

1 Einleitung

Leberperfusionen werden seit vielen Jahren zur Erforschung verschiedenster physiologischer, pharmakologischer und pathophysiologischer Fragestellungen durchgeführt (ABOUNA, 1968; DRAPANAS et al., 1966; STEFFEN et al., 1987). Die erste Leberperfusion wurde 1654 von Glisson durchgeführt, wobei dieser Lebern über einen in die V. portae eingeführten Federkiel mit Kuhmilch perfundierte (GROSSE-SIESTRUP et al., 2002).

Erfahrungen mit der isolierten Perfusion von Schweinelebern liegen ebenfalls im Rahmen verschiedenster Versuchsbedingungen vor. Ein wichtiger Grund für die Vielfalt dieser Ansätze liegt in dem Ziel, Menschen mit akutem Leberversagen temporär bis zur Transplantation am Leben halten zu können. Dabei gibt es unterschiedliche Strategien: Neben den anfänglich zur Blutreinigung eingesetzten Filtersystemen (MATSUHITA und NOSÈ, 1986; STANGE et al., 1999) wurden später komplexe Bioreaktoren mit dreidimensionaler Hepatozytenanordnung entwickelt (CHEN et al., 1997; FLENDRIG, 1999). Aktuell werden hauptsächlich Extrakorporalsysteme und komplexe Perfusionsaufbauten eingesetzt, mit denen ein Funktionserhalt isoliert perfundierter Lebern über sechs bis 24 Stunden erreicht werden kann (GERLACH et al., 1997; NEUHAUS et al., 1992).

Neben dem potentiellen Nutzen in der Patientenversorgung werden Leberperfusionssysteme ebenfalls bei der Untersuchung von Spül- und Perfusionslösungen eingesetzt (ABOUNA 1968; BELL et al., 1997; KLÖPPEL et al., 1994; RENTSCH et al., 1996; SCHÖN et al., 1993; STEFFEN et al., 1990; SUMIMOTO et al., 1989).

Prinzipiell ist eine Verwendung dieser Systeme auch zur Prüfung der Hepatotoxizität neuer Substanzen sinnvoll. Dabei ist die Verwendung von Versuchstieren oder deren Organen allerdings sehr kostenintensiv. Der Gebrauch von Schlachthoforganen scheint hier eine deutlich günstigere und ethisch bedenkenlose Alternative zu sein. In dieser Hinsicht wurde eine Nutzungsmöglichkeit von Schlachtorganen für derartige Versuche bereits nachgewiesen (GROSSE-SIESTRUP, 1993; HELLINGER et al., 1997; KOEBE et al., 1995).

Aufgrund der sehr komplexen hepatischen Stoffwechselfvorgänge reagiert die Leber auf Veränderungen von außen zwar relativ schnell, braucht jedoch auch zur Regeneration ein längeres Intervall. Um sich auf eine isolierte Perfusion einzustellen, sollten aus diesem Grund bis zu 30 Minuten vergehen, ehe nach Feststellung eines „Steady-States“ mit den eigentlichen

Versuchen begonnen werden kann. Im Anschluss daran kann eine mehrstündiger Perfusionsversuch durchgeführt werden. (ADKISON et al., 1986; NEUHAUS et al., 1992)

Zur Prüfung eines möglichen Einsatzes isoliert perfundierter Schweinelebern in der Toxizitätstestung, sollten Präparate verwendet werden, die bereits in Tierversuchen und im humanmedizinischen Bereich etabliert sind. Dadurch können bereits vorhandene Ergebnisse mit den eigenen Resultaten verglichen werden.

