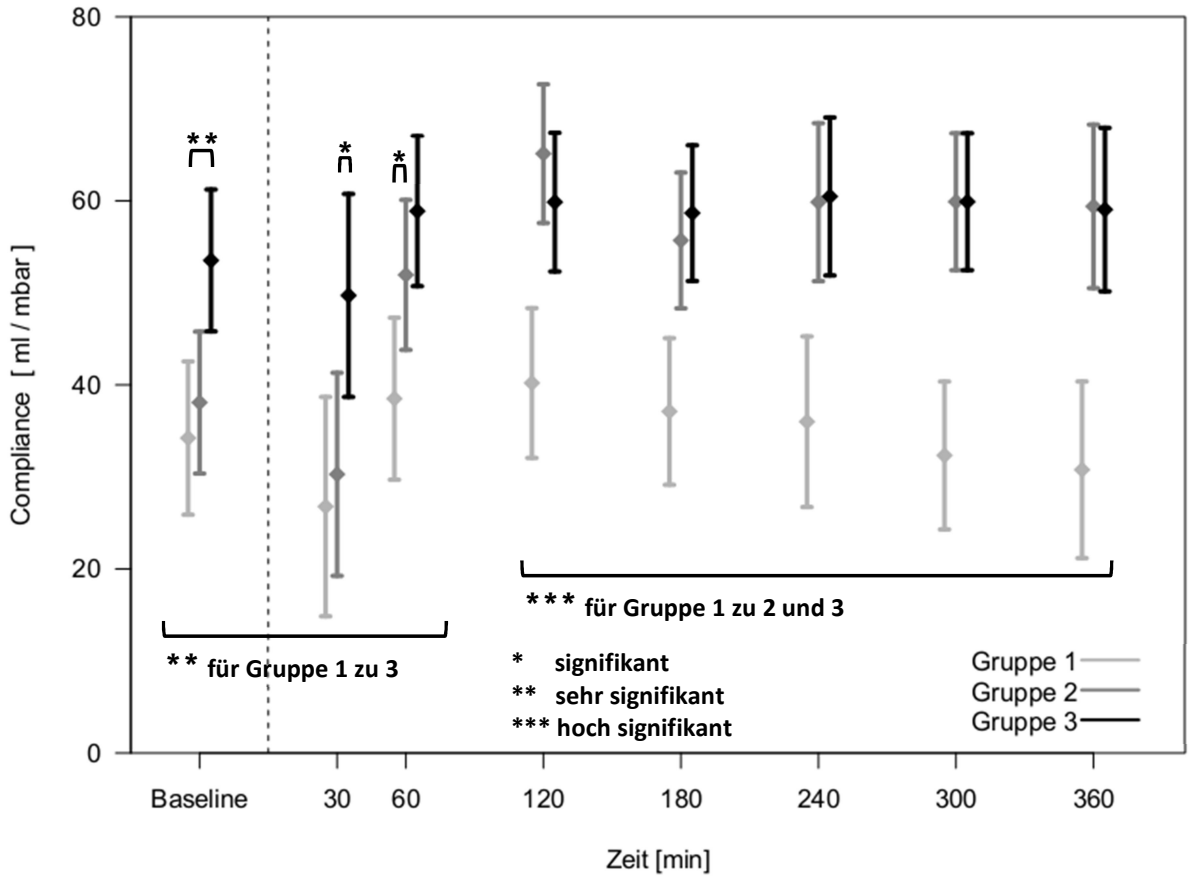


Abb. 6: Compliance der drei Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf (Gruppe 1: n=6; Gruppe 2: n=7; Gruppe 3: n=7; dargestellt sind Mittelwerte (geschätzte Randmittel) mit 95 % Konfidenzintervallen). Daten der Gruppe 1 und 2 von Frau Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt.

5.2 Pulmonal-vaskulärer Widerstand

Der pulmonale Gefäßwiderstand (PVR) beschreibt die Beziehung zwischen dem pulmonalen Perfusionsdruck und der Durchblutung der Lunge.

Da der Druck im linken Atrium nicht direkt messbar ist, wird dieser durch den Lungenkapillaren-Verschlussdruck (Wedge-Druck) indirekt bestimmt. Der linke Vorhofdruck entspricht dabei dem Druck in den Lungenvenen. Mit Hilfe eines Pulmonaliskatheters, dessen distales Lumen in der Pulmonalarterie liegt, kann der Druck hier bei geblocktem Ballon gemessen werden.

Nach unseren Ergebnissen hat der PVR während der Aspiration bei allen Versuchsgruppen einen etwa gleichen Ausgangswert (Abb. 7). Bei der ersten Gruppe sind die PVR-Werte

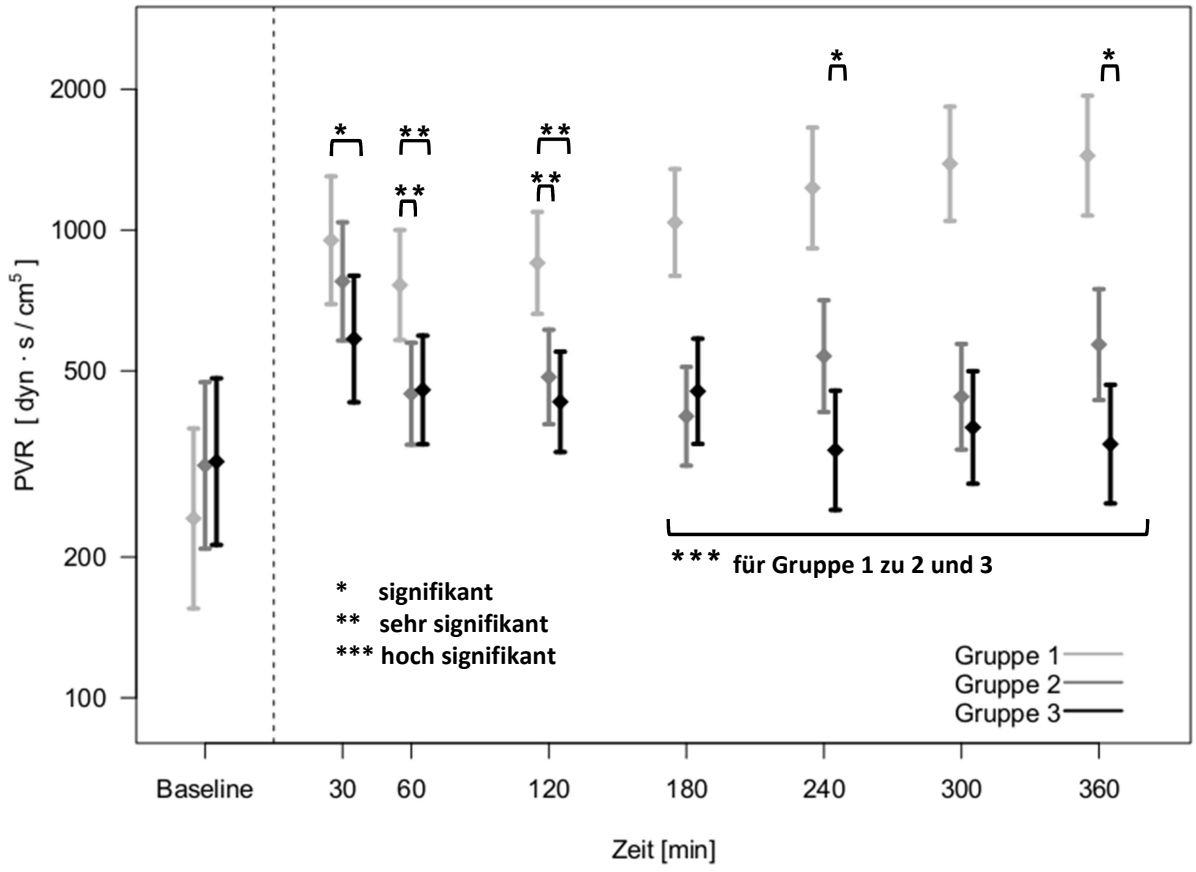


Abb. 7: Pulmonal vaskulärer Widerstand der drei Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf (Gruppe 1: n=6; Gruppe 2: n=7; Gruppe 3: n=7; dargestellt sind Mittelwerte (geschätzte Randmittel) mit 95 % Konfidenzintervallen). Daten der Gruppe 1 und 2 von Frau Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt.

schon zu Versuchsbeginn am höchsten und steigen kontinuierlich auf einen Wert von 1590 ± 412 dyn x sec x cm^{-5} an. Die Werte der dritten Gruppe (bei Einsatz von ATG) zeigen während

der gesamten Zeit die niedrigsten Werte mit einem Endwert von nur 357 ± 225 dyn x sec x cm^{-5}. Die PVR-Werte der zweiten Gruppe liegen wenig höher als die der dritten Gruppe (s. Abb. 7).

5.3 Pulmonaler Oxygenierungsgrad

Der pulmonale Oxygenierungsgrad (POC) ist ein Maß für den Gasaustausch. Der pulmonale Gasaustausch hängt hauptsächlich von den alveolaren Partialdrücken ab. Nur wenn ausreichende Partialdruckgradienten zwischen Alveolen und Blut bestehen, können die Atemgase im erforderlichen Umfang diffundieren.

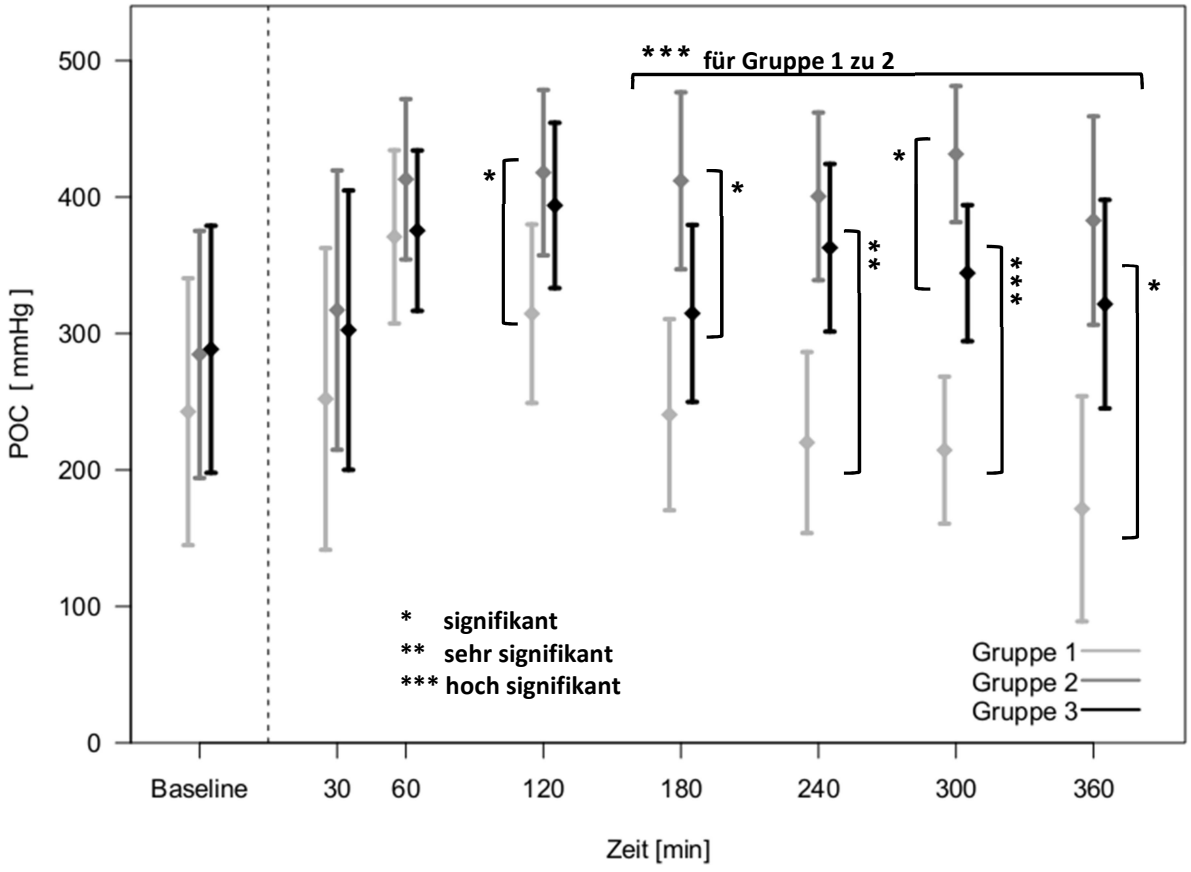


Abb. 8: Pulmonaler Oxygenierungsgrad der drei Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf (Gruppe 1: n=6; Gruppe 2: n=7; Gruppe 3: n=7; dargestellt sind Mittelwerte (geschätzte Randmittel) mit 95 % Konfidenzintervallen). Daten der Gruppe 1 und 2 von Frau Dr. S.Wipper zur Verfügung gestellt.

Der Gasaustausch der ersten Gruppe ist über die gesamte Zeit am niedrigsten (Abb. 8). Lediglich bei dem 60 Minuten Wert steigt er an. Danach ist ein stetiger Abfall des POC in der

ersten Gruppe zu beobachten (Endwert: 172±115 mmHg). Die Ausgangswerte der zweiten und dritten Gruppe sind nahezu gleich. Die Werte stabilisieren sich im Laufe der Reperfusion, wobei die zweite Gruppe etwas bessere Werte erkennen lässt als die dritte Gruppe (Endwerte 383±45 bzw. 322±57 mmHg). Obwohl bei diesem Parameter Gruppe 3 selbst nicht die relativ besten Werte zeigt, heben sich die Werte der Gruppe 2 und 3 zum Versuchsende signifikant positiv von denen der Gruppe 1 ab.

5.4 Pulmonaler Deflationsindex

Der PDI (Pulmonaler Deflationsindex) ist ein Wert, der den makroskopischen Zustand und die Kollabierungsfähigkeit nach der Diskonnektion der Lungen vom Ventilator in der Reperfusion beschreibt. Der PDI wurde in früheren Versuchsgruppen als ein geeigneter Parameter zur Beschreibung der Transplantabilität etabliert (Wipper et al. 2010ab). Er wird visuell bestimmt. Die Lungen werden hierbei mit einer Skala von 1-5 bewertet (s. Tab. 11). Dabei werden alle Lungen, die während der Reperfusion mit einem Wert von Eins oder Zwei

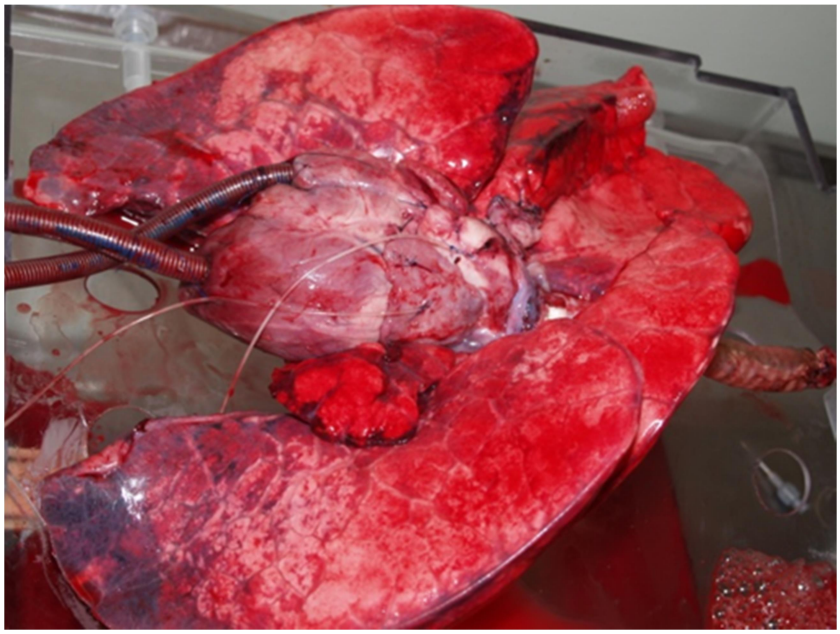


Abb. 9: Lunge mit einem pulmonalen Deflationsindex von 5
Deutlich erkennbar sind interstitielle Ödeme in allen Lappen, Atelektasen im linken und rechten Kaudallappen und Einblutungen (Schwein 55, Gruppe 1).
(Quelle S. Wipper, Druckgenehmigung liegt vor)

beurteilt werden, als überlebend und somit als transplantabel eingestuft. Die so bestimmten Werte sind in Abb. 14 widergegeben. Zeigt eine Lunge zu einem bestimmten Zeitpunkt einen höheren PDI als 2, wird sie als nicht überlebend und als nicht transplantabel ab diesem Zeitpunkt gewertet.

Zur Illustration der visuellen Erscheinung von Lungen mit unterschiedlichem PDI sind in Abb. 9 bis 13 Bilder von entsprechenden Lungen widergegeben.

Bei der Lunge in Abb. 9 erkennt man deutliche Einblutungen, Atelektasen und Ödemausbildung. Die Lunge in Abb. 10 zeigt weniger Blutungen, aber noch Atelektasen. Bei einem PDI von 3 in Abb. 11 sieht man schon eine deutliche Besserung: hier sind nur noch wenige Atelektasen erkennbar und es ist ein interstitielles Ödem in mehreren Lappen sichtbar. In Abb. 12 ist ein Ödem nur noch vereinzelt feststellbar und nur sehr geringgradige Atelektasen sind noch zu erkennen. Die Lunge mit einem PDI von 1 in Abb. 13 dagegen lässt weder Atelektasen noch ein Ödem oder Einblutungen erkennen.Die Lungen der Gruppe 3 haben hier bereits zu Beginn das beste visuelle Erscheinungsbild (niedriger PDI). Sie verbessern sich weiter im Verlauf der Reperfusion (End PDI: 1,6±0,5)

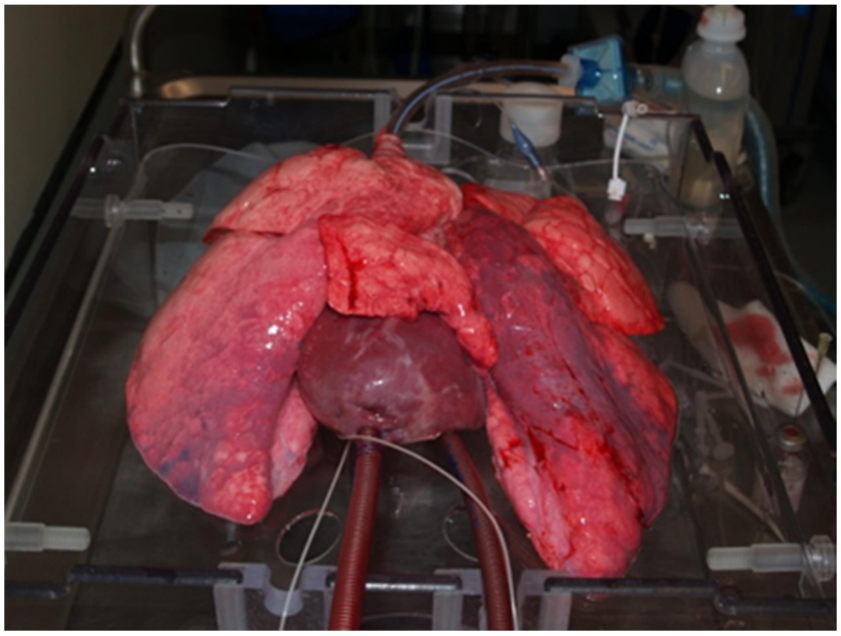


Abb. 10: Lunge mit einem pulmonalen Deflationsindex von 4
Atelektatische Bereiche und interstitielle Ödeme sind noch erkennbar neben geringfügigen Einblutungen
(Schwein 51, Gruppe 1).
(Quelle S.Wipper, Druckgenehmigung liegt vor)

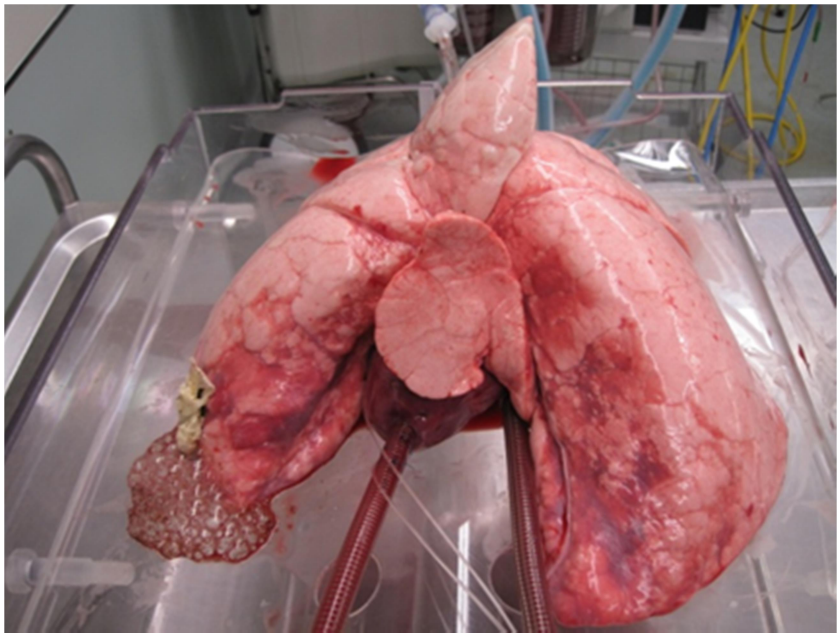


Abb. 11: Lunge mit einem pulmonalen Deflationsindex von 3
Es sind nur noch geringfügige Atelektasen und interstitielle Ödeme zu erkennen. Patch auf linkem Kaudallappen (Schwein 91, Gruppe 3).
(Quelle A.Störmer)

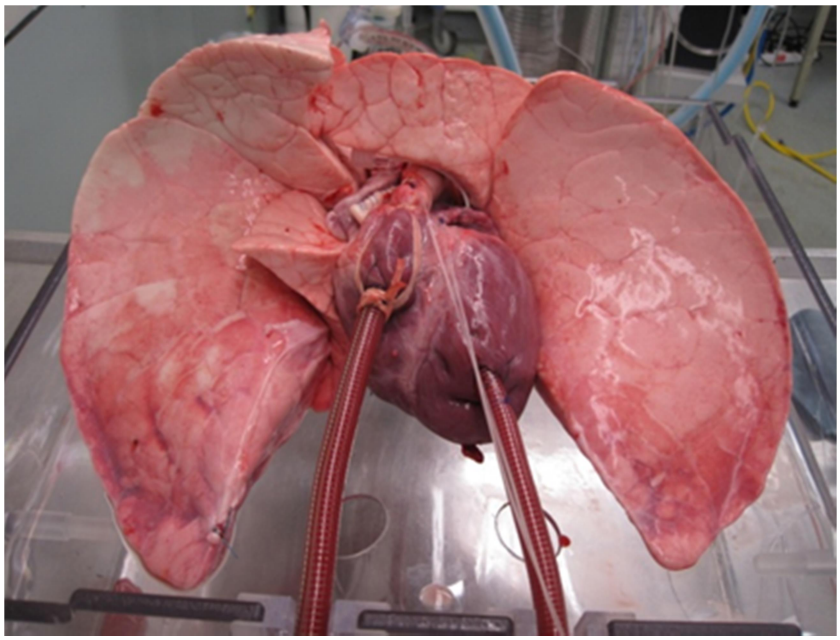


Abb. 12: Lunge mit einem pulmonalen Deflationsindex von 2
Interstitielle Ödeme sind nur vereinzelt erkennbar (Schwein 93, Gruppe 3).
(Quelle A.Störmer)

Abb. 13: Lunge mit einem pulmonalen Deflationsindex von 1
Die Lunge hat eine homogene Oberfläche ohne Anzeichen von Ödemen oder Atelektasen (Schwein 93, Gruppe 3).
(Quelle A.Störmer)

und sind somit transplantabel. Lediglich eine Lunge hat einen PDI Endwert von 2,5. Damit liegt die Transplantabilität bei 86 %.

Die zweite Gruppe hat einen wesentlich schlechteren Ausgangswert (4). Alle Lungen dieser Gruppe verbessern sich aber während der Reperfusion (2,3±0,6). Die Transplantabilität liegt hier bei 43 %.

Die erste Gruppe zeigt deutlich die schlechtesten Werte (Endwert: 3,8±0,8). Auch hier sieht man während der Reperfusion zunächst eine leichte Besserung. Im Laufe der Reperfusion verschlechtern sich die Werte aber wieder. Keine der Lungen aus dieser Gruppe konnte als transplantabel eingestuft werden.

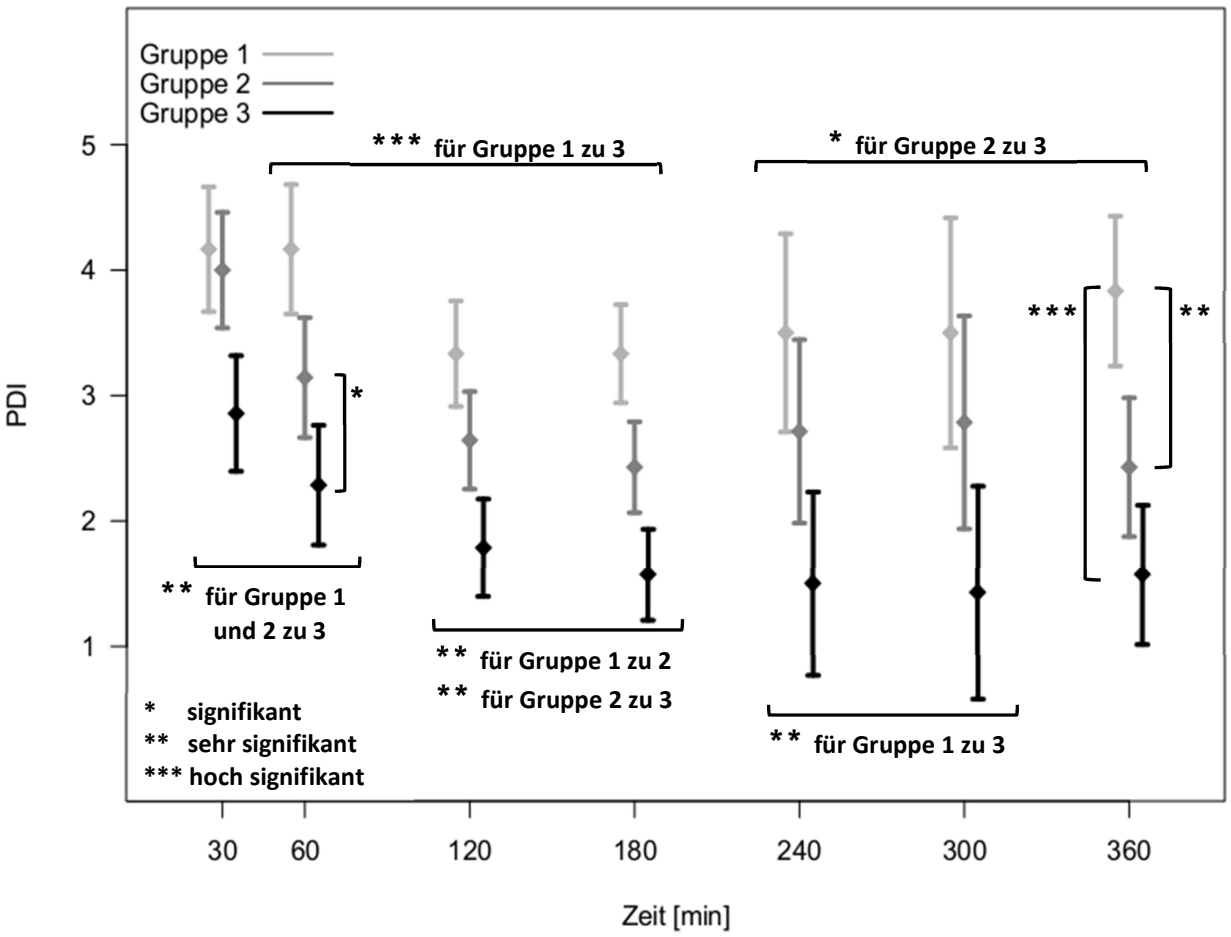


Abb. 14: Pulmonaler Deflationsindex der drei Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf während der Reperfusion (Gruppe1: n=6; Gruppe 2 und 3: n=7; dargestellt sind geschätzte Randmittel mit 95 % Konfidenzintervallen). Daten der Gruppe 1 und 2 von Frau Dr. Wipper zur Verfügung gestellt.

5.5 Histologische Ergebnisse

Die einzelnen Lungenlappen aller Lungen wurden histologisch geblindet untersucht (Insbesondere wurden hier auch als Teil dieser Arbeit die histologischen Präparate der Gruppen 1 und 2 untersucht, die von Frau Dr. Wipper zur Verfügung gestellt wurden.). Um die Ergebnisse zu objektivieren, wurde ein zweiter geblindeter Untersucher herangezogen (Frau Dr. S. Wipper). Im Vorfeld erfolgte eine Schulung durch eine Pathologin. Stichprobenartige Qualitätskontrollen wurden durch sie ebenfalls durchgeführt. Die Proben wurden durch den *Lung injury Score* nach Rotta beurteilt (Rotta et al. 1999) (S.Tab. 12 und 13). In Absprache mit der

Abteilung für Pathologie wurde bewusst auf eine quantitative Auswertung mittels Auszählung verzichtet. Zum einen kann die Verteilung spezifischer Zellen auch innerhalb eines Präparates sehr inhomogen sein und dadurch nicht repräsentativ, zum anderen hat der LIS den Vorteil, dass neben zellulären auch strukturelle Aspekte berücksichtigt werden können.

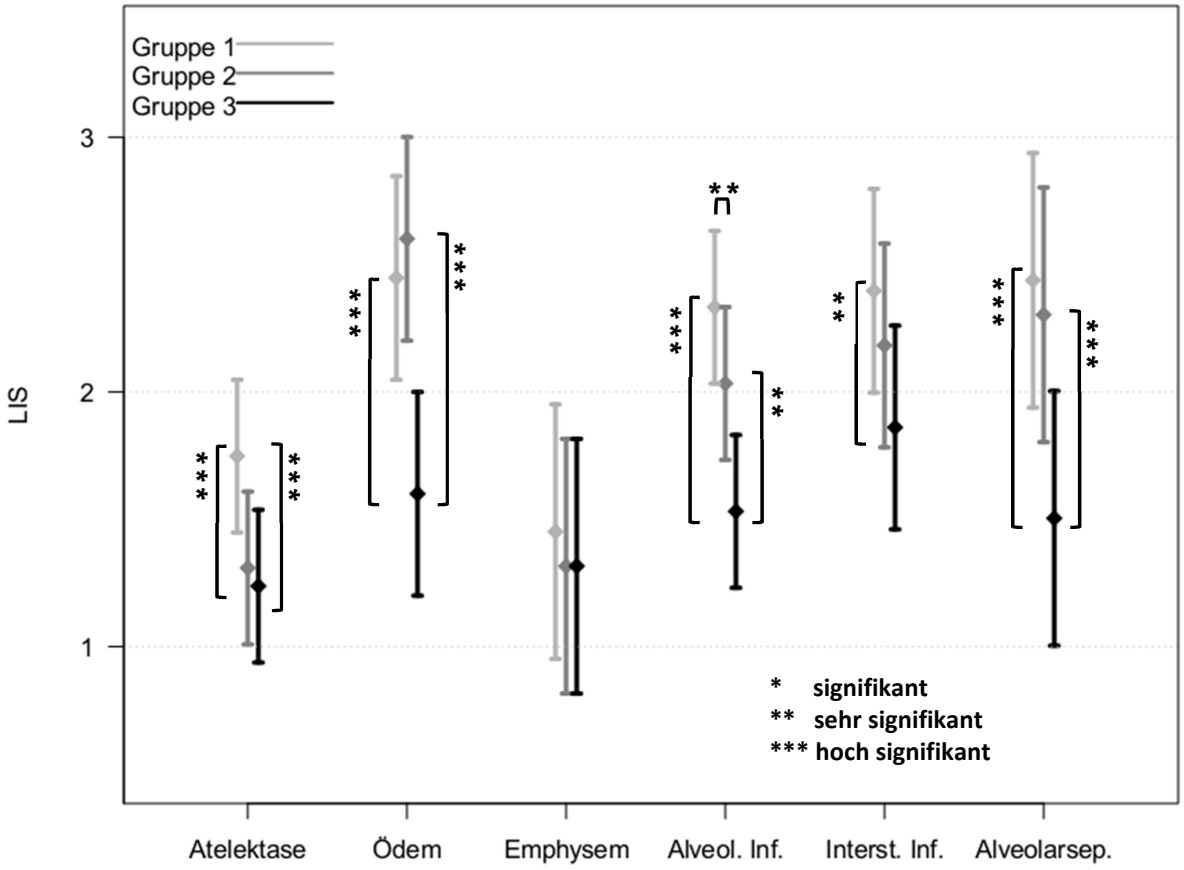


Abb. 15: Histologie der beurteilten Parameter der drei Versuchsgruppen (Gruppe1: n=6; Gruppe 2 und 3: n=7; dargestellt sind geschätzte Randmittel mit 95 % Konfidenzintervallen). *Statistisch hochsignifikante Unterschiede (p < 0,001; ***) zeigen sich bei allen Parametern bis auf Emphysem und interstitielle Infiltration. Statistisch sehr signifikante Unterschiede (p < 0,01; **) zeigen sich bei alveolärer Infiltration (Gruppe 1 zu 2 und Gruppe 2 zu 3)und bei interst. Inf. (Gruppe 3 zu 1).*

LIS: Lung Injury Score nach Rotta; Alveolarsep: Alveolarsepten

Daten der Gruppe 1 und 2 von Frau Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt.

Die erste Gruppe, in der keine intensivmedizinischen Maßnahmen durchgeführt wurden, zeigt in allen Parametern einen schlechteren Wert als die Gruppen 2 und 3. Nur im Parameter des Ödems sind die Lungen der Gruppe 1 unwesentlich besser bewertet als die der Gruppe 2.

Gruppe 2 zeigt beim Ödem eine deutlich schlechtere (hoch signifikant; $p < 0{,}001$) histologische Beurteilung als Gruppe 3. Im Hinblick auf das Emphysem und der Atelektase zeigen Gruppe 2 und 3 nahezu den gleichen Wert. Es ist deutlich zu sehen, dass die Gruppe 3, die zu der intensivmedizinischen Behandlung außerdem noch mit ATG behandelt wurde, die besten histologischen Ergebnisse zeigt, auch wenn dies für Atelektase und Emphysem weniger ausgeprägt ist. Die Abbildungen 16-21 sollen die diskutierten Beobachtungen nur beispielhaft zeigen.