Als Substanzen wurden Polidocanol und Diclofenac ausgewählt. Polidocanol ist ein nichtionisches Detergenz mit oberflächenaktiven Eigenschaften. Diese bewirken eine Veränderung der zellulären Membraneigenschaften. Polidocanol findet daher bei der Verödung von Gewebe Anwendung. In der Tiermedizin wird Polidocanol erfolgreich bei chronisch-rezidivierenden Analbeutelentzündungen in Form einer 3%igen Spüllösung eingesetzt (BILKEI und OLESCH, 1990). Ein weiteres Anwendungsfeld stellen Hauterkrankungen bei Haustieren dar (BUHLES und RICHTER, 1989; RUOFF, 1981), da Polidocanol juckreizstillend, resorptionsfördernd und lokalanästhetisch, wie auch emulgatorisch wirksam ist (CIANCAGLINI et al., 1992; KUSCHINSKY, 1980; RHODE und CHIOU, 1991). Die Wirkung von Polidocanol auf isolierte Rattenhepatozyten wurde bereits von Kroker et al. untersucht. Dabei beobachteten sie sowohl Veränderungen in der Membranomorphologie, als auch in der Vitalität der inkubierten Zellen (KROKER et al., 1990).

Diclofenac ist ein nicht-steroidales Antiphlogistikum. Es eignet sich zur Therapie starker Schmerzzustände. Die Substanz wirkt sich aufgrund eines Eingriffs in den Hepatozyten-Metabolismus belastend auf die Leber aus. Zudem sind Metabolite von Diclofenac lebertoxisch und führen nach mehrmonatiger Einnahme zu einer Hepatitis, die bei weiterer Applikation in chronische Krankheitsstadien übergehen kann (CARDOSO, 1994).

1.1 Aufgabenstellung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um ein Teilprojekt des durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Forschungsvorhabens „Physiologische Hämoperfusion von isolierten Organen und ihr Einsatz zum Ersatz von Tierversuchen“ (Projektleiter: Affeld K., v. Baeyer H. und Grosse-Siestrup Ch.). Der hier entwickelte Perfusionsaufbau soll zur autologen Hämoperfusion von Schlachthauschweinelebern herangezogen werden und zeichnet sich durch neue,

blutschonende Pulspumpen aus. Eine mögliche Einsatzfähigkeit bei der Arzneimittelprüfung soll mit Hilfe der Verwendung zweier Prüfsubstanzen, Polidocanol und Diclofenac, untersucht werden. Bei Diclofenac soll die Metabolisierung, bei Polidocanol die toxische Wirkung im Vordergrund der Untersuchungen stehen. Die vorliegende Arbeit ist ein Teilprojekt einer zweigeteilten Forschungsarbeit (WEVERS, 2001).

Ziel der autologen Hämoperfusion ist neben der Charakterisierung der Perfusionsmethode in unbehandelten Kontrollorganen die Erfassung der Substanz-spezifischen Schädigungsmuster. Zur Beurteilung der Vitalität werden hämodynamische, laborchemische und hämatologische Parameter herangezogen.

2. Literatur

2.1 Anatomische Grundlagen

Die Leber liegt im Abdomen dem Zwerchfell direkt an und ist mit diesem durch verschiedene Leberbänder verbunden. Eine weitere Aufhängung erfolgt durch die Gefäße V. portae, V. cava cranialis und A. hepatica (SCHUMMER UND VOLLMERHAUS, 1987). Umgeben wird die Leber einer Kapsel (Tunica fibrosa), die vom Peritoneum überzogen wird. Das Leberparenchym ist von bindegewebigen Septen durchzogen, welche die Leber in mehreckige Leberläppchen einteilen und besonders bei der Spezies Schwein sehr gut sichtbar sind (U, 1987). In diesen Septen liegen die Versorgungs- und Entsorgungseinheiten der Leber. Dies sind Äste der V. portae, Äste der A. hepatica und jeweils ein Gallenausführungsgang. In ihrer Gesamtheit bezeichnet man sie als Trias (SCHUMMER UND VOLLMERHAUS, 1987). Eine wesentliche Besonderheit der Leber ist ihre doppelte Blutversorgung, da sie einerseits Blut aus der V. portae, andererseits auch über die A. hepatica erhält (SCHUMMER UND VOLLMERHAUS, 1987).

Das Leberläppchen wird von den genannten Gefäßen netzartig umspinnen. Das Blut fließt dabei vom Läppchenrand zur Zentralvene. In der Trias sammeln sich die Zuflüsse und werden dann über die Vv. hepaticae der V. cava zugeleitet. Gleiches gilt auch für den Abfluss der produzierten Galle, welche in den Gallenkapillaren zu den Gallengängen fließt. Diese enden alle im Lebergang und münden schließlich über den Ductus cysticus in die Gallenblase.