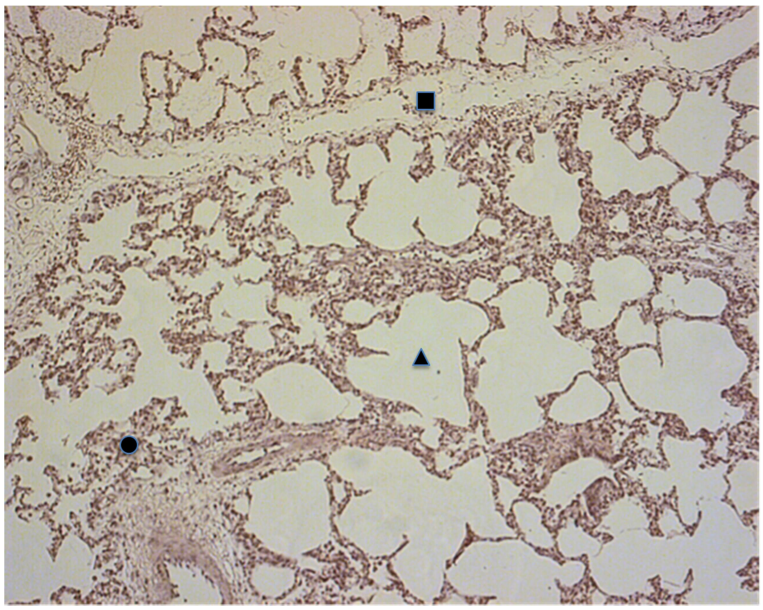


Abb. 16: Histologie, Gr. 1, 100er Originalvergrößerung, Hämatoxylin/Eosin-Färbung.
Zu sehen ist ein interstitielles Ödem(■). Man kann sowohl emphysäre Bereiche(▲)als auch z.T. atelektatische Bereiche(●)erkennen.
(Schwein 54, RUL). (Quelle A.Störmer)

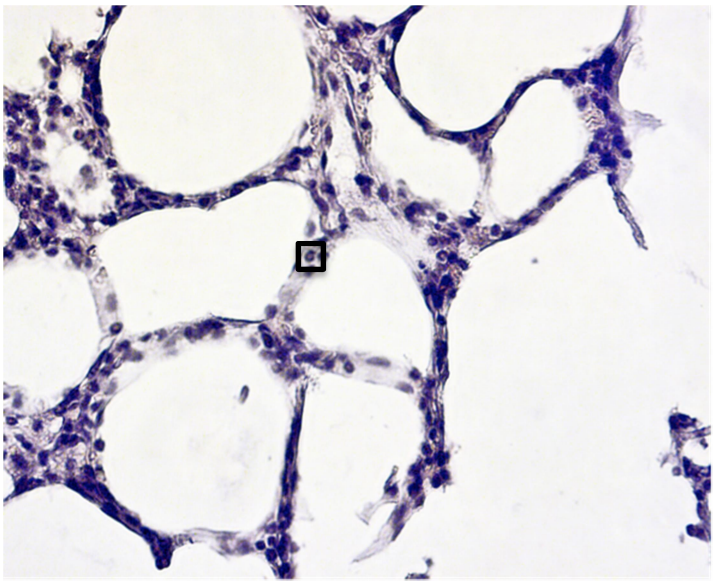


Abb. 17: Histologie, Gr. 1, 400er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin-Färbung.
Die Alveolarsepten sind aufgrund einer Infiltration mit hauptsächlich neutrophilen Granulozyten(□) verdickt.
(Schwein 57, LUL). (Quelle A.Störmer)

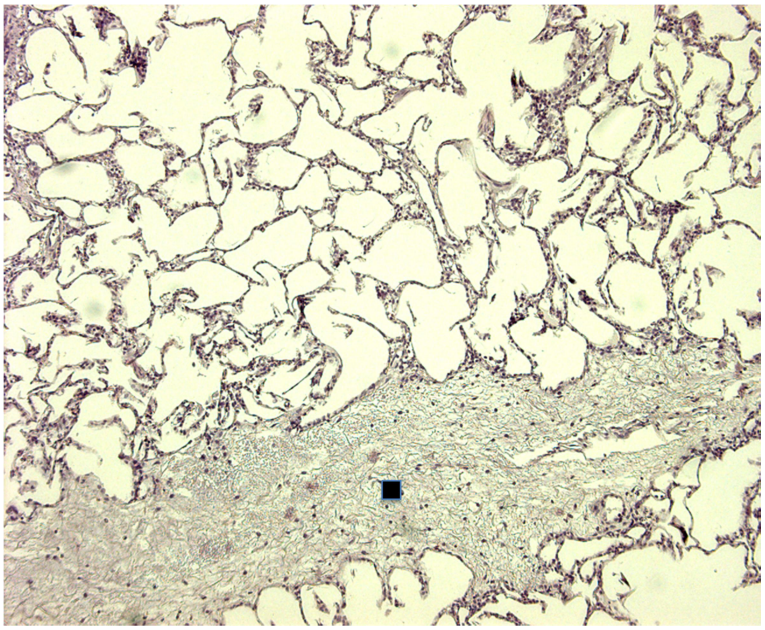


Abb. 18: Histologie, Gr. 2, 100er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin-Färbung
Diese Abbildung zeigt eine deutliche interstitielle Ödembildung(■).
(Schwein 62, RUL). (Quelle A.Störmer)

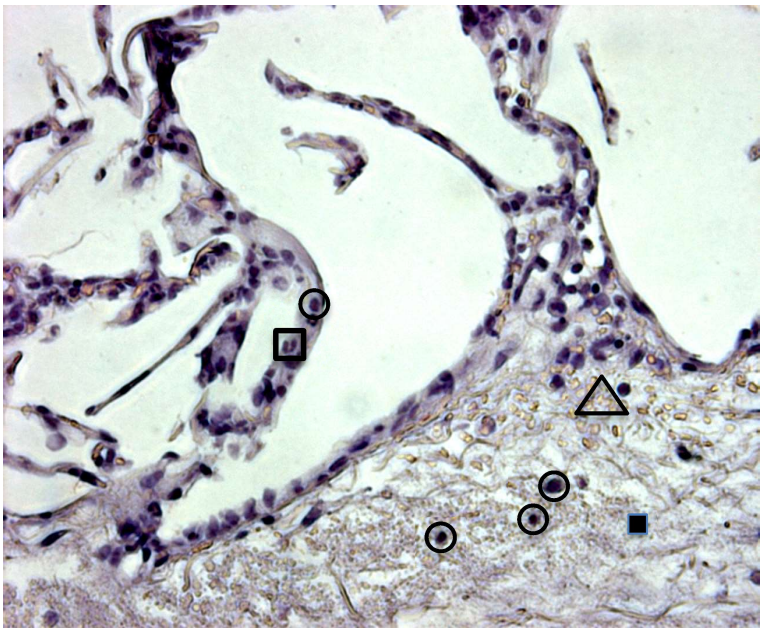


Abb. 19: Histologie, Gr. 2, 400er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin-Färbung
Am unteren Bildrand ist ein interstitielles Ödem(■) mit hauptsächlich lymphozytärer Infiltration(○) zu erkennen. In den Alveolarsepten befinden sich einzelne neutrophile Granulozyten(□) neben vereinzelten Lymphozyten(○). Ebenso findet man vereinzelte Erythrozyten(△).
(Schwein 62, RUL). (Quelle A.Störmer)

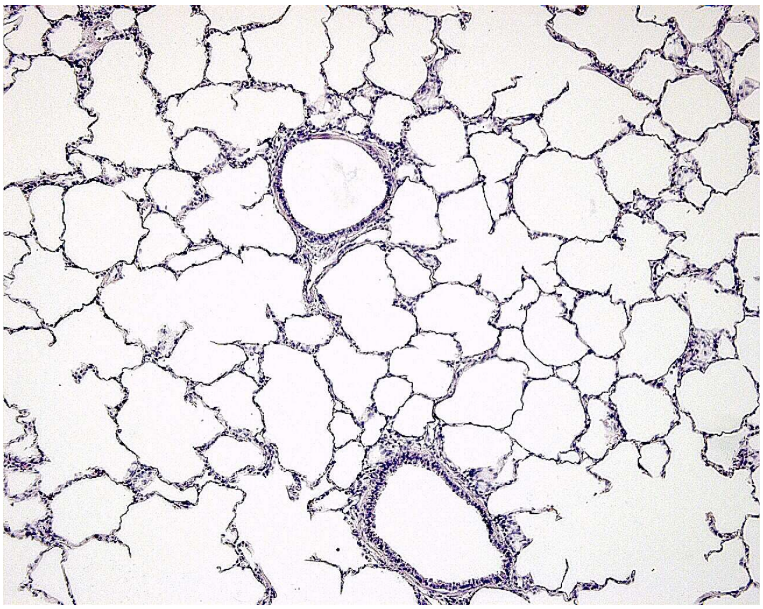


Abb. 20: Histologie, Gr. 3, 100er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin Färbung
Weder Ödembildung, noch Emphysem oder Atelektasen sind hier sichtbar (Schwein 88, LOL). (Quelle A.Störmer)

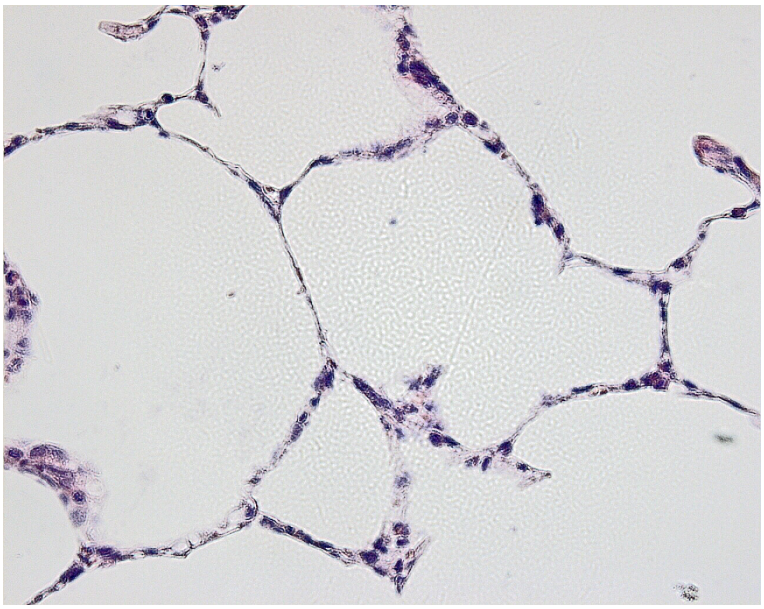


Abb. 21: Histologie, Gr. 3, 400er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin Färbung, *Keine Infiltration, Alveolarsepten sind einschichtig (Schwein 94, LOL).* (Quelle A.Störmer)

5.6 *Wet and Dry Ratio*

Der Ödemgehalt der Lungen wird mit dem *Wet and Dry Ratio* berechnet. Die Graphik zeigt die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe, die sich aus der Differenz des Ausgangsgewichtes der Proben und dem Gewicht nach 72 Stunden ergeben. Alle Gruppen verbessern sich im Gegensatz zum Ausgangswert (Baseline) zum Zeitpunkt der Aspiration.

Dabei ist bei Gruppe 1 allerdings nur eine geringfügige Verbesserung im Vergleich zur Baseline zu erkennen. Von der ersten bis zur dritten Gruppe läßt sich eine Besserung erkennen. Die erste Gruppe hat danach den höchsten Ödemgehalt und die dritte Gruppe den niedrigsten. Auch wenn diese Unterschiede nicht statistisch signifikant sind, stimmen sie im Trend mit den Ergebnissen für PDI und Histologie überein.

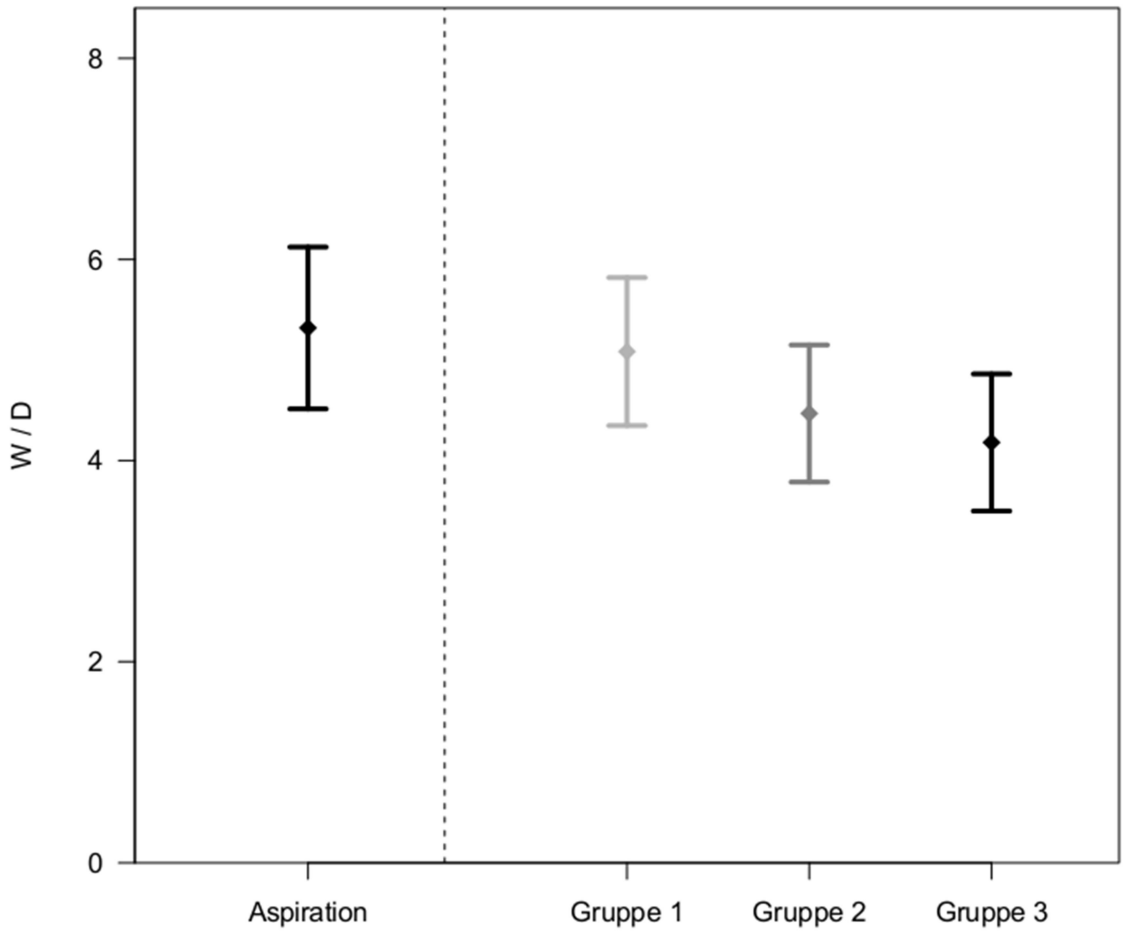


Abb. 22: *Wet and Dry Ratio* der drei Versuchsgruppen (Gruppe1: n=6; Gruppe 2 und 3: n=7; dargestellt sind geschätzte Randmittel mit 95 % Konfidenzintervallen). Keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Für die Aspiration ist der W/D aller Gruppen identisch (deshalb nur ein Wert).

Daten der Gruppe 1 und 2 von Frau Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt.

5.7 Myeloperoxidase-Werte

MPO kommt hauptsächlich in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten vor. Werden neutrophile Granulozyten stimuliert, kommt es zur Degranulation und somit zur Freisetzung von MPO (Lau et al. 2006). Bei Entzündungsprozessen ist die Messung der Enzymaktivität daher ein Marker für eine Infiltration mit neutrophilen Granulozyten im Gewebe, insbesondere bei pulmonalen Infektionen (Hoy et al. 2002).

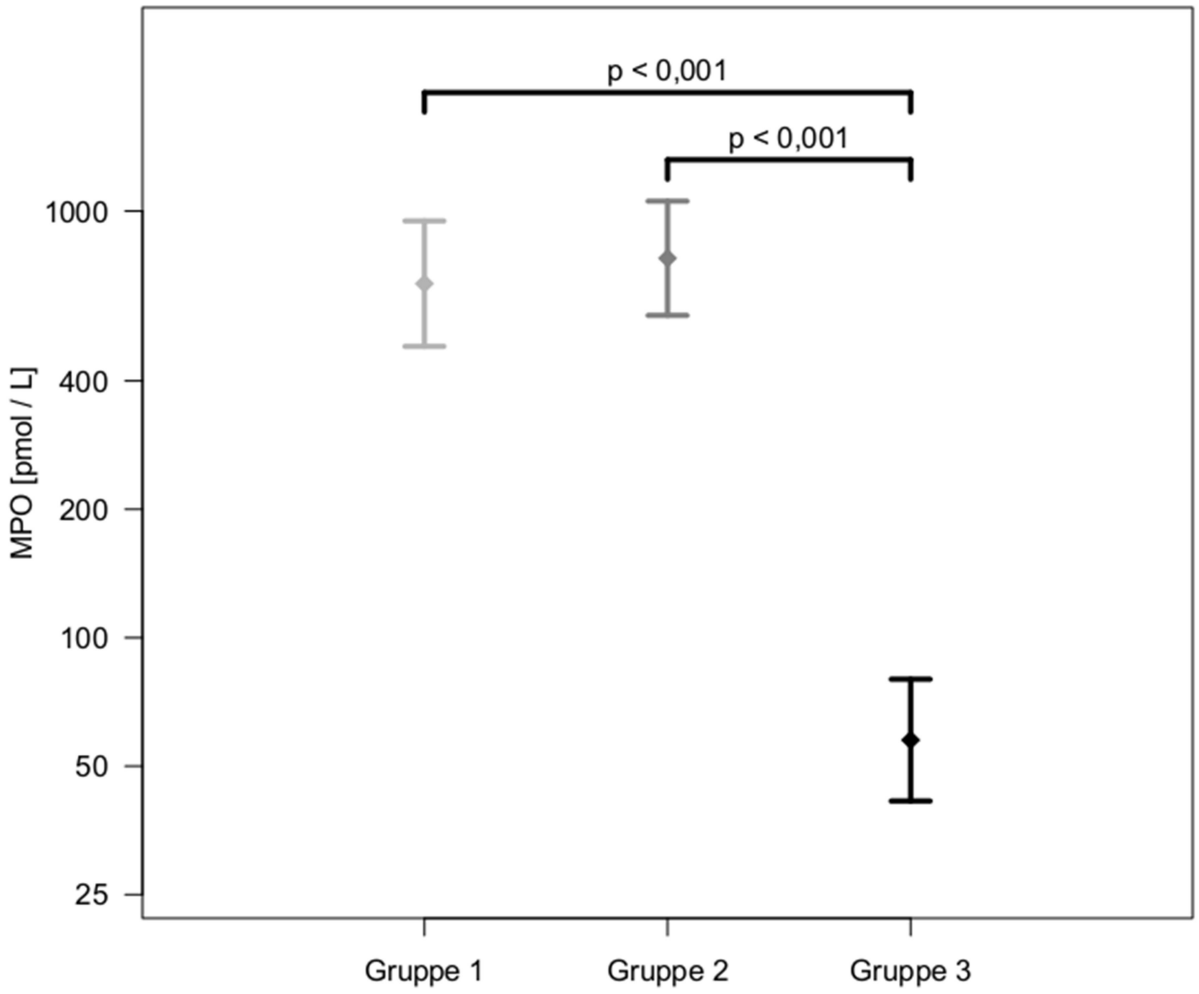


Abb. 23: Myeloperoxidase-Aktivitäten der untersuchten Lungenlappen (Gruppe1: n=6; Gruppe 2 und 3: n=7; dargestellt sind geschätzte Randmittel mit 95 % Konfidenz-intervallen). Daten der Gruppe 1 und 2 von Frau Dr. Wipper zur Verfügung gestellt.