Die Leberzellen sind in radiären Platten um die V. centralis angeordnet. Der Blutfluss erfolgt von der Trias zur V. centralis hin. Die Kontaktflächen der Hepatozyten bilden die „Wände“ der Gallenkapillaren. Alle zwischen den Läppchen verlaufenden, zuführenden Gefäße münden in die Sinusoide. Diese enden in der Zentralvene. Die Sinusoide sind mit Endothel ausgekleidet, welches Lücken aufweist. Diese stellen die Verbindung zu einem perikapillären Spalt, dem Disseschen Raum, in welchem die Kupfferschen Sternzellen liegen, dar (MOSIMANN UND KOHLER, 1990). Aufgrund dieses Aufbaus erhalten die von der V. centralis weit entfernten Zellen eine bessere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung als die zentral gelegenen. Diese Besonderheit spiegelt sich auch in ihrer Enzymausstattung und deren Aktivität wider. Die vielseitigen Aufgaben der Hepatozyten laufen auch in den verschiedenen „Zonen“ eines Lobulus unterschiedlich ab (HERMANN, 1999).

2.2 Leberfunktion

Aufgrund ihrer Versorgung mit Blut aus dem Einzugsgebiet des Magen-Darmtrakts steht der Leber eine herausragende Rolle im Stoffwechsel zu. Die Leber nimmt dabei Stoffe auf und speichert diese in den Hepatozyten oder leitet sie zu anderen Organen weiter. Die Stoffe werden dabei in den Hepatozyten durch biochemische Syntheseschritte in die entsprechende Transportform transferiert. Gleichzeitig steht die Leber unter ständiger Belastung: Pharmaka und Toxine, die in den Stoffwechsel gebracht wurden, bzw. gelangt sind, müssen verarbeitet oder umstrukturiert werden, um so eine Ausscheidung über die Niere oder andere Organe zu ermöglichen. Daraus resultiert eine Vielzahl von Stoffwechselfunktionen die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

2.3 Galleproduktion und -sekretion

Die Leber produziert kontinuierlich Galle. Diese Galle wird in den Hepatozyten gebildet und gelangt dann über die einzelnen Gallengänge in die Gallenblase, wo sie gespeichert und dabei auch eingedickt werden kann. Eine direkte Abgabe in das Duodenum ist jedoch auch über den Ductus choledochus möglich.

Einerseits dient die Galle der Unterstützung der Verdauung, andererseits können über sie Schlackenstoffe ausgeschieden werden. Wichtigste Bestandteile der Galle sind Gallensäuren und Gallenfarbstoffe. Gallensäuren sind Steroide, welche in der Galle meist in Verbindung mit Glykollol oder Taurin vorliegen. Sie erleichtern die Aufnahme von Lipiden, welche im Dünndarm in Form von Mono- oder Diacylglycerinen und Fettsäuren vorliegen. Gallensäuren wirken hier als starke Detergenzien. Sie vergrößern die Oberfläche und verringern die Oberflächenspannung, indem sie Mizellen mit den oben genannten Stoffen bilden. Diese Mizellen nehmen die unpolaren Lipidabbauprodukte auf und ermöglichen eine Aufnahme über die hydrophile Phase der Darmwand. Gleichzeitig können so auch die fettlöslichen Vitamine E, D, K, und A aufgenommen werden (HERMANNNS, 1999; VOET und VOET, 1994).

Im Ileum wird der größte Anteil der Gallensäuren wieder resorbiert. Durch die Pfortader gelangen diese wieder in die Leber, wo sie erneut zur Galleproduktion herangezogen werden können (enterohepatischer Kreislauf).

Die Gallenfarbstoffe entstehen während des Abbaus des Blutfarbstoffes Hämoglobin. Über die Zwischenstufen Biliverdin und Bilirubin entsteht Bilirubinglukuronid, welches über die Galle ausgeschieden wird. Dies ist nur durch eine Veresterung des lipophilen Bilirubins mit Glukuronsäure und einer damit verbundenen Steigerung der Wasserlöslichkeit möglich (VOET und VOET, 1994).

Die Gallenblase dient der Gallespeicherung. Die Entleerung in den Darm erfolgt über nervale (N. vagus) und endokrine (Cholecystokinin) Signale, sowie bedingte, wie auch unbedingte Reflexe. Die Wand der Gallenblase ist dreischichtig und besteht aus Tunica mucosa, Tunica muscularis und Tunica serosa. Die Mucosa enthält mit Microvilli versehenes Epithel, welches der Resorption dient und somit die Galle eindicken kann (VOET und VOET, 1994).

2.4 Funktion im Kohlenhydratstoffwechsel

Da dem Organismus Nahrung meist nicht kontinuierlich zugeführt wird, sondern in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen, muss es eine Regulation der Energiebereitstellung geben. Hier hat die Leber eine Schlüsselrolle. Sie ist in der Lage Glukose aus der Nahrung aufzunehmen und dann sowohl zu speichern, als auch bei Bedarf wieder abzugeben. Geregelt wird dieses kontinuierliche Gleichgewicht über Hormone und Neurotransmitter wie Glukagon, Adrenalin und Insulin, wie auch die Blutglukosekonzentration selbst. Da die Leberzellen nicht direkt von Insulin beeinflusst werden, nehmen sie auch dann Glukose auf, wenn andere Zellen (Muskeln, Fettzellen) dies nicht mehr können. In der Leber wird Glukose dann an Glukogenin angelagert. Danach erfolgt enzymatisch (Glykogen-Synthase) der Einbau in die Glykogenspeicher. Wird Glukose gebraucht, wird dieses Lager wieder enzymatisch (Phosphorylase) zerlegt. Signal dafür ist ein Anstieg von Glukagon oder Adrenalin. Auch andere Zucker können aufgenommen werden (Fruktose, Galaktose, Mannose). Ferner wird Laktat, welches sowohl in die Glukoneogenese, Lipogenese oder die oxidative Phosphorylierung geht, aufgenommen. Das Hauptmolekül für diese Abläufe ist Glukose-6-Phosphat, welches über unterschiedliche Wege wieder in brauchbare Verbindungen umgewandelt werden kann (VOET und VOET, 1994).

2.5 Funktion im Proteinstoffwechsel

Die Leber kann Aminosäuren in viele verschiedene, für den Stoffwechsel wichtige, Zwischensubstanzen umbauen. Sie hat dafür verschiedene Stoffwechselwege zur Verfügung.

Darunter fällt die Umwandlung glukogener Aminosäuren in Pyruvat. Dieses wird dann dem Zitronensäurezyklus zugeführt oder für andere Produkte verwandt. Ketogene Aminosäuren hingegen können zu Ketonkörpern oder anderen Glukosevorstufen umgebaut werden. Aminosäuren können aber in der Leber auch transaminiert werden, wodurch α -Ketokarbonsäuren entstehen. Diese gelangen in den Harnstoffzyklus und werden dann als Harnstoff im Urin ausgeschieden. Die Glukoneogenese kann auch bei alleinigem Vorhandensein von sogenannten glukogenen Aminosäuren ablaufen, da aus ihnen die Grundstoffe stammen. Dabei werden diese zu Laktat oder Pyruvat umgebaut und dann in den Zitratzyklus überführt. Dort entsteht Oxalazetat, das Ausgangsprodukt der Glukoneogenese (VOET und VOET, 1994).

2.6 Entgiftungsfunktion

Im Körper anfallende Fremd- oder Giftstoffe werden über die Portalvene vom Darm her der Leber zugeführt. Diese Stoffe müssen erst mit der Galle in den Darm gelangen und werden dann an Glukuronsäure, Sulfat oder an die SH-Gruppe des Glutathions gebunden. Diese Verbindungen werden in den Gallenkanälchen oder im Tubuluslumen hydrolysiert. Es folgt die Kopplung an Cystein. Aufgrund dieser Kopplung ist dann eine Resorption über den Darm oder den Tubulus möglich. Der Stoff kann dann in Leber oder Niere N-azetyliert werden. Es entsteht Mercaptursäure, die tubulär sezerniert und mit dem Harn ausgeschieden wird (VOET und VOET, 1994).