Es ist deutlich zu sehen, dass die Aktivität in der dritten Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen hoch signifikant ($p<0,001$) geringer ausfällt. Da die Gruppe mit ATG nur extrem kleine MPO Werte aufweist, bestand zunächst die Vermutung, dass ein Messfehler

vorliegen könnte. Nach mehrmaliger Überprüfung der Daten konnte aber als sicher nachgewiesen werden, dass es sich bei den niedrigen MPO Werten für Gruppe 3 um reale Messergebnisse handelt.

6 Diskussion

6.1 Potentielle Bedeutung der Arbeitsergebnisse für die Lungentransplantation

Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hypothese, nach der eine Gabe von ATG Fresenius® *in vivo* die Rekonditionierung vorgeschädigter Spenderlungen verbessern könnte. Dabei ist hervorzuheben, dass eine ATG Gabe schon im Donor eine positive Wirkung auf die Spenderlunge auszuüben scheint. Es wird damit ein Weg aufgezeigt, mit dem geschädigte Spenderlungen deutlich besser als bisher zu regenerieren sein könnten. Viele andere Arbeiten haben sich bereits mit der Rekonditionierung geschädigter Spenderlungen befasst (van Raemdonck et al. 2009). Gezielte Untersuchungen zur Wirkung von ATG Gaben schon im Spender sind uns in diesem Zusammenhang aber nicht bekannt.
Ein Hauptproblem bei der Lungentransplantation ist die ausreichende Verfügbarkeit geeigneter Spenderlungen (Aigner et al. 2005), da viele Lungen als nicht transplantabel eingestuft werden müssen (Ingemansson et al. 2009). Dies liegt allerdings auch an den Standardkriterien für Lungenspender, die bereits 1980 in den ersten Jahren der Lungentransplantation entwickelt wurden. Hält man sich an diese Kriterien, so können nur etwa 20 % aller Spenderlungen transplantiert werden (Pierre et al. 2002).
Orens et al. (2003) merken dazu an, dass sich vor dem Hintergrund von mehr als 20 Jahren Transplantationserfahrungen sagen lässt, dass deutlich mehr Spenderlungen verwendet werden könnten als es die Standardkriterien zulassen. Sie halten es daher für notwendig, die traditionellen Spenderkriterien zu erweitern und anzupassen (s. Tab. 1).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Problems der Lungenvorschädigung durch Magensaftaspiration, eine der Kontraindikationen. Bei Verlust des Bewusstseins in der Agonie fallen die Schutzreflexe des Atemtraktes und die Funktion des ösophagalen Sphinkters aus (Moro 2004) und es kann zur Magensaftaspiration kommen. Dadurch findet man diese Schädigung häufig bei Spenderlungen. Die Schädigungen durch Magensaftaspiration werden in der Praxis meist hervorgerufen durch ein Gemisch aus Magensaft und Blut, da sich bei den meisten Spendern aufgrund eines Traumas Blutungen entwickeln. Wie schon erwähnt, wurde aus diesem Grunde bei dieser Arbeit ein Magensaft-Blut Gemisch zur Vorschädigung verwendet.

Die Arbeitsgruppe von Wagner (Wipper et al. 2009ab) konnte zeigen, dass eine Rekonditionierung von durch Magensaftaspiration (vorgenommen mit einem Magensaft/Blut-Gemisch) vorgeschädigten Spenderlungen durch intensivmedizinische Behandlungen mit NO-Beatmung, ACC, Antibiotika und Methylprednisolon zu einer Stabilisierung der Lungen führt. Es bleiben allerdings als mögliche Komplikationen die Probleme einer erhöhten pulmonalen vaskulären Resistenz, der Ödembildung und einer erniedrigten Compliance bestehen (Wipper et al. 2011b).

6.2 Arbeitshypothese, Versuchsgruppen und kritische Ergebnisparameter

Ziel dieser Arbeit war es, einen wirkungsvolleren Weg zur Rekonditionierung von durch Magensaftaspiration vorgeschädigten Spenderlungen zu entwickeln. Wie bereits mehrfach erwähnt, steht Magensaft hier und in folgendem für ein Magensaft/Blut-Gemisch.

Die Arbeitshypothese dabei war, dass durch Magensaftaspiration vorgeschädigte Lungen durch eine Gabe von ATG schon im Spender mit Wiederholung in der Reperfusion wirkungsvoller rekonditioniert werden können, als es bisher durch die Anwendung allein von intensivmedizinischen Massnahmen (NO- Beatmung, ACC, Antibiotika und Methylprednisolon) erreicht werden konnte. Diese erweiterte Rekonditionierungsstrategie könnte dann einen Beitrag dazu leisten, eine deutlich größere Anzahl von marginalen Lungen wieder transplantabel zu machen und so den Spenderpool nachhaltig zu erweitern.

Um diese Arbeitshypothese zu testen, wurden drei Versuchsgruppen miteinander verglichen. Die Versuchsdaten der Gruppen 1 und 2 wurden freundlicherweise von Frau Dr. S. Wipper zur Verfügung gestellt.

Gruppe 1: aspirationsgeschädigte Lungen mit ausschließlicher *ex vivo* Perfusion
Gruppe 2: aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung
Gruppe 3: aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung und ATG-Gabe.

Insgsamt wurde ATG Fresenius® wie folgt in der Gruppe 3 eingesetzt:

1. Im Spendertier 240 Minuten nach Aspiration
   (200 mg in 500 ml HES 6 %, intravenös über 30 min)

2. als Zusatz zur Perfusionslösung Perfadex (200 mg) und
3. als Zusatz zum Perfusat von Beginn der Reperfusion.

Zur Beurteilung der Transplantabilität von Spenderlungen wurden eine Reihe von Parametern herangezogen, die hier kurz vorgestellt werden sollen:

1. Compliance

   Die Compliance lässt eine Beurteilung der Integrität des Lungengewebes zu. Sinkt die Compliance, bedeutet dieses, dass mehr Druck aufgewendet werden muss, um die Lunge mit derselben Menge Luft zu füllen; folglich steigt die Atemarbeit. Hierzu kommt es bei z.B. einem Lungenödem oder einer Lungenentzündung. Bei einem Lungenemphysem steigt die Compliance. Auch Nader et al. (2000) haben die Compliance herangezogen, um das Ausmaß der Lungenschädigung zu beurteilen.

2. PVR

   Der pulmonale vaskuläre Widerstand (PVR) ist der Druck, gegen den der rechte Ventrikel arbeiten muss, um Blut in die Lunge zu pumpen. Der PVR ist ein wichtiger Parameter. Ist er erhöht, kann dies ein Vorbote für den Tod des Empfängers bedeuten (Naka et al.1996). Der PVR wird durch den vaskulären Tonus beeinflusst und steigt z.B. durch Hyperkapnie oder Hypoxie an.

3. POC

   Der Gasaustausch der Lunge findet durch Diffusion statt. Er hängt zum einen von der Beschaffenheit der Alveolarmembran und zum anderen vom Blutvolumen in den Kapillaren ab, in denen sich das Hämoglobin befindet. Es kommt zu einer Störung des Gasaustausches bei Membranschädigungen der Alveolen oder bei einem veränderten Kapillarvolumen, wobei eine Veränderung der Alveolenmembran einen signifikanteren Einfluss auf den Gasaustausch hat. Vor allem ein Verlust der Diffusionsoberfläche beeinträchtigt den Gasaustausch. Die Diffusion ist bei einer Zerstörung der Alveolenstruktur, wie bei einem Emphysem, oder durch eine erweiterte Diffusionsstrecke, wie bei erhöhter Membrandicke, herabgesetzt. Aber auch das verfügbare Volumen an pulmonalem kapillaren Blut beeinflusst den Gasaustausch wesentlich (Weinberger et al. 1980). Das Volumen des verfügbaren pulmonalen kapillaren Blutes hängt vor allem von der Anzahl und Größe der funktionierenden Kapillaren ab. Es kommt zu einem kapillaren

Rekruitment, wenn der pulmonale Blutfluss und vor allem der pulmonale kapillare transmurale Druck steigen (Al-Rawas et al. 2000). Nach einer Veröffentlichung von van Raemdonck et al. (2009) ist ein guter Gasaustausch, der zu den Standardkriterien der Transplantabilität gehört, der wichtigste Indikator für die Qualität der Lungenfunktion. Bei den Ergebnissen dieser Arbeit für den Gasaustausch beobachtet man allerdings ein eher inhomogenes Muster, welches uns vermuten lässt, dass dieser Parameter zumindest in diesem Zusammenhang nur gemeinsam mit anderen Parametern eine eindeutige Aussage zur Qualität der Lungenfunktion zulässt. Der signifikant bessere Gasaustausch der Gruppen 2 und 3 im Vergleich zur Gruppe 1 bestätigt so gemeinsam mit den weiter bestimmten positiven Werten der Gruppe 3 das in dieser Gruppe erzielte Behandlungsergebnis.

4. PDI

Dies ist ein Parameter, der in früheren Versuchen (Wipper et al. 2010ab) etabliert worden ist. Er beschreibt den makroskopischen Zustand einer Lunge in Hinblick auf Ödembildung und Kollabierungsfähigkeit der Lunge in der Reperfusion. Eine unzureichende Kollabierung nach der Diskonnektion der Lunge vom Ventilator kann ein Hinweis z.B. für ein interstitielles Ödem, eine Pneumonie oder ein Emphysem sein (Van Raemdonck et al. 2009). Anhand der Bilder in 5.4. kann man die Aussagekraft des PDI zur Beurteilung der Lungenqualität nachvollziehen. Abb. 9 zeigt eine Lunge mit einem PDI von 5. Hier sieht man deutliche Einblutungen, Atelektasen und Ödemausbildung. In der Abb. 10 kann man auch Atelektasen, aber nur leichte Einblutungen und Ödembildung erkennen, was einem PDI von 4 entspricht. Ein PDI von 3 zeigt die Lunge in Abb. 11 mit Zeichen von Atelektasen und einem interstitiellem Ödem. Abb. 12 stellt eine Lunge mit einem PDI von 2 dar; hier sieht man schon eine deutliche Besserung, die sich in sehr geringen Atelektasen und einem sehr geringen Ödem zeigt. Die beste Lunge mit einem PDI von 1 zeigt Abb. 13. Hier sind keine Atelektasen und kein Ödem mehr zu erkennen.

5. Histologie

Anhand der Histologie wurden verschiedene Parameter beurteilt (s. Tab 12). Die Abbildungen in 5.5. zeigen histologische Bilder von Lungen aus allen Versuchsgruppen. Die Bilder wurden so ausgewählt, dass sie beispielhaft die Unterschiede in den relevanten Parametern deutlich machen. Sie repräsentieren in keiner Weise direkt die für die Ergebnisdiskussion wichtigen histologischen Veränderungen. Die Abbildungen zeigen

über die Gruppe 1 und 2 bis zur Gruppe 3 eine wesentliche Besserung. So sieht man in den Abb. 20 und 21 (Gruppe 3) histologische Präparate, die mit einer 1 bewertet worden sind, da keinerlei Schädigungen zu erkennen waren.

Durch eine SPF-Haltung der Schweine und versuchstierärztliche Untersuchungen sollte eine präexistente Lungengesundheit der Versuchstiere sichergestellt werden (Zur Herkunft der Schweine s.4.2.1). Da die Sternotomie erst nach Magensaftaspiration erfolgte, war ein histologischer Ausschluss von präexistenten Entzündungsinfiltraten zu diesem Zeitpunkt aber nicht mehr möglich. Somit kann eine präexistente Pneumonie nicht ausgeschlossen werden, da auch eine SPF Haltung mit entsprechenden Vorschriften und Impfungen keine Garantie für eine Lungengesundheit der Tiere darstellt. Dies ist sicher ein Schwachpunkt dieser Untersuchungen, den man bei der Wertung der Ergebnisse berücksichtigen sollte. Auch der Unterschied in der Charge der Versuchsschweine der hier untersuchten Gruppe 3 zu denen der Vergleichstiere in den Gruppen 1 und 2 stellt einen Schwachpunkt dar, da dies einen unterschiedlichen Infektionsstatus der Tiere zur Folge haben könnte. Auch hier waren Untersuchungen zu dieser Zeit nicht mehr möglich. Weiter konnte nicht geprüft werden, ob das inhomogene Geschlechterverhältnis der Schweine in den drei Gruppen die Ergebnisse beeinflussen konnte.

6. *Wet and Dry Ratio*

Mit dem W/D wird der Flüssigkeitsgehalt der Lungen ermittelt, um einen Rückschluss auf den Ödemgehalt zu ermöglichen.

Die Unterschiede der ermittelten Werte für die drei Gruppen sind zu gering, um statistisch signifikant zu sein. Allerdings zeigt sich in der Histologie ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppe 3 und den anderen beiden Gruppen für das Ödem.

7. MPO

Die Aktivität des Enzyms MPO wird zur Beurteilung des Entzündungsgrades der Lungen herangezogen. Dabei spiegelt die MPO-Freisetzung primär den Aktivierungsgrad u.a. von Leukozyten wider, was aber nicht zwingend eine Korrelation mit absoluten Zellzahlen bedeutet.

MPO ist ein Protein, das hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten und zu einem kleinen Teil auch in Monozyten vorkommt. Werden diese Zellen aktiviert, kommt es zur

Degranulation, wobei MPO freigesetzt wird. MPO oxidiert Chlor zu HOCl. Eine weitere wichtige Eigenschaft von MPO ist die Fähigkeit, NO zu oxidieren (Lau et al. 2006); NO wirkt als wichtiger Vasodilatator.

6.3 Ergebnisse der Antithymozytenglobulin-Applikation

ATG ist ein polyklonales Präparat (Fehr et al. 2008), das bisher bei Transplantationen zur Immunsuppression genutzt wurde. Über den ersten klinischen Einsatz 1967 berichten Pellegrino et al. 2009.

Unter dem Begriff ATG werden polyklonale Antikörper zusammengefasst, die im Wesentlichen über zwei Pfade hergestellt werden können: durch eine Injektion von menschlichen lymphoiden Zellen in Pferde oder Kaninchen. ATG bindet alle T- und B-Lymphozyten, welche dann phagozytiert werden und blockiert die lymphoiden Zelloberflächenrezeptoren (Pellegrino et al. 2009).

In dieser Arbeit wurde ATG-Fresenius® verwendet, das aus Kaninchenblut isoliert wird. (Das aus Pferdeblut gewonnene ATG wird in Deutschland nicht mehr verwendet (Neher, 2015)

Auch Mothy beschrieb in einer Arbeit von 2007 die Wirkungen von ATG. Danach wird der polyklonale Charakter von ATG in folgenden Wirkungen auf das Immunsystem deutlich:

- T-Zellen Abbau in Blut- und peripherem Lymphgewebe durch Komplement-vermittelte Zelllyse, T-Zellen-Aktivierung und Apoptose
- Veränderung von Zelloberflächenmolekülen, die die Leukozythen/Endothel-Wechselwirkung beeinflussen
- Einleitung von Apoptose in B-Zelllinien
- Störung von Wirkmechanismen dendritischer Zellen
- und Aktivierung von regulatorische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen.

Mohty erinnert daran, dass nach mehrheitlicher Anahme die Wirksamkeit von ATG auf seiner ausgeprägten Fähigkeit beruht, T-Lymphozythen des Transplantates oder des Empfängers abzubauen. Er weist aber auch darauf hin, dass nach neueren Untersuchungen ATG nicht nur T-Lymphozythen beeinflusst, sondern auch andere Schlüsselzellen, die an Immunreaktionen beteiligt sind. Andere von Mothy diskutierte Mechanismen beinhalten Veränderungen der Oberflächenadhäsionsmoleküle oder die Expression von chemokinen Rezeptoren.

Nach Mothy haben Adhäsionsmoleküle und Leukozyteninfiltration eine Schlüsselrolle bei I/R (Ischämie/Reperfusionsschaden). Die Wechselwirkung von Leukozyten und Endothelium erfolgen in einer Komplexen Serie von Abläufen, wobei die Leukozyten zunächst an der Oberfläche des Endotheliums haften und dann weiter an der Oberfläche entlangrollen. Dabei werden Entzündungsmediatoren wie Zytokine freigesetzt und das Endothelium verändert sich von einem antiadhäsivem zu einem proadhäsivem Zustand. Diese Vorgänge sind wichtig bei der Auslösung von Abstossungsreaktionen und I/R. ATG enthält Antikörper, die in diese Prozesse eingreifen und so den therapeutischen Effekt von ATG erklären können. Entsprechende Versuche haben eindeutig gezeigt, dass ATG die Abschwächung der Aktivität von Schlüsselmolekülen herbeiführt, die die Leukozyten-Endothelium Wechselwirkungen beeinflussen.

Im Gegensatz zu den bisher üblichen Anwendungen wurde ATG bei den Untersuchungen dieser Arbeit schon im Spender eingesetzt, also vor der Transplantation, um zu zeigen, dass hierdurch eine wesentliche Stabilisierung des Transplantates erreicht werden kann. Auch wenn in dieser Phase der Transplantation nicht das größte Risiko für eine spätere Abstossung nachzuweisen ist, so kann doch zumindest das Gesamtrisiko einer Abstossung möglicherweise positiv beeinflusst werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass bestehende Entzündungsreaktionen mit ITS nicht ausreichend unterdrückt werden können. Um hier dennoch einen Lösungsansatz zu finden, wurde für diese Arbeit der Einsatz von ATG gewählt, weil - wie bereits ausgeführt - aufgrund neuerer Untersuchungen (Mothy et al. 2007) vermutet werden kann, dass ATG nicht allein auf T-Lymphozyten einwirkt, sondern die Entzündungsreaktion auch anderweitig beeinflussen kann. Korom et al. haben dazu in einer Arbeit von 2009 den Einsatz von verschiedenen Immunsuppressiva bei Lungentransplantationen verglichen. Danach sind Steroide und monoklonale Antikörper wie OKT3 aufgrund Ihrer Nebenwirkungen nur begrenzt einsetzbar. Auch Haddad et al. (2005) kamen bereits früher zu dem Schluss, dass polyklonale Antithymozytenantikörper den monoklonalen Antikörpern aufgrund der geringeren Nebenwirkungen überlegen sind. Nebenwirkungen von ATG wie z.B. Spezies-Inkompatibilitäten oder die Bildung von Immunkomplexen, die zur Bindung neutrophiler Granulozyten hätten führen können und für die Disskusion der Ergebnisse dieser Arbeit wichtig sein könnten konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Zur Absicherung der Ergebnisse dieser Arbeit ist hier aber unbedingt eine gezielte weitere Untersuchung angeraten. Andere Nebenwirkungen, wie z.B. eine Infektion

durch Immunsuppression, die z. B. von Neher und Bielory et al. beobachtet wurden, scheinen hier weniger relevant (Neher, 2015; Bielory et al. 1988).