2.7 Arzneimittelprüfung

Die Arzneimittelentwicklung gliedert sich in die vorklinische und die klinische Prüfungsphase. Nach der Synthese potentieller Wirkstoffe und deren pharmakologischer Evaluierung wird die Wirkung und Unbedenklichkeit einer Substanz zuerst unter experimentellen Bedingungen in der vorklinischen Phase überprüft (HALDEMANN und SALINAS, 2001). Diese Arzneimittelprüfungen enthalten immer noch ein großes Kontingent an Tierversuchen. Sowohl aus ethischen, wie auch aus Kostengründen soll ihre Anzahl kontinuierlich verringert werden. Als Alternativen erweisen unter anderem Hepatozyten-Zellkulturen als besonders geeignet (HALDEMANN und SALINAS, 2001). Diese Zellart ist Hauptziel der meisten Xenobiotika. Hier findet deren Verstoffwechslung statt, wobei aktive, inaktive oder toxische Metabolite entstehen können.

Von besonderer Bedeutung für die Metabolisierung vieler Substanzen sind Monooxygenase-Enzyme. Diese kommen in Hepatozyten in großer Anzahl vor, wobei jedoch speziesspezifische Unterschiede in der Verteilung der unterschiedlichen Isoenzymklassen bestehen. Zur besseren Erfassung humanspezifischer Wirkungen wurden aus diesem Grund Hepatozyten gentechnologisch verändert und beispielsweise menschliches Cytochrom P450 in V-79-Zellen transferriert (DÖHMER, 2000). Der wesentliche Nachteil von Zellkulturen liegt in dem deutlichen Nachlassen der Monooxygenase-Enzymaktivität Laufe der Zeit. Verantwortlich dafür ist sowohl die Metabolitenanhäufung als auch die Nährstoffverarmung. Demgegenüber werden in Hepatozyten-Bioreaktoren Substrate ständig zu- und Stoffwechselprodukte abgeführt (ZEILINGER et al., 2000). Bei diesen Aufbauten ist eine ständige Anpassung von Druck und Fluss an den jeweiligen Zellstoffwechsel möglich. Eine Oxygenierung ist zu jeder Zeit gewährleistet. Es eröffnet sich so die Möglichkeit, Zellen mehrere Wochen erfolgreich bei guter Vitalität am Leben zu halten. Der Hauptnachteil liegt bei Bioreaktoren ebenso wie bei Zellkulturen in der fehlenden Organintegrität.

Aus diesem Grund könnten Perfusionen isolierter Organe eine wichtige Erweiterung auf dem Gebiet der Substanztestung darstellen. Bestimmte Wirkungen eines neuen Arzneimittels auf das jeweilige Organ können so ebenfalls ohne zwingend notwendige Tierversuche abgeklärt werden. Das Organ in seiner dreidimensionalen Struktur und das Vorhandensein verschiedener Zellarten in einem Verband erweitern hier die Untersuchungsmöglichkeiten (WISE, 2000). Auch wenn ein kompletter Ersatz von Tierversuchen durch Organperfusionen, sowie Zellkulturen und Bioreaktoren wahrscheinlich nicht erfolgen kann – die Komplexität eines Organismus kann nicht durch einfache Aneinanderreihung von Einzelmethoden simuliert werden – stellt die Methode eine wesentliche Möglichkeit zur Verminderung von Tierversuchen dar.

2.8 Einflüsse durch Polidocanol und Diclofenac

Die ausgewählten Versuchssubstanzen sollten sich in ihrer Wirkung auf die Leber deutlich voneinander abgrenzen. Die Entscheidung fiel auf Polidocanol, eine sehr aggressive Substanz, die deutliche Schäden an Geweboberflächen verursacht und Diclofenac, welches in den Stoffwechsel der Leberzellen eingreift.