Transplantierte Organe werden durch Ischämie und später durch die Reperfusion geschädigt. Vor und nach der Reperfusion führt die Freisetzung von Mediatoren zur Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge und zu einem Anstieg der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (de Perrot et al. 2003). ATG blockiert die Adhäsionsmoleküle (Beiras-Fernandez et al. 2009), die für die Transmigration der Entzündungszellen notwendig sind. Eine Leukozytenmigration ins Lungengewebe des Spenders ist damit inhibiert, wodurch diese nicht in den Empfänger übertragen werden können.

Fehr et al. (2008) sehen den Grund für das Risiko einer akuten Abstossung in der unmittelbar posttransplantären Phase. Durch die Organtransplantation gelangen Leukozyten des Spenders in den Organismus des Empfängers. Diese können lymphatische Organe erreichen und dort T-Zellen des Empfängers aktivieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beziehen sich auf die Untersuchung der Transplantationsfähigkeit von Lungen, die durch Magensaftaspiration vorgeschädigt sind.

Magensaftaspiration verursacht eine akute Entzündung, die durch eine Infiltration der Lunge mit Neutrophilen charakterisiert wird (Nader et al. 2000).

Nader-Djalal et al. beschreiben in einer Arbeit von 1997 einen biphasischen Verlauf bei einer Lungenschädigung aufgrund von Säureaspiration:

1. Phase: hat ihren Peak 1-2 Stunden nach der Aspiration. Dieser wird durch den direkten Effekt des niedrigen pH-Wertes der Säure auf die Zellen am Alveolarseptum und durch die Stimulation von Capsaicin-sensitiven Nerven verursacht.

2. Phase: hat einen Peak nach 4-6 Stunden, hervorgerufen durch Infiltration der Alveolen und des Interstitium mit Neutrophilen Granulozyten.

Durch die Säure kommt es zu einer Schädigung der Alveolarsepten, wodurch ein interstitielles Ödem entsteht. Durch die Entstehung des Ödems werden wichtige Parameter der Lungenfunktion, wie die Compliance, der Gasaustausch und die W/D beeinträchtigt.

In ihrer Arbeit von 2000 beschreiben Nader et al. diese Phänomene bereits vertiefend. Eine Schädigung durch Magensäure führt zu einer erhöhten Permeabilität von Proteinen und einer erhöhten W/D, einer Erniedrigung der Compliance, einer erhöhten MPO Aktivität und einer

gesteigerten Infiltration mit Neutrophilen. Sie führt weiter zu einer gesteigerten Proteinexudation und Obliteration der Alveolen.

In dieser Arbeit wurde an Stelle von Magensaft ein Magensaft/Blut-Gemisch verwendet. Entsprechende Schädigungen sollten daher weniger ausgeprägt als bei Magensaftaspiration auftreten. Dennoch kann wohl gesagt werden, dass die oben zitierten Aussagen mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang stehen. Durch die Gabe von ATG Fresenius® scheint die Infiltration mit Leukozyten abgeschwächt zu werden. Auch wenn die beobachteten W/D der drei Versuchsgruppen sich nicht statistisch signifikant unterscheiden, lassen die auf andere Art bestimmten Ödemwerte die Aussage zu, dass Gruppe 3 den niedrigsten Ödemgehalt aufweist (s Abb.14 und 15). Wegen der geringen Ausprägung dieser Ergebnisse im W/D ist jedoch eine weitere Absicherung der Beobachtungen erforderlich, da diese Diskrepanz hier nicht einfach erklärt werden kann.

Eine erhöhte vaskuläre Permeabilität kann Ödeme verursachen. Zu einer Permeabilitätsstörung kommt es durch Entzündungsmediatoren, wie z.B. Leukotrinen, Zytokinen und vasoaktiven Aminen, welche von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten und Endothelzellen freigesetzt werden.

Der Einsatz von ATG in dieser Arbeit weist auf eine verminderte Ödembildung hin. Dies kann durch die bereits diskutierte reduzierte Extravasation von neutrophilen Granulozyten und eine entsprechend verringerte entzündungsbedingte Permeabilitätsstörung erklärt werden.

Auch die Auswertung der Compliance stimmt von der Tendenz hiermit überein; die erste Gruppe hat die niedrigste Compliance. Bei diesem Parameter ist gut zu sehen, dass es in der dritten Gruppe, in der bereits zu Beginn ATG gegeben wurde, das heißt noch im Spender, am Anfang der Rekonditionierung zu einer wesentlich besseren Compliance kommt als in den anderen beiden Gruppen. Dieses bestätigt unsere Hypothese, dass die ATG-Gabe schon im Donor eine bessere Lungenfunktion aufrechterhält.

Die Auswertung des Gasaustausches zeigt einen besseren Wert in der zweiten und dritten Gruppe im Vergleich zur ersten Gruppe.

Am deutlichsten werden die Unterschiede der drei Versuchsgruppen an den MPO Ergebnissen. Die gemessene MPO Aktivität im Rahmen dieser Arbeit zeigt extreme Unterschiede der dritten Gruppe zu den anderen beiden Gruppen. In allen Lungenlappen ist die MPO Aktivität der dritten Gruppe signifikant geringer. Dieser extreme Unterschied deutet darauf

hin, dass in der Gruppe 3 mit ATG Gabe eine Transmigration von neutrophilen Granulozyten inhibiert wird.

Hier ist sicher kritisch zu hinterfragen, warum die MPO Ergebnisse sich deutlich signifikanter voneinander unterscheiden als unsere weiteren Untersuchungen. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die MPO-Freisetzung primär den Aktivierungsgrad u.a. von Leukozyten widerspiegelt und nicht unbedingt eine Korrelation mit absoluten Zellzahlen zu erwarten ist. Eine Reduktion der Zellzahlen wird aber im LIS qualitativ deutlich. In Absprache mit der Abteilung für Pathologie wurde bewusst auf eine quantitative Auswertung mittels Auszählung verzichtet. Zum einen kann die Verteilung spezifischer Zellen auch innerhalb eines Präparates sehr inhomogen sein und dadurch nicht repräsentativ, zum anderen hat der LIS den Vorteil, dass neben zellulären auch strukturelle Aspekte berücksichtigt werden können.

Dennoch sollten weitere Untersuchungen zur Absicherung des vermuteten ATG Effektes angestellt werden. Insbesondere sollten zukünftige Forschungen auch zeigen, ob es durch Spezies-Inkompatibilitäten zwischen dem aus Immunglobuinen von Kaninchen hergestellten ATG's evtl. zur Bildung von Immunkomplexen kommen könnte, wodurch möglicherweise Ergebnisse unerwartet beeinträchtigt werden.

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den Werten des PVR wider, da durch das Fehlen von MPO im Gewebe NO nicht oxidiert wird und daher voll bioverfügbar ist und vasodilatatorisch wirken kann.

Die histologischen Ergebnisse lassen auch eine bessere Lungenfunktion der Gruppe 3 im Hinblick auf ein Ödem und eine Infiltration erwarten. Die Unterschiede beim Ödem zwischen den Gruppen 1 und 2 und Gruppe 3 sind hochsignifikant (vergleiche Abb. 15). Die Wirkung von ATG scheint also bei diesen histologischen Auswertungen stark ausgeprägt. Es ist deutlich, dass die ATG-Gruppe auch hier relativ am besten zu bewerten ist. Bei der W/D sind die Unterschiede zwar statistisch nicht signifikant, im Trend erscheint Gruppe 3 aber am besten. Auch der PDI zeigt eine ausgeprägtere Besserung der Gruppe 3 im Gegensatz zur Gruppe 2.
Auch die Alveolarsepten zeigen in der histologischen Auswertung in der Gruppe 3 die besten Werte. Die Abb. 18 und 19 in 5.5. zeigen die Histologie von Lungen der Gruppe 2; hier ist ein deutliches interstitielles Ödem zu sehen. Dagegen ist in den Abb. 20 und 21 kein Ödem zu erkennen. Diese Abbildungen zeigen die Histologie der Gruppe 3.
Bei der alveolären wie auch der interstitiellen Infiltration sieht man eine Abstufung von der

Gruppe 1 bis zur Gruppe 3. Dies bestätigt die Folgerung aus der Auswertung der anderen Parameter, dass durch intensivmedizinische Maßnahme und einer zusätzlichen ATG Applikation eine Transmigration von neutrophilen Granulozyten reduziert werden kann.

Die doch extremen Unterschiede zwischen den histologischen Auswertungen und dem W/D bzw. der MPO-Aktivität können hier nicht eindeutig geklärt werden. Das Gesamtergebniss dieser Arbeit sollte daher entsprechend kritisch gesehen werden. Zwar zeigen alle Auswertungen vom Trend her Vorteile für Gruppe 3, allerdings nicht in allen Parametern signifikant im Vergleich zur Gruppe 2.

6.4 Ischämie/Reperfusionsschaden

Durch die mit einer Transplantation verbundene Ischämie mit anschließender Reperfusion kommt es zu weiteren Schädigungen des Transplantates. I/R ist ein allgemein genutzter Ausdruck, um die Ereignisse zusammenzufassen, die zu einer Dysfunktion des Transplantates führen (van Raemdock et al. 2003). I/R führt zu Schäden des Gewebes und zu einer Infiltration von Entzündungszellen (Keshavjee et al. 2005). Es kommt innerhalb der ersten 72 Stunden *post transplantationem* zu einer Schädigung der Alveolen, zu einem Lungenödem und Hypoxämie (de Perrot et al. 2003).
Mittlerweile wurden Konservierungslösungen gezielt entwickelt, um einen I/R Schaden einzudämmen. So konnte durch die Entwicklung von Perfadex® das Auftreten von I/R von 30 % auf 15 % und weniger reduziert werden (de Perrot et al. 2003). Perfadex® ist eine kolloidosmotische Elektrolytlösung, die gepuffert ist und eine niedrige extrazelluläre Kaliumkonzentration aufweist. Mit dieser Zusammensetzung ist es die einzige Konservierungslösung, die speziell für die Lungentransplantation entwickelt wurde (de Perrot et al. 2003).
Trotz dieser Entwicklung kommt es bei 10 % - 20 % der Patienten zu einer Schädigung der Lungen durch Ischämie und Reperfusion, welche nach wie vor der Hauptgrund für eine frühe Mortalität sind (Lee et al. 2009). Lee et al. heben in diesem Zusammenhang hervor, dass die Zusammensetzung der Konservierungslösungen inzwischen so optimiert worden ist, dass längere Ischämiezeiten nach der Transplantation gewährleistet werden können. In seinem Übersichtsartikel betont Lee weiter, dass extrazelluläre Lösungen (wie z.B. Perfadex) am effektivsten die hauptsächlichen Dysfunktionen des Transplantates verhindern. Ganesh et al. haben 2007 allerdings noch in einer verlängerten Ischämiezeit das Risiko einer wachsenden Abstossungswahrscheinlichkeit gesehen, wie auch Thabut in einer älteren Arbeit von 2005.

Die Ischämiezeiten bei der Versuchsgruppe, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, waren relativ kurz (s. Tab. 10); die Ischämiezeiten der Vergleichsgruppen lagen leider nicht vor. Laut einer Studie von Moffatt-Bruce (2009b) kann mit den gegenwärtigen Techniken eine zufriedenstellende Transplantatfunktion bei einer Ischämiezeit von bis zu 6-8 Stunden erwartet werden. Damit wurden die Ischämiezeiten der Versuchsgruppen dieser Arbeit bewusst deutlich unterhalb der allgemein tolerierten Ischämiezeit gehalten. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass keine zusätzlichen Ischämieschäden auftreten.

Laut Moffatt-Bruce (2009) sind die üblichen Konservierungslösungen Euro-Collin, University of Wisconsin Lösung und Perfadex®, wobei eine Reihe von Autoren die positiven Effekte von Perfadex® in der Lungentransplantation betont.
Nach Chien et al. (2000) zeigen Lungen, die mit einer Perfusionslösung mit einer niedrigen Kaliumkonzentration gespült werden, die besten Funktionen, im Vergleich zu Euro-Collin, University of Wisconsin und Krebs-Henseleit Lösungen.
Auch in meinen Versuchen wurde eine Perfusion mit circa 4 °C kalter Perfadex® Lösung durchgeführt. Dabei wurde eine antegrade sowie eine retrograde Perfusion durchgeführt. Der Vorteil einer retrograden Perfusion liegt darin, dass Zellen und Thromben rückwärts ausgeschwemmt werden, die sonst im Kapillarbett hängen geblieben wären. Laut de Perrot et al. (2004) führt eine zusätzlich zur antegraden Perfusion durchgeführte retrograde Perfusion zu einer besseren Funktion des Transplantates.

Die Arbeitshypothese zum potentiellen Einfluss von ATG beruht auf weiteren Erkentnissen zum Wesen von I/R. Insbesondere zeigt Abb. 24 den vielfältigen Einfluss des Donors auf I/R.

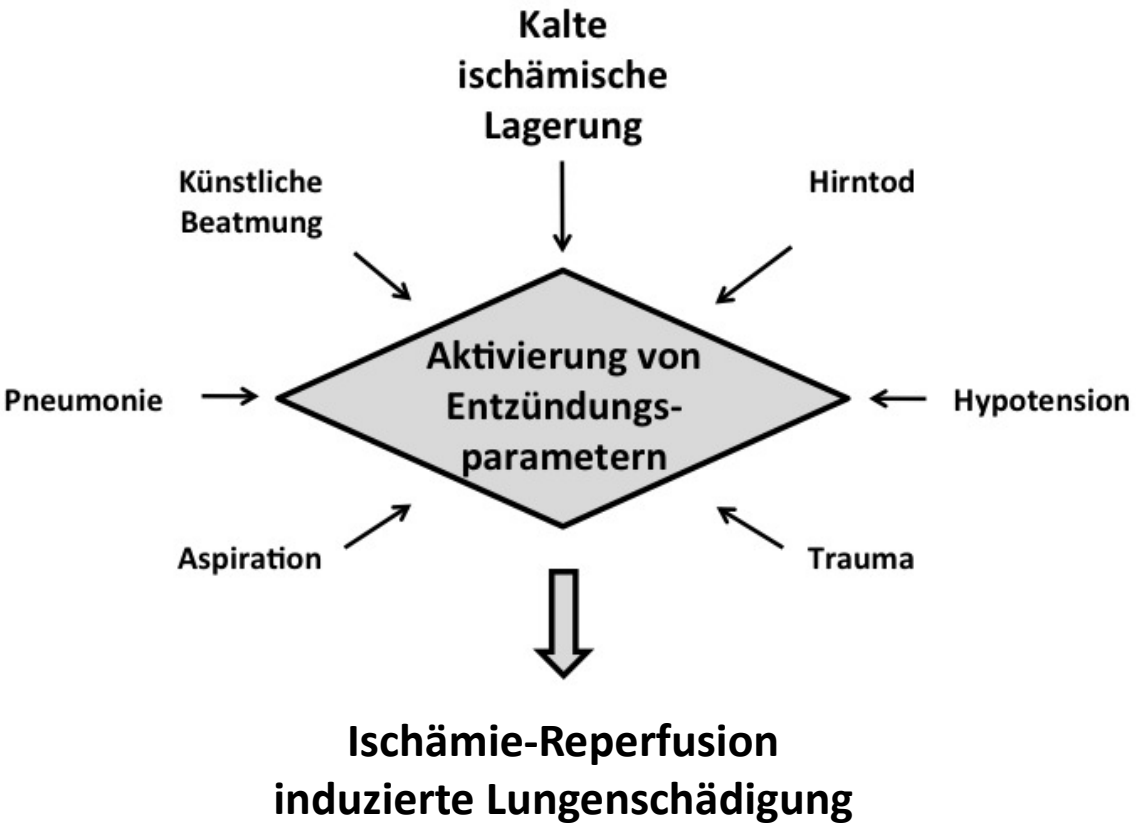


Abb. 24: Donoreinfluss auf Ischämie/Reperfusion induzierte Lungenschädigung (nach de Perrot et al. 2003)

Durch I/R kann das Risiko einer akuten Abstossung erhöht sein; es kann zudem zu einer Dysfunktion des Transplantates kommen und somit die Langzeitüberlebenschance beeinträchtigt werden (de Perrot et al. 2003). Die Studie von Fiser et al. (2002) zeigt, dass durch I/R das Risiko einer BO (*bronchiolitis obliterans*) erhöht ist. In einer anderen Arbeit weisen Fiser et al. darauf hin, dass die Schäden durch Ischämie und Reperfusion durch die Erhöhung von Entzündungsmediatoren nach einer Reperfusion zustande kommen (Fiser et al. 2001). Durch die Entzündungsmediatoren kommt es zu einer Aktivierung der Spender- und Empfänger-Leukozyten nach der Reperfusion (de Perrot et al. 2003).

Die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Lungenendothelium steigt während der Ischämie. Eine Blockade der Adhäsionsmoleküle während der Reperfusion kann einen Reperfusionsschaden reduzieren (de Perrot et al. 2003). Unsere Ergebnisse sind hiermit im Einklang. Anhand der Ergebnisse aller drei Gruppen dieser Arbeit sieht man zu Beginn der Reperfusion einen Abfall der Compliance und einen Anstieg der PVR, das als Folge einer

Ischämie-Reperfusion erklärt werden kann. In Gruppe 3 sind diese Veränderungen weniger ausgeprägt, was unsere Hypothese unterstützt, dass durch die ATG Gabe im Donor eine Besserung des Transplantates erreicht werden kann.

Im Verlaufe der Reperfusion sieht man in der ATG Gruppe für die Compliance, für die PVR, beim PDI, der W/D und POC eine deutliche Besserung gegenüber der Gruppe 1 und bessere Ergebnisse (bis auf POC) gegenüber der Gruppe 2, da durch die Gabe von ATG die Expression von Adhäsionsmolekülen inhibiert wird (Beiras-Fernandez et al. 2009).

Auch die Auswertung der Histologie bestätigt dies. In allen untersuchten Parametern zeigt die Gruppe 3 die besten Werte, auch wenn nicht für alle Ergebnisse statistische Signifikanz nachgewiesen werden konnte. Da die Unterschiede zur Gruppe 2 zum Teil sehr gering erscheinen, bis auf die bezüglich der MPO Aktivität, bleibt zu klären, ob eine denkbare Bildung von Immunkomlexen durch die ATG Gabe die Neutrophilen an anderen Orten bindet und dadurch die besseren Werte für Gruppe 3 zustande kommen.

Die Auswertung der MPO Aktivität liefert einen Hinweis auf die Gültigkeit unserer Arbeitshypothese. Hier sind die Unterschiede der Messergebnisse für die drei Versuchsgruppen extrem ausgeprägt. Die Leukozytenkonzentration in den Lungenlappen mit ATG Gabe sind danach signifikant geringer als in den anderen Proben.

Die Arbeitshypothese dieser Arbeit, nach der eine ATG Gabe bereits vor der Reperfusion wirksam ist, wird vor allem gestützt durch die Ergebnisse für die Compliance und den PDI. Für Gruppe 3 zeigt die Compliance bereits vor der Reperfusion den besten Wert, der PDI für Gruppe 3 übertrifft zu Beginn der Reperfusion (Zeitpunkt der Messung) ebenfalls die Werte der anderen Gruppen.

Ob Neutrophile in der Entwicklung des Reperfusionsschadens beteiligt sind, ist umstritten. Kuhnle et al. (1998) führen auf, dass nach einer Ischämie und Reperfusion Leukozyten in den alveolären Kapillaren, Arterien und Venen zu finden sind. Uthoff et al. haben dies bereits in einer Arbeit von 1995 beschrieben. Diese Arbeit sagt aus, dass durch die Unterdrückung von neutrophilen Granulozyten auch der Reperfusionsschaden unterdrückt werden kann. Dagegen zeigten Steimle et al. 1992 in einer Arbeit, dass Neutrophile nicht nötig sind, um eine Schädigung durch I/R auszulösen.

Die in dieser Arbeit bestimmte niedrige MPO Aktivität deutet darauf hin, dass es möglich sein könnte, durch die Gabe von ATG Fresenius® eine Transmigration von neutrophilen

Granulozyten und somit einen Reperfusionsschaden einzudämmen. Im Zusammenhang mit den weiteren Beobachtungen wird allerdings wie bereits ausgeführt angeraten, den vermuteten ATG Effekt weiter abzusichern.

Einer der Schädigungsmechanismen von neutrophilen Granulozyten beruht auf der Bildung von Sauerstoffradikalen, welche das Parenchym schädigen. Eine weitere Folge der Schädigung durch Neutrophile ist die Bildung von Proteasen, die ebenfalls das Parenchym angreifen. Desweiteren sind aktivierte Neutrophile weniger flexibel, so dass sie in den Kapillaren eingeschlossen werden und zu einem verminderten Blutfluss während der Reperfusion führen (Fiser et al. 2001).

Viele Studien zeigen, dass die frühe Phase der Reperfusionsschäden durch Makrophagen und die spätere Phase durch neutrophile Granulozyten verursacht wird. Fiser et al. konnten dies in einer Arbeit von 2001 auch bestätigen. Sie stellten bei Messungen der MPO Aktivität fest, dass diese nach zwei Stunden Reperfusion wesentlich höher ist als nach 30 Minuten, d.h. mit verlängerter Reperfusionsdauer ansteigt.

Der Arbeitskreis von de Perrot (2003) führt auf, dass die I/R einen biphasischen Verlauf hat, wobei die frühe Phase durch Makrophagen des Spenders, die während der Ischämie aktiviert werden, charakterisiert wird, während die späte Phase durch Lymphozyten und Neutrophile Granulozyten des Empfängers charakterisiert wird.

Die Ergebnisse der Messung der MPO Aktivität dieser Arbeit zeigen eine signifikante Reduzierung in der dritten Gruppe. Da durch ATG die Expression der Adhäsionsmoleküle inhibiert wird und somit eine Migration der Neutrophilen Granulozyten in das Lungengewebe verhindert wird, können diese kein MPO und Sauerstoffmetaboliten im Gewebe freisetzten. Wenn dieser Zusammenhang auch hier zutrifft, wären die Folgen der Reperfusion dadurch wirkungsvoll reduziert.

6.5 Maßnahmen zur Stabilisierung der Stickoxid-Verfügbarkeit

Durch die Verhinderung der Leukozytentransmigration wird ein Verbrauch des Vasodilatators NO unterdrückt.
Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass die Reperfusion zu einem NO Defizit führt. NO beeinflusst den pulmonalen vaskulären Tonus und die Neutrophilen- und Thrombozyten-Adhäsion (Liu et al. 2000). Daher wird während der Reperfusion in der Regel NO zugeführt.

In den Gruppen 2 und 3 wurde auch von uns eine NO-Beatmung als intensivmedizinische Massnahme durchgeführt, um eine ausreichende Vasodilatation zu gewährleisten und somit einen erhöhten PVR zu verhindern. Wie bereits ausgeführt, steigt der PVR zu Beginn der Reperfusion an, da sich ein Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R) manifestiert und es zu der Ausbildung von Lungenödemen kommt. Laut einer Studie von Macdonald et al. (1995) steigt der PVR immer während akuter Reperfusionsschäden an. Dieses Verhalten ist weitgehend zurückzuführen auf einen Verlust der NO abhängigen Relaxation.
In den intensivmedizinisch behandelten Gruppen 2 und 3 ist dieser Anstieg geringer als bei der Gruppe 1. Gruppe 3 mit zusätzlicher ATG Gabe zeigt den geringsten Anstieg. Anschließend fallen die Werte wieder etwas ab. Dies ist damit zu erklären, dass zu Beginn der Reperfusion die Lungen noch nicht vollständig entfaltet sind. Nach einiger Zeit lösen sich die Atelektasen auf und die Lungen entfalten sich, so dass der PVR fällt.

Über den Einsatz einer Inhalation mit Stickstoffmonoxid als Vasodilatator bei Patienten wurde das erste Mal, nach Tierexperimenten, 1991 berichtet. Hier wurde durch die Inhalation von NO die selektive vasodilatierende Wirkung auf die Lunge bestätigt. Es wurde eine Verbesserung des Gasaustausches sowie eine Senkung des pulmonalarteriellen Drucks beobachtet (Zwissler 2002).
Auch Liu et al. (2000) bestätigen, dass die Inhalation mit NO einen positiven Effekt auf den Gasaustausch und die Transplantatfunktion hat. Liu et al. weisen auch darauf hin, dass ein Defizit an NO beteiligt ist an der Pathophysiologie einer Transplantatschädigung nach I/R. Daher weisen transplantierte Lungen ein NO-Defizit auf.
In einer Veröffentlichung von Thabut et al. (2001) wird beschrieben, dass durch die Inhalation mit NO während und vor der Reperfusion I/R inhibiert wird.
Auch Ardehali und sein Arbeitskreis (2001) bestätigen, dass eine Beatmung mit NO zu Beginn der Reperfusion den Gasaustausch verbessert und den pulmonalarteriellen Druck senkt.
Dies wurde von Van Raemdonck et al. (2004) bestätigt, welcher eine Behandlung von einem Ischämie Reperfusionsschaden durch NO Inhalation beschreibt.
Lee et al. (2009) betonen ebenfalls die positiven Wirkungen einer Beatmung mit NO, wie Vasodilatation, kapilläre Integrität und Schutz vor einer Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten-Aggregation. Allerdings führt de Perrot et al. in einer Studie von 2003 an, dass die mildernde Funktion einer NO-Inhalation auf I/R umstritten ist. Lee et al. (2009) bezweifeln, dass eine Inhalation mit NO eine effektive Massnahme für eine Verhinderung einer

Abstossungsreaktion ist. Offentsichtlich sind weitere Forschungsberichte erforderlich, um die Wirkung einer NO-Beatmung zweifelsfrei nachzuweisen.

Ein Mangel an NO führt zu einem erhöhten PVR. In den PVR-Messungen dieser Arbeit zeigt sich, dass der erwartete NO Mangel in unseren Versuchsgruppen variiert. In der ersten Versuchsgruppe wurde keine NO-Beatmung durchgeführt. Der PVR ist hier am höchsten. In Gruppe 2 mit NO Beatmung bleibt der PVR immer noch höher als in der dritten Gruppe. Die dritte Gruppe, in der ATG angewendet wurde, hat den niedrigsten PVR. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch das ATG eine Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe verhindert wird, wodurch kein MPO im Gewebe von den neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden kann, das NO verbraucht. Somit sollte die Bioverfügbarkeit von NO deutlich höher sein als nur bei Inhalation von NO, so dass das NO seine vasodilatatorische Wirkung voll entfalten kann. Die Ergebnisse der Messungen der MPO Aktivität bestätigen diese Annahme. Die dritte Gruppe weist hochsignifikant geringere Werte auf im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Allerdings wird der diskutierte NO-Effekt auf den PVR durch unsere Messungen nicht bestätigt. Gruppe 2 und 3 unterscheiden sich im PVR nicht signifikant. Eine Erklärung kann hier nicht gegeben werden.

7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Rekonditionierung von Spenderlungen, die durch Aspiration mit einem Magensaft/Blut-Gemisch vorgeschädigt sind, mit Hilfe von einer intensivmedizinischen Behandlung (NO-Beatmung, ACC, Antibiotika und Methylprednisolon) und ATG-Gabe verbessert werden könnte. Insbesondere scheint die Behandlung mit ATG im Donor und zusätzlich während der Reperfusion nach den vorliegenden Ergebnissen eine deutlichen Reduzierung von Inflammationserscheinungen in der Spenderlunge zu bewirken. Dies zeigt sich an der Bestimmung der MPO-Aktivität, die einen Rückschluss auf die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zulässt. Auch der PVR, die Bildung eines Lungenödems und die Compliance zeigen in der Gruppe mit ATG Behandlung bessere Werte im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Auch die makroskopische und histologische Beurteilung der Lungen bestätigen dieses. Im Anschluss an die Untersuchungen von Wipper et al. (2009ab) ist es damit gelungen, die bereits aufgezeigten Möglichkeiten zur Rekonditionierung von vorgeschädigten Lungen möglicherweise noch zu erweitern.

Estenne et al. (2002) haben bereits darauf hingewiesen, dass effektive Therapien Organfunktionen erhalten können, wenn sie nur früh genug angewendet werden. Sie haben diese grundsätzliche Aussage auf Lungentransplantationen übertragen und postuliert, dass der Einfluss von Risikofaktoren für eine Organabstossung durch eine verstärkte immmunsuppressive Therapie reduziert werden könnte. Allerdings ist dieser Ansatz bisher nicht umgesetzt worden, unter anderem wegen der bekannten Risiken einer hohen Dosierung von Immunsuppressiva. Unser Vorschlag einer ATG Applikation bereits im Donor ist ein möglicher Weg, um diese Problematik zu umgehen.

Auch wenn letztendlich eine spenderspezifische Toleranz das Ziel der Immunsuppression bleibt, so besteht der Wert der hier entwickelten Behandlung mit ATG vor allem darin, einen weiteren Schritt auf diesem Weg voranzukommen. Weitere Untersuchungen zur Absicherung der Methode sind sicher erforderlich. Dabei sollte auch geklärt werden, ob die ATG Gabe bereits im Donor dazu führen kann, Belastungen des Empfängers bei der Folgebehandlung mit weiteren Immunsuppressiva durch eine Reduzierung der Dosen zu ermöglichen. Weiter ist es erforderlich, potentielle Nebenwirkungen von ATG auszuschließen, wie z. B. Spezies-Inkompatibilitäten. Auch wenn viele der zitierten Arbeiten am Tiermodell Schwein durch-

geführt wurden, bleibt nachzuweisen, ob eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen ohne Einschränkungen möglich ist.

8 Zusammenfassung

Untersuchungen zur Wirkung von Antithymozytenglobulin bei der Rekonditionierung von mit Magensaft/Blut-Gemisch vorgeschädigten Spenderlungen

Anja Elena Störmer

Für Patienten mit schweren Lungenerkrankungen ist eine Lungentransplantation oft die letzte Therapiemöglichkeit. Leider versterben jedoch viele Patienten, während sie auf eine Lunge warten. Der Mangel an Spenderlungen liegt aber nicht nur an einer zu kleinen Anzahl von Spendern: der überwiegende Teil der Spenderlungen muss bisher als nicht transplantabel eingestuft werden. Daher sollte es ein vorrangiges Ziel bleiben, den Spenderpool für Lungentransplantationen zu erweitern.
Es gibt bereits viele Ansätze dieses zu tun. Verschiedene Konservierungstechniken wurden entwickelt, damit Spenderlungen auch von herztoten Spendern verwendet werden können, so genannten *Non Heartbeating Donors*. Eine große Anzahl weiterer Untersuchungen beschäftigt sich mit der Rekonditionierung von Lungen, die nach den zurzeit akzeptierten Kriterien als nicht transplantabel gelten. Dabei hat der Einsatz von Immunsuppressiva entscheidend zur Erfolgsgeschichte der Lungentransplantation beigetragen.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Rekonditionierung vorgeschädigter Spenderlungen zu leisten. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Untersuchung des Einflusses von Antithymozytenglobulin auf die Rekonditionierung von durch Aspiration eines Magensaft/-Blut-Gemisches vorgeschädigten Lungen.

Frühere Studien haben sich bereits mit der Rekonditionierung von durch Magensaftaspiration vorgeschädigten Lungen beschäftigt, ohne dabei allerdings einen zu hohen pulmonalen vaskulären Widerstand, eine zu niedrige Compliance und die Entstehung eines Ödems verhindern zu können.

Die Versuche dieser Arbeit wurden an deutschen Hausschweinen, *sus scrofa domestica*, durchgeführt. Durch eine intratracheale Injektion eines Magensaft-Blut-Gemisches wurde die Schädigung der Lunge durch Magensaftaspiration nachgebildet. Die Ergebnisse unserer Versuche an sieben Tieren (Gruppe 3) wurden mit zwei Versuchsgruppen (Gruppe 1 und 2)

mit sechs beziehungsweise sieben Versuchstieren verglichen (Die früher ermittelten Versuchsdaten zu diesen zwei Versuchsgruppen wurden von Frau Dr. S.Wipper zur Verfügung gestellt.). Die Lungen der ersten Gruppe wurden über sechs Stunden *ex vivo* rekonditioniert. In der zweiten Gruppe wurden die Lungen zusätzlich mit intensivmedizinischen Maßnahmen (Stickoxid-Beatmung, Acetylcystein, Antibiotika und Methylprednisolon) stabilisiert. Die dritte Gruppe war identisch zur zweiten Gruppe, nur wurde hier zusätzlich Antithymozytenglobulin (ATG Fresenius®) eingesetzt, welches die Lungen noch weiter stabilisieren sollte.

Die Arbeitshypothese dabei war, dass der Spenderpool von Lungen erweitert werden kann, indem man die entzündungshemmende Wirkung von Antithymozytenglobulin nutzt, um den Erfolg der bereits früher gezeigten intensivmedizinischen Maßnahmen bei der Rekonditionierung von durch Magensaftaspiration vorgeschädigte Lungen so zu steigern, dass so behandelte Lungen in größerem Umfang als transplantabel eingestuft werden können. Hervorzuheben dabei ist, dass die Antithymozytenglobulingabe bereits im Spender erfolgt und *ex vivo* wiederholt wird. Bisher war es bei Lungentransplantationen nur üblich, eine Antithymozytenglobulingabe in den ersten Tagen *post transplantationem* zu verabreichen, um dem in diesem Zeitraum vermuteten größten Abstossungsrisiko entgegen zu wirken.

Zur Beurteilung der Transplantabilität der Spenderlungen wurden verschiedene hämodynamische Parameter (Compliance, pulmonaler vaskulärer Widerstand, pulmonaler Oxygenierungsgrad), eine makroskopische Beurteilung der Lungenqualität, eine *wet/dry ratio* Bestimmung, histologische Untersuchungen und eine Messsung der Myeloperoxidase Aktivität durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf die Richtigkeit unserer Arbeitshypothese hin. Vor allem die Auswertung der Myeloperoxidase Aktivität deutet auf eine Erhöhung der Transplantabilität von Lungen der Gruppe 3 im Vergleich zu denen der anderen beiden Gruppen hin.

Es konnten so Hinweise darauf erarbeitet werden, dass durch eine Antithymozytenglobulin Applikation noch im Donor eine signifikante Stabilisierung des Transplantates erreicht werden kann. Die Versuchsergebnisse stützen die Annahme eines positiven Antithymozytenglobulin-Einflusses bei Verabreichung *in vivo* und *ex vivo*. Zukünftige Arbeiten sollten weitere Nachweise für die Gültigkeit der Beobachtungen liefern und klären, ob diese Rekonditionierungstechnik eine erfolgreiche Transplantationen von Spenderlungen erlaubt

und ob eine akute und eventuell auch chronische Abstossung der transplantierten Lunge durch dieses Verfahren inhibiert werden kann.

9 Summary

Studies to explore the effect of anti-thymocyte globulin on the reconditioning of donor lungs injured by a gastric acid/blood-mixture aspiration

Anja Elena Störmer

Lung transplantation is often the only therapeutic option left to patients with serious lung diseases. Unfortunately, however, many patients die while waiting for a donor lung. The shortage of donor lungs is not only the result of a too small number of donors: the quality of the major share of donor lungs must still be considered as insufficient for transplantation. Therefore the prime objective is to extend the pool of suitable donor lungs for transplantation.
A variety of efforts have been undertaken to pursue this goal. Various preservation techniques were developed to allow transplantation of lungs from Non Heartbeating Donors. Many other studies have been focusing on the reconditioning of lungs that are not considered transplantable according to the currently accepted criteria. In addition the application of immunsuppressiva has been a key contribution to the growing success story of lung transplantation.