2.8.1 Polidocanol

2.8.1.1 Historie

Pharmakologisch wird Polidocanol als Aethoxysclerol¹ bezeichnet. Es findet hier als 1%ige Injektionslösung Anwendung. Eine Ampulle enthält 10 mg Polidocanol, 84 mg Ethanol, Natriummonoxygenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat pro Milliliter in wässriger Lösung (FACHINFORMATION AETHOXYSCLEROL, 1991).

Chemisch ist Polidocanol ein Hydroxy-Polyethoxy-Dodecan und gehört zu den Alkyl-Polyethylenoxid Derivaten. Es handelt sich um einen Dodecylalkohol, der mit Polyethylenhydroxid kombiniert wurde. Durchschnittlich neun Ethylenoxid-Einheiten sind hier mit eingebunden (s. Summenformel). Das Molekulargewicht beträgt 600 D (MERCK-INDEX, 1989).

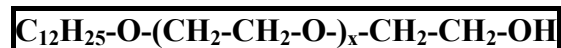


Abb. 1: Summenformel Polidocanol

Der erste Anwendungsbereich der Substanz lag in der Reinigung von Textilien in der Textilindustrie (SORRENTINO, 1956).

2.8.1.2 Pharmakokinetik

Nur wenige Informationen liegen über die Pharmakokinetik von Polidocanol vor. So wird von Thies et al. bei gleichmäßiger Verteilung im Organismus ein Plasmaspiegel von 4-12 µg/ml angegeben, was einer Dosierung von 4-12 mg/kg KGW bei der heute üblichen Anwendung zur Varizenverödung in der Humanmedizin entspricht (THIES et al., 1982). Suzuki et al. stellten fest, dass bei dieser Art der Anwendung Polidocanol zu maximal 50% systemisch verfügbar ist und sich über die Pfortader im Organismus verteilt (SUZUKI et al., 1992). Die Elimination von Polidocanol erfolgt laut Fachinformation des Herstellers fast vollständig über die Faeces und den Harn (FACHINFORMATION AETHOXYSCLEROL, 1991). Schröder und Olesch wiesen bei Ratten nach i.v.-Gabe radioaktiv markierten Polidocanols diese Ausscheidung ebenfalls nach. Sie untersuchten auch die Ausscheidung bei Hunden und es

¹ Fa. Kreussler

zeigte sich, dass diese Polidocanol deutlich langsamer und dabei hauptsächlich über den Harn ausscheiden, während Ratten Polidocanol größtenteils über den Kot ausscheiden (SCHRÖDER und OLESCH, 1990).

Nach wiederholter Gabe kommt es nicht zu kumulativen Effekten. Polidocanol bindet zu 64% an Protein. Die terminale Halbwertszeit beträgt ca. vier Stunden mit einem Verteilungsvolumen von 24,5 l, die Gesamtclearance beträgt 11,7 l/Std., die biliäre Clearance 3,14 l/Std. (FACHINFORMATION AETHOXYSCLEROL, 1991).

2.8.1.3 Klinische Anwendung

Das Haupteinsatzfeld für Polidocanol ist heute die Varizenverödung, Besenreißer- und Hämorrhoiden-Entfernung in der Humanmedizin (HEYDE, 1990; HÜBNER, 1989; ROTTER und HERMANN, 1993; SUZUKI et al., 1992; THIES et al., 1982). Es wird hierzu eine 0,5 – 1,0% ige Lösung verwendet. Die Applikation erfolgt intra- oder paravasal. Laut Fachinformation soll eine Gesamtdosis von 4 mg Polidocanol/kg KGW nicht überschritten werden (FACHINFORMATION AETHOXYSCLEROL, 1991).

Auch in der Tiermedizin findet Polidocanol Verwendung. Bilkei und Olesch zeigten hier Behandlungsmöglichkeiten auf, wobei sich eine Anwendung bei der chronisch-rezidivierenden Analbeutelentzündung von Hund und Katze bewährte (BILKEI und OLESCH, 1990). Es wurde hier mit einer 3%igen Lösung gespült. Hapke und Telser belegen zusätzlich eine Anwendung bei Hauterkrankungen (HAPKE und TELSER, 1989). Es kann bei der Anwendung von Polidocanol zu kurzzeitigen Nebenwirkungen - wie Schmerz - kommen, bei Langzeitanwendung zu Leberschäden. Diese zeigen sich in einer Entzündung und Nekrosen, welche ein Organversagen induzieren können (HAPKE und TELSER, 1989).