The objective of this study was to contribute to the reconditioning of pre-injured donor lungs with a focus on the effect of anti-thymocyte globulin on the reconditioning of lungs that were injured by aspiration of a gastric acid/blood-mixture.

The reconditioning of gastric acid injured lungs was already studied earlier. It appeared impossible, however, to prevent a too high pulmonary vascular resistance, a too low compliance or the formation of edema.

This study was done with domestic pigs, *sus scrofa domestica*. Lung injury by gastric acid was induced by intratracheal injection of a blood/gastric acid mix. Our results from seven pigs (group 3) were compared with results of two test groups (group 1 and 2) of six and seven pigs, respectively (The earlier determined test data for these two groups were provided by Dr. S. Wipper.). Lungs of the first group were reconditioned *ex vivo* for six hours. Lungs of the second group were additionally stabilized by intense medical treatment (nitrogenmonoxide-inhalation, acetylcysteine, antibiotics and methylprednisolone). The third group of lungs was treated like the second group but with an additional application of ATG Fresenius® for further stabilization.

As working hypothesis it was postulated that the pool of donor lungs could be enlarged by exploiting the anti-inflammatory effect of anti-thymocyte globulin. Anti-thymocyte globulin application should allow to further improve the effect of earlier demonstrated intense medical measures to recondition gastric acid injured lungs to an extent that such lungs could be considered transplantable at a higher rate. It must be emphasized that anti-thymocyte globulin is applied in the donor already and that another dose is given *in vitro*. So far anti-thymocyte globulin was applied in lung transplantation only during the first days *post transplantationem* to mitigate the high rejection risk assumed in this period.

To assess the transplantability of the treated lungs a number of hemodynamic parameters (compliance, pulmonary vascular resistance, pulmonary oxygenation capacity) were determined in addition to a macroscopic rating of lung quality, determination of the wet and dry ratio, histological investigations and myeloperoxydase activity measurements.

The results of this study indicate the validity of our working hypothesis. Particularly the results of the myeloperoxydase activity determination point to improved transplantability of group three lungs over those of the other two groups.

In this way we could find indications that by anti-thymocyte globulin application already in the donor a significant stabilization of the transplant can be achieved. Our results support the assumption of a positive effect of an anti-thymocyte globulin application *in vivo* and *in vitro.*

Future studies should answer the question whether donor lungs with such pre-treatment can be successfully transplanted and whether acute or chronic rejection will be mitigated by the suggested reconditioning method.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Präparation der 6F arteriellen Schleuse und 8F venösen Schleuse.....25

Abbildung 2a: Berechnung des PVR.....28

Abbildung 2b: Berechnung der Compliance.....28

Abbildung 2c: Berechnung des POC.....29

Abbildung 2d: Berechnung des SVR.....29

Abbildung 3: Reperfusionssytem, schematisch.....39

Abbildung 4: Reperfusionssystem.....40

Abbildung 5: Lunge während der Reperfusion.....40

Abbildung 6: Compliance der drei Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf.....54

Abbildung 7: Pulmoal vaskulärer Widerstand der drei Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf.....55

Abbildung 8: Pulmonaler Oxygenierungsgrad der drei Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf.....56

Abbildung 9: Lunge mit einem Pulmonalen Deflationsindex von 5.....57

Abbildung 10: Lunge mit einem Pulmonalen Deflationsindex von 4.....58

Abbildung 11: Lunge mit einem Pulmonalen Deflationsindex von 3.....59

Abbildung 12: Lunge mit einem Pulmonalen Deflationsindex von 2.....59

Abbildung 13: Lunge mit einem Pulmonalen Deflationsindex von 1.....60

Abbildung 14: Pulmonaler Deflationsindex der drei Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf während der Reperfusion.....61

Abbildung 15: Histologie der beurteilten Parameter der drei Versuchsgruppen.....62

Abbildung 16: Histologie, Gr. 1, 100er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin Färbung.....63

Abbildung 17: Histologie, Gr. 1, 400er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin Färbung.....64

Abbildung 18: Histologie, Gr. 2, 100er Vrgrößerung, Hämatoxylin/Eosin Färbung.....64

Abbildung 19: Histologie, Gr. 2, 400er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin Färbung.....65

Abbildung 20: Histologie, Gr. 3, 1ü00er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin Färbung.....65

Abbildung 21: Histologie, Gr. 3 400er Vergrößerung, Hämatoxylin/Eosin Färbung 66

Abbildung 22: *Wet and Dry Ratio* der drei Versuchsgruppen.....67

Abbildung 23: Myeloperoxidase-Aktivitäten der untersuchten Lungenlappen.....68

Abbildung 24: Donoreinfluss auf Ischämie/Reperfusion induzierte Lungenschädigung ...82

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardkriterien für den idealen Spender 6

Tabelle 2: Verwendete Geräte 17

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien 18

Tabelle 4: Verwendete Reaktionskits 19

Tabelle 5: Beatmungsprotokoll in der Aspiration 23

Tabelle 6: Protokoll der Blutgasauswertung 27

Tabelle 7: Versuchsgruppen und Versuchsprotokoll 30

Tabelle 8: Zuordnung der Prae-Proben der Gruppe 3 zu den Versuchstieren 32

Tabelle 9: Zusammensetzung Perfadex® 35

Tabelle 10: Ischämiezeiten der Gruppe 3 36

Tabelle 11: Lungenbewertung nach pulmonalen Deflationsindex (PDI) 45

Tabelle 12: Kriterien zur histologischen Bewertung von Lungen bei unterschiedlichen Vergrößerungen 50

Tabelle 13: Bewertungsskala Histologie 51

12 Literaturverzeichnis

Aigner C., Winkler G., Jaksch P., Seebacher G., Lang G., Taghavi S., Wisser W., Klepetko W. (2005) Extended donor criteria for lung transplantation--a clinical reality. Eur J Cardiothorac Surg 27(5): 757-761

Al-Rawas O., Carter R., Stevenson R., Naik S., Wheatley D. (2000) The alveolar-capillary membrane diffusing capacity and the pulmonary capillary blood volume in heart transplant candidates. Heart 83(2): 156–160

American Heart Association (1985) Position of the American Heart Association on research animal use. Circulation 71(4): 849A-850A

Arcasoy S.M. (2009) Editorial introduction: current state of lung transplantation. Curr Opin Organ Transplant 14(5): 463- 465

Arcidiacono J.A., Evdokimov E., Lee M.H., Jones J., Rudenko L., Schneider B., Snoy P.J., Wei C.-H., Wensky A.K., Wonnacott K. (2010) Regulation of xenogeneic porcine pancreatic islets. Xenotransplant 17(5): 329-337

Ardehali A., Laks H., Levine M., Shpiner R., Ross D., Watson L.D., Shvartz O., Sangwan S., Waters P.F. (2001) A prospective trial of inhaled nitric oxide in clinical lung transplantation. Transplantation 72(1): 112-115

Baldus S., Heeschen C., Meinertz T., Zeiher A.M., Eiserich J.P., Münzel T., Simoons M.L., Hamm C.W. (2003) Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. Circulation 108(12): 1440-1445

Baldus S., Heitzer T., Eiserich J.P., Lau D., Mollnau H., Ortak M., Petri S., Goldmann B., Duchstein H.-J., Berger J., Helmchen U., Freeman B.A., Meinertz T., Münzel T. (2004) Myeloperoxidase Enhances Nitric Oxide Catabolism During Myocardial Ischemia and Reperfusion. Free Radic Biol Med 37(6): 902-911

Baldus S., Rudolph V., Roiss M., Ito W.D., Rudolph T.K., Eiserich J.P., Sydow K., Lau D., Szöcs K., Klinke A., Kubala L., Berglund L., Schrepfer S., Deuse T., Haddad M., Risius T., Klemm H., Reichenspurner H.C., Meinertz T., Heitzer T. (2006) Heparins Increase Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Liberating Vessel-Immobilized Myeloperoxidase. Circulation 113(15): 1871-1878

Barr M.L., Schenkel F.A., Bowdish M.E., Starnes V.A. (2005) Living donor lobar lung transplantation: current status and future directions. Transplant Proc 37(9): 3983-3986

Beiras-Fernandez A. (2004) Influence of Antithymoglobulins on Ischemia/Reperfusion Injuryin perfused non-human primate tissues: Histological and Cytological Investigation. Diss., Ludwig-Maximilans-Universität München

Beiras-Fernandez A., Chappell D., Hammer C., Thein E. (2006) Influence of polyclonal antithymocyte globulins upon ischemia-reperfusion injury in a non-human primate model. Transplant Immunol 15(4): 273-279

Beiras-Fernandez A., Chappell D., Hammer C., Beiras A., Reichart B., Thein E. (2009) Impact of polyclonal anti-thymocyte globulins on the expression of adhesion and inflammation molecules after ischemia-reperfusion injury. Transplant Immunol 20(4): 224-228

Bielory L., Gascon P., Lawley T.J., Young N.S., Frank M.M. (1988) Human serum sickness: a prospective analysis of 35 patients treated with equine anti-thymocyte globulin for bone marrow failure. Medicine 67(1): 40-57

Boehler A., Kesten S., Weder W., Speich R. (1998) Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation: A Review. Chest 114(5): 1411-1426

Boehler, A. (2002) The role of interleukin-10 in lung transplantation. Transpl Immunol 9(2-4): 121-124

Boehler, A. (2004) Stand der Lungentransplantation heute. Schweiz Med Forum 4: 436–442

Burton C.M., Andersen C.B., Jensen A.S., Iversen M., Milman N., Boesgaard S., Arendrup H., Eliasen K., Carlsen J. (2006) The incidence of acute cellular rejection after lung transplantation: a comparative study of anti-thymocyte globulin and daclizumab. J Heart Lung Transplant 25(6): 638-647

Chien S., Zhang F., Niu W., Tseng M.T., Gray L. (2000) Comparison of university of wisconsin, euro-collins, low-potassium dextran, and krebs-henseleit solutions for hypothermic lung preservation. J Thorac Cardiovasc Surg 119(5): 921-930

Cypel M., Rubacha M., Yeung J., Hirayama S., Torbicki K., Madonik M., Fischer S., Hwang D., Pierre A., Waddell T.K., de Perrot M., Liu M., Keshavjee S., (2009) Normothermic ex vivo perfusion prevents lung injury compared to extended cold preservation for transplantation. Am J Transplant 9(10): 2262-2269

Cypel M., Liu M., Rubacha M., Yeung J.C., Hirayama S., Anraku M., Sato M., Medin J., Davidson B.L., de Perrot M., Waddell T.K., Slutsky A.S., Keshavjee S. (2009) Functional repair of human donor lungs by IL-10 gene therapy. Sci Transl Med. 1(4): 4ra9

Cypel M., Yeung J.C., Liu M., Anraku M., Chen F., Karolak W., Sato M., Laratta J., Azad S., Madonik M., Chow C.-W., Chaparro C., Hutcheon M., Singer L.G., Slutsky A.S., Yasufuku K., de Perrot M., Pierre A.F., Waddell T.K., Keshavjee S., (2011) Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. N Engl J Med 364(15): 1431-1440

Cypel M., Keshavjee S., (2012) The clinical potential of ex vivo lung perfusion. Expert Rev Respir Med 6(1): 27-35

De Antonio D. G., de Ugarte A. V. (2008) Present state of nonheart-beating lung donation. Curr Opin Organ Transplant 13(6): 659-663

De Perrot M., Keshavjee S. (2003) Lung transplantation. Lung preservation. Chest Surg Clin N Am. 13(3): 443-462

De Perrot M., Liu M., Waddell T.K., Keshavjee S. (2003) Ischemia-reperfusion-induced lung injury. Am J Respir Crit Care Med 167(4): 490-511

De Perrot M., Weder W., Patterson G.A., Keshavjee S. (2004) Strategies to increase limited donor resources. Eur Respir J 23(3) : 477-482

Egan T.M. (2004) Non-heart-beating donors in thoracic transplantation. J Heart Lung Transplant 23(1) : 3-10 Medicine 67(1) : 40-57

Eiserich J.P., Baldus S., Brennan M.-L., Ma W., Zhang C., Tousson A., Castro L., Lusis A.J., Nauseef W.M., White C.R., Freeman B.A. (2002) Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. Science 296(5577): 2391-2394

Estenne M., Hertz M.I. (2002) Bronchiolitis Obliterans after Human Lung Transplantation. Am J Respir Crit Care Med 166(4): 440-444

Fehr T., Wüthrich R.P. (2008) Monoklonale Antikörpertherapie bei der Organtransplantation. Schweiz Med Forum 8(11): 204-209

Fischer S., de Perrot M., Liu M., MacLean A.A., Cardella J.A., Imai Y., Suga M., Keshavjee S. (2003) Interleukin 10 gene transfection of donor lungs ameliorates posttransplant cell death by a switch from cellular necrosis to apoptosis. J Thorac Cardiovasc Surg 126(4): 1174-1180

Fiser S.M., Tribble C.G., Long S.M., Kaza A.K., Cope J.T., Laubach V.E., Kern J.A., Kron I.L. (2001) Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. J Thorac Cardiovasc Surg 121(6): 1069-1075

Fiser S.M., Tribble C.G., Long S.M., Kaza A.K., Kern J.A., Jones D.R., Robbins M.K., Kron I.L. (2002) Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. Ann Thorac Surg 73(4): 1041-1048

Floreth T., Bhorade S.M. (2010) Current trends in immunosuppression for lung transplantation. Semin Respir Crit Care Med 31(2): 172-178

Ganesh J.S., Rogers C.A., Banner N.R., Bonser R.S. (2007) Does the method of lung preservation influence outcome after transplantation? An analysis of 681 consecutive procedures. J Thorac Cardiovasc Surg 134: 1313-1321

Goligher E.C., Cserti-Gazdewich C., Balter M., Gupta V., Brandwein J.E. (2009) Acute lung injury during antithymocyte globulin therapy for aplastic anemia. Can Respir J 16(2): e3-5

Gottlieb J. (2008) Update on lung transplantation. Ther Adv Respir Dis 2(4): 237-47

Griffith B.P., Haddad M., Poston R.S. (2008) Immunobiology of Heart and Heart-Lung Transplantation. In L. H. Cohn (Ed.), Card Surg Adult 3rd Ed., Vol. 3: 1513-1538

Hachem R.R. (2006) Induction immunosuppression after lung transplantation. Curr Opin Organ Transplant 11(6): 617-620

Hachem R.R., Chakinala M.M., Yusen R.D., Lynch J.P., Aloush A.A., Patterson G.A., Trulock, E.P. (2005) A comparison of basiliximab and anti-thymocyte globulin as induction agents after lung transplantation. J Heart Lung Transplant 24(9): 1320-1326

Hoy A., Leininger-Muller B., Kutter D., Siest G., Visvikis S. (2002) Growing significance of Myeloperoxidase in Non-infectious Diseases. Clin Chem Lab Med 40 (1): 2-8

Inci I., Ampollini L., Arni S., Jungraithmayr W., Inci D., Hillinger S., Leskosek B., Vogt P., Weder W. (2008) Ex vivo reconditioning of marginal donor lungs injured by acid aspiration. J Heart Lung Transplant 27(11): 1229-1236

Ingemansson R., Eyjolfsson A., Mared L., Pierre L., Algotsson L., Ekmehag B., Gustafsson R., Johnsson P., Koul B., Lindstedt S., Lührs C., Sjöberg T., Steen S. (2009) Clinical transplantation of initially rejected donor lungs after reconditioning ex vivo. Clinical Thorac Surg 87 (1): 255-260

ISHLT (2011) Lung Transplantation Overall. J Heart Lung Transplant 30 (10): 1071-1132

Keshavjee S., Davis R.D., Zamora M.R., de Perrot M., Patterson G.A. (2005) A randomized, placebo-controlled trial of complement inhibition in ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in human beings. J Thorac Cardiovasc Surg 129(2): 423-428

Kimizuka K., Nakao A., Nalesnik M.A., Demetris A. J., Uchiyama T., Ruppert K., Fink M.P., Stolz D.B., Murase N. (2004) Exogenous IL-6 Inhibits Acute Inflammatory Responses and Prevents Ischemia/Reperfusion Injury after Intestinal Transplantation. Am J Transplant. 4(4): 482-494

Klinke A. (2009) Bedeutung der Myeloperoxidase für die Migration neutrophiler Granulozyten. Diss., Universitäres Herzzentrum Universität Hamburg

Knoop C., Haverich A., Fischer S. (2004) Immunosuppressive therapy after human lung transplantation. Eur Respir J 23(1): 159-171

Korom S., Boehler A., Weder W. (2009) Immunosuppressive therapy in lung transplantation: state of the art. Eur J Cardiothorac Surg 35(6): 1045-1055

Kuhnle G.E., Reichenspurner H., Lange T., Wagner F., Groh J., Messmer K., Goetz A.E. (1998) Microhemodynamics and leukocyte sequestration after pulmonary ischemia and reperfusion in rabbits. J Thorac Cardiovasc Surg 115(4): 937-944

Kutschka I., Sommer S.P., Hohlfeld J.M., Warnecke G., Morancho M., Fischer S., Haverich A., Strüber M. (2003) In-situ topical cooling of lung grafts: early graft function and surfactant analysis in a porcine single lung transplant model. Eur J Cardiothorac Surg 24(3): 411-419

Lau D., Baldus S. (2006) Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. Pharmacol Ther 111(1): 16-26

Lee J.C., Christie J.D. (2009) Primary graft dysfunction. Proc Am Thorac Soc 6(1): 39-4

Liu M., Tremblay L., Cassivi S.D., Bai X.H., Mourgeon E., Pierre A.F., Slutsky A.S., Post M., Keshavjee S. (2000) Alterations of nitric oxide synthase expression and activity during rat lung transplantation. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 278(5): L1071-1081

Loria V., Dato I., Graziani F., Biasucci L.M. (2008) Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. Mediators Inflamm 2008(2008): 135625

Macdonald P., Mundy J., Rogers P., Harrison G., Branch J., Glanville A., Keogh A., Spratt P. (1995) Successful treatment of life-threatening acute reperfusion injury after lung transplantation with inhaled nitric oxide. J Thorac Cardiovasc Surg 110(3): 861-863

Marik P.E. (2001) Aspiration pneumonitis and aspiration pneumonia. N Engl J Med 344(9): 665-71

Matesanz R., Mahillo B., Alvarez M., Carmona M. (2009) Global observatory and database on donation and transplantation: world overview on transplantation activities. Transplant Proc 41(6): 2297-2301

Mertens V., Blondeau K., Vanaudenaerde B., Vos R., Farre R., Pauwels A., Verleden G., Van Raemdonck D., Dupont L., Sifrim D. (2010) Gastric Juice From Patients "On" Acid Supressive Therapy Can Still Provoke a Significant Inflammatory Reaction by Human Bronchial Epithelial Cells. J Clin Gastroenterol 44(10):e230-235

Moffatt-Bruce S.D. (2009a) Lung Transplantation. eMedicine: retrieved from http://emedicine.medscape.com/article/429499-overview; letzter Abruf 26.10.2012

Moffatt-Bruce S.D. (2009b) Lung Transplantation Treatment & Management. eMedicine: retrieved from http://emedicine.medscape.com/article/429499-treatment; letzter Abruf 26.10.2012

Moro E.T. (2004) Prevention of pulmonary gastric contents aspiration. Rev Bras Anestesiol 54(2): 261-275

Nader N.D., Knight P.R., Davidson B.A., Safaee S.S., Steinhorn D.M. (2000) Systemic Perfluorocarbons Suppress the Acute Lung Inflammation After Gastric Acid Aspiration in Rats. Anesth Analg 90(2): 356-361

Nadar-Djalal N., Knight P.R., Davidson B.A., Johnson K. (1997) Hyperoxia Exacerbates Microvascular Lung Injury Following Acid Aspiration. Chest 112(6): 1607-1614

Naka Y., Roy D.K., Liao H., Chowdhury N.C., Michler R.E., Oz M.C., Pinsky D.J. (1996) cAMP-mediated vascular protection in an orthotopic rat lung transplant model. Insights into the mechanism of action of prostaglandin E1 to improve lung preservation. Circ Res 79(4): 773-783

Neher C. (2015) Vergleich des Einsatzes verschiedener Antithymozytenglobulin (ATG)-Arten bei der intensivierten immunsuppressiven Therapie der aplastischen Anämie. Diss., Open Access Repositorium der Universität Ulm

Ng C.Y., Madsen J.C., Rosengard B.R., Allan J.S. (2009) Immunosuppression for lung transplantation. Front Biosci 14: 1627-1641

Orens J.B., Boehler A., de Perrot M., Estenne M., Glanville A.R., Keshavjee S., Kotloff R., Morton J., Studer S.M., Van Raemdonck D., Waddel T., Snell G.I. (2003) A review of lung transplant donor acceptability criteria. J Heart Lung Transplant 22 (11): 1183-1200

Pacher P., Beckmann J.S., Liaudet L. (2007) Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. Physiol Rev 87(1): 315 – 424

Patterson G.A., Cooper J.D., Goldman B., Weisel R.D., Pearson F.G., Waters P.F., Todd T.R., Scully H., Goldberg M., Ginsberg R.J. (1988) Technique of successful clinical double-lung transplantation. Ann Thorac Surg 45(6): 626-633

Pellegrino B., Schmidt R.J. (2009) Immunosuppression. eMedicine: retrieved from http://emedicine.medscape.com/article/432316-overview; letzter Abruf 26.10.2012

Petersen B., Carnwath J.W., Niemann H. (2009) The perspectives for porcine-to-human xenografts. Comp Immunol Microbiol Infec Dis 32(2): 91-105

Pierre A.F., Sekine Y., Hutcheon M.A., Waddell T.K., Keshavjee S.H. (2002) Marginal donor lungs: A reassessment. J Thorac Cardiovasc Surg 123(3): 421-428

Pierson R.N. (2009) Current status of xenotransplantation. JAMA 301(9): 967-969

R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical. Computing, Vienna, Austria

Rega F.R., Neyrinck A.P., Verleden G.M., Lerut T.E., Van Raemdonck D.E.M. (2004) How long can we preserve the pulmonary graft inside the nonheart-beating donor? Ann Thorac Surg 77(2): 438- 444

Rogers C.S., Abraham W.M., Brogden K.A., Engelhardt J.F., Fisher J.T., McCray P.B., McLennan G., Meyerholz D.K., Namati E., Ostedgaard L.S., Prather R.S., Sabater J.R., Stoltz D.A., Zabner J., Welsh M.J. (2008) The porcine lung as a potential model for cystic fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295(2): L240-263

Rotta A.T., Gunnarsson B., Hernan L.J., Fuhrman B.P., Steinhorn D.M. (1999) Partial liquid ventilation influences pulmonary histopathology in an animal model of acute lung injury. J Crit Care 14(2): 84-92

Rudolph T.K., Wipper, S., Rudolph, V., Reiter, B., Klinke, A., Friedrichs, K., Meinertz, T., Detter, C., Baldus, S. (2010) Myeloperoxidase Systemically Regulates Vascular Tone. Circulation 122: A14525

Steen S., Ingemansson R., Eriksson L., Pierre L., Algotsson L., Wierup P., Liao Q., Eyjolfsson A., Gustafsson R., Sjöberg T. (2007) First human transplantation of a nonacceptable donor lung after reconditioning ex vivo. Ann Thorac Surg 83(6): 2191-2194

Steen S., Liao Q., Wierup P.N., Bolys R., Pierre L., Sjöberg T. (2003) Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. Ann Thorac Surg 76(1): 244-252

Steimle C.N., Guynn T.P., Morganroth M.L., Bolling S.F., Carr K., Deeb G.M. (1992) Neutrophils are not necessary for ischemia-reperfusion lung injury. Ann Thorac Surg 53(1): 64-72

Studer S.M., Levy R.D., McNeil K., Orens J.B. (2004) Lung transplant outcomes: a review of survival, graft function, physiology, health-related quality of life and cost-effectiveness. Eur Respir J 24(4): 674-85

Thabut G., Brugière O., Lesèche G., Stern J.B., Fradj K., Hervé P., Jebrak G., Marty J., Fournier M., Mal H. (2001) Preventive effect of inhaled nitric oxide and pentoxifylline on ischemia/reperfusion injury after lung transplantation. Transplantation 71(9): 1295-1300

Thabut G., Mal H., Cerrina J., Dartevelle P., Dromer C., Velly J.-F., Stern M., Loirat P., Lesèche G., Bertocchi M., Mornex J.-F., Haloun A., Despins P., Pison C., Blin D., Reynaud-Gaubert M. (2005) Graft ischemic time and outcome of lung transplantation: a multicenter analysis. Am J Respir Crit Care Med 171(7): 786-791

Toronto Lung Transplant Group (1986) Unilateral lung transplantation for pulmonary fibrosis. N Engl J Med 314(18): 1140-1145

University Health Network (2008, December 22), Breathing Life into Injured Lungs: World-First Technique Will Expand Lung Donor Organ Pool. Science Daily: retrieved from http://www.sciencedaily.com/releases/2008/12/081219172039.htm; letzter Abruf 26.10.2012

Uthoff K., Zehr K.J., Lee P.C., Low R.A., Baumgartner W.A., Cameron D.E., Stuart R.S. (1995) Neutrophil Modulation Results in Improved Pulmonary Function After 12 and 24 Hours of Preservation. Ann Thorac Surg 59: 7-13

Van de Wauwer C., Neyrinck A.P., Geudens N., Rega F.R., Verleden G.M., Lerut T.E., Van Raemdonck D.E.M. (2009) The mode of death in the non-heart-beating donor has an impact on lung graft quality. Eur J Cardiothorac Surg 36(5): 919- 926

Van Raemdonck D., Steen S. (2003) Chapter 8. Lung Preservation. European Respiratory Society Monograph 2003; 26 (Lung Transplantation): 86-97

Van Raemdonck D., Strüber M., Venuta F., Vlasselaers D., Wisser W., Erasmusf M.E. (2004) Chapter 5. Strategies in the prevention and the treatment of ischaemia-reperfusion injury after lung transplantation. European Respiratory Society Monograph 2004; 29 (Surgery for Non-Neoplastic Disorders of the Chest: A Clinical Update): 66-88

Van Raemdonck D., Neyrinck A., Verleden G. M., Dupont L., Coosemans W., Decaluwé H., Decker G., De Leyn P., Nafteux P., Lerut T. (2009) Lung donor selection and management. Proc Am Thorac Soc 6(1): 28-38

Wada H., Yokomise H., Inui K., Yagi K., Aoki M., Hitomi S. (1993) Present world status and problems resolved in lung transplantation: from the surgical view. Nihon Kyōbu Shikkan Gakkai Zasshi 31 (suppl): 69-72

Weinberger S., Johnson T., Weiss S. (1980) Clinical significance of pulmonary function tests. Use and interpretation of the single-breath diffusing capacity. Chest 78(3): 483-488

Weiss S.J., Klein R., Slivka A., Wei M. (1982) Chlorination of Taurine by Human Neutrophils. J Clin Invest 70(3): 598-607

Wells W.J., Barr M.L. (2005) The ethics of living donor lung transplantation. Thorac Surg Clin 15(4): 519-25

Wilkes D. S., Egan T. M., Reynolds H. Y. (2005) Lung transplantation: opportunities for Research and clinical advancement. Am J Respir Crit Care Med 172 (8): 944-955

Wipper S.H., Schirmer J., Martens B., Lebaschi A., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2007) A new concept of reconditioning predamaged donor lungs in an ex-vivo reperfusion pig model. J Heart Lung Transplant 26(suppl.): S111

Wipper S., Dupree A., Lindner J., Sprathoff N., Pahrmann C., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2008a) Reconditioning of Donor Lungs after Brain Death Induces Dysfunction. J Heart Lung Transplant 27 (suppl.): S179-S180

Wipper S., Martens B., Dupree A., Schirmer J., Pahrmann, C., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2008b) Development and Evaluation of an In-Vitro Reperfusion Circuit for Reconditioning of Predamaged Donor-Lungs. J Heart Lung Transplant 27(suppl.):S201

Wipper S., Dupree A., Lindner J., Sprathoff N., Pahrmann C., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2008c) Is it possible to recondition donor-lungs after damage due to brain-death induction? Thorac Cardiovasc Surg 56(suppl): S36

Wipper S., Lindner J., Duprée A., Pahrmann C., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2009a) Is it possible to recondition donor-lungs after damage due to aspiration? Thorac Cardiovasc Surg 56(suppl): S63

Wipper S., Lindner J., Duprée A., Pahrmann C., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2009b) Ex-Vivo Repair of Donor Pig-Lungs Damaged by Aspiration. J Heart Lung Transplant 28(suppl.): S237

Wipper S., Rittberg Y., Dupree A., Youbert-Hubner E., Reiter B., Koops A., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2010a) Ex-Vivo Repair of Donor Lungs- Is Cell-Free Solution Superior to Blood Perfusion. J Heart Lung Transplant 29(suppl.): S96

Wipper S., Von Rittberg Y., Lindner J., Pahrmann C., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2010b) Closed or open circuit during ex-vivo lung perfusion for reconditioning of damaged donor-lungs - which shall we use? Thorac Cardiovasc Surg 58(suppl.): S31

Wipper S., Lueke A., Baldus S., Schirmer J., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2011a) Myeloperoxidase tissue level (MPO) reflects successful repair of donor lung injury by ex-vivo lung perfusion (EVLP). J Heart Lung Transplant 30(suppl.): S143-S144

Wipper S., Lüke A., Sandte J., Schirmer J., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2011b) Can we cure accidential aspiration injury by ex-vivo-lung perfusion (EVLP)? 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Stuttgart 13.-16. Feb. 2011

Wipper S., Lüke A., Sandte J., Schirmer J., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2011c) Can we cure accidential aspiration injury by ex-vivo-lung perfusion (EVLP)? Thorac Cardiovasc Surg 59(suppl): S65

Wipper S., Lüke A., Sandte J., Schirmer J., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2011d) Donor accidental aspiration injury – can we correct it by ex-vivo-lung-perfusion (EVLP)? J Heart Lung Transplant 30(suppl.): S39

Woo M.S. (2008) Overview of lung transplantation. Clinic Rev Allerg Immunol 35(3): 154-163

Yusen R. D. (2009) Technology and outcomes assessment in lung transplantation. Proc Am Thorac Soc 6(1): 128-136

Zhang C., Reiter C., Eiserich J.P., Boersma B., Parks D.A., Beckman J.S., Barnes S., Kirk M., Baldus S., Darley-Usmar V.M., White C.R. (2001) L-arginine chlorination products inhibit endothelial nitric oxide production. J Biol Chem 276(29): 27159-27165

Zwissler B. (2002) Inhaled vasodilators. Anaesthesist 51(8): 603-624

13 Eigene Publikationen

Wipper S., Lueke A., Baldus S., Schirmer J., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2011) Myeloperoxidase tissue level (MPO) reflects successful repair of donor lung injury by ex-vivo lung perfusion (EVLP). J Heart Lung Transplant 30(suppl.): S143-S144

Wipper S., Lüke A., Sandte J., Schirmer J., Reichenspurner H., Wagner F.M. Can we cure accidential aspiration injury by ex-vivo-lung perfusion (EVLP)? 40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in Stuttgart 13.-16. Feb. 2011

Wipper S., Lüke A., Sandte J., Schirmer J., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2011) Can we cure accidential aspiration injury by ex-vivo-lung perfusion (EVLP)? Thorac Cardiovasc Surg 59(suppl): S65

Wipper S., Lüke A., Sandte J., Schirmer J., Reichenspurner H., Wagner F.M. (2011) Donor accidental aspiration injury – can we correct it by ex-vivo-lung-perfusion (EVLP)? J Heart Lung Transplant 30(suppl.): S39

14 Anhang

Übersicht zu untersuchten Schweinen

Alle Schweine wurden von der BHZP GmbH geliefert

Gruppe	Schwein Nr.	Ident-Nr.	Geschlecht	Gewicht [kg]	Geburtsdatum	Versuchsdatum	Anmerkungen
1	51	956974	m		10.08.07	19.11.07	Vergleichsgruppe: aspirationsgeschädigte Lungen mit ausschließlicher *in vitro* Perfusion (Daten von Frau Dr. S. Wipper)
	52	266423	m	keine	10.08.07	23.11.07	
	53	009732	m	Daten	10.08.07	27.11.07	
	54	689450	m	zur	08.08.07	05.12.07	
	55	689443	m	Verfügung	08.08.07	07.12.07	
	63	522057	m		02.11.07	13.03.08	
2	56	355929	w		21.09.07	17.01.08	Vergleichsgruppe: aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung (Daten von Frau Dr. S. Wipper)
	57	517776	m	keine	14.10.07	22.01.08	
	58	517750	m	Daten	14.10.07	06.02.08	
	59	123798	m	zur	12.10.07	13.02.08	
	60	600614	m	Verfügung	01.11.07	26.02.08	
	61	600630	m		01.11.07	29.02.08	
	62	114151	m		03.11.07	11.03.08	
3	88	436868	m	83,0	19.03.09	17.06.09	Versuchsgruppe: aspirationsgeschädigte Lungen mit intensivmedizinischer Behandlung und ATG-Gabe
	89	565675	w	86,2	16.04.09	24.06.09	
	91	479561	w	56,6	09.04.09	16.07.09	
	92	224620	w	64,0	12.04.09	23.07.09	
	93	874507	w	82,4	09.04.09	06.08.09	
	94	219868	w	60,4	10.04.09	28.09.09	
	95	5790	w	68,4	23.05.09	30.09.09	

m: männlich; w: weiblich

15 Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, Ph.D., danke ich dafür, mir eine externe Promotion ermöglicht zu haben und ohne zu zögern die Rolle meines Doktorvaters übernommen zu haben. Ich danke ihm weiter für die kritische Durchsicht und abschließende Beurteilung meiner Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Florian Wagner bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit zur Promotion in seinem Arbeitskreis, für die Überlassung des Themas, seine Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit, viele wertvolle Anregungen und die kritische Durchsicht und Begutachtung der Arbeit. Ebenso danke ich Herrn Dr. Wagner für die Einwerbung von Mitteln zur Finanzierung der Arbeit beim Förderverein des Universitären Herzzentrums und aus dem Forschungsetat der Klinik.

Insbesondere danke ich Frau Dr. Sabine Wipper für die fachliche Einführung in die Thematik meiner Dissertation, die sehr herzliche Aufnahme in den Arbeitskreis, ihre fachliche Betreuung, konstruktive Vorschläge und Diskussionen und die motivierende Unterstützung, die mir bei manchen Schwierigkeiten geholfen hat.

Großer Dank gilt auch Herrn Jan F. Kersten für die Hilfe bei den statistischen Auswertungen meiner Versuche.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mein Studium und meine Promotion in vielfältiger Weise unterstützt haben. Meinem Mann und meinen Freunden danke ich, dass sie mich verständnisvoll auf meinem Weg begleitet und dafür gesorgt haben, dass auch das Leben neben der Doktorarbeit seinen Stellenwert behalten hat.

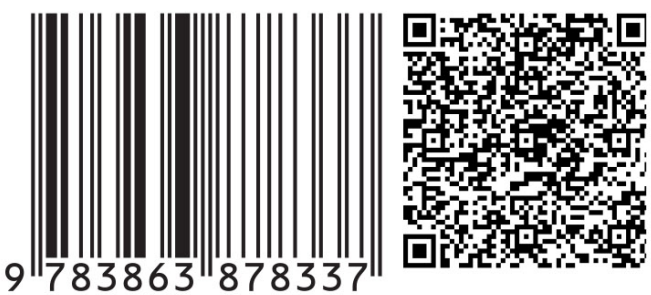
16 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Ich habe weder eine entgeltliche noch unentgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen, inbesondere nicht von der Fa. Fresenius. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Berlin, den 27.07.2017

Anja Störmer



mbvberlin | mensch und buch verlag
49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-833-7