2.8.1.4 Wirkung auf die Leber

Gerade bei der Anwendung an vorbelasteten Patienten kann Polidocanol zu massiven Leberschäden führen. Rau et al. wiesen nach Verwendung von Polidocanol bei Patienten mit alkoholisch bedingter Leberzirrhose das Auftreten einer Cholestase nach (RAU et al., 1987). Derartige Schäden an der Leber lassen sich auch im Tierversuch nachweisen. Jensen et al. wiesen bei der Sklerosierung von Ösophagusvarizen beim Kaninchen nach paravasaler Injektion durch Rückfluss der Lösung fokale Nekrosen im Parenchym nach (JENSEN et al., 1986).

Bei Versuchen mit isolierten Rattenhepatozyten wurde eine signifikante Veränderung ausgesuchter Laborparameter festgestellt. Je nach Dosierung kam es zu einer deutlich verminderten Vitalität der Zellen. So kam es zu einem Anstieg der Enzyme AST und ALT bei Konzentrationen von 0,17 – 0,83 mM Polidocanol. Der intrazelluläre Gehalt an Kalium und Glutathion nahm deutlich ab. Elektronenmikroskopisch konnten deutliche Deformationen der Zellmembranen beobachtet werden, die Mitochondrien waren deutlich geschädigt (KROKER et al., 1990). Suzuki et al. wiesen bei Untersuchungen an Hunden nach i.v.-Applikation von 10 mg/kg jedoch keine Veränderungen der Leberenzyme AST und ALT nach (SUZUKI et al., 1992).

Bei Versuchen mit isolierten Rattenlebern wies Cyrus nach, dass je nach Konzentration der Polidocanollösung gravierende Veränderungen von Laborparametern zehn Minuten nach Applikation zu registrieren waren (CYRUS, 1995). Es kam hier zu einem signifikanten Anstieg von AST und ALT bei allen Konzentrationsniveaus (0,08 mM; 0,17 mM; 0,33 mM). Wobei es zu 29-fachen (0,33 mM 30. Minute) Wertsteigerungen bei AST und einer 40-fachen Wertsteigerung bei ALT (0,33 mM 30. Minute) kam. Auch Kalium veränderte sich unter Polidocanoleinfluss deutlich. Dreißig Minuten nach Gabe einer Dosis von 0,33 mM kam es zu einer Zunahme des Kaliums von 31% gegenüber dem Ausgangswert zum Zeitpunkt 0. Die Messung der Galleproduktion zeigte unter Polidocanoleinfluss (0,33 mM) einen Rückgang des Galleflusses auf 25% des Ausgangswertes zehn Minuten nach Applikation. Betrachtete man hierbei die Produktion der Gallensäure, so zeigte sich nach Gabe von 0,33 mM auch hier ein Rückgang auf 25% des Ausgangswertes zehn Minuten nach Applikation. Die Messung des Organgewichtes zeigte nach Beendigung des Versuches eine deutliche Zunahme des Gewichtes zwischen 19% (0,08 mM) bis 42% (0,17 mM).

2.8.1.5 Wirkung auf Membranen

Polidocanol hat ein membranschädigendes Potential, welches auf die oberflächenaktiven Eigenschaften zurückzuführen ist. Nishihata et al. machen hierfür die Eigenschaft nicht-ionischer Detergenzien verantwortlich, Lipide aus Membranen herauszulösen (NISHIHATA et al., 1985). Dies verändert die Membranstruktur und führt zu einer deutlichen Freisetzung von Proteinen aus den Membranen. Je nach Art und Aufbau des Detergenz kann das Zerstörungspotential deutlich variieren (ROTTER und HERMANNNS, 1993). Das Herauslösen von Lipiden führt zu irreparablen Permeabilitätsstörungen und kann die Lysis der Zelle zur Folge haben (AUNGST und ROGERS, 1988; SINGER und NICOLSON, 1972).

2.8.1.6 Wirkung auf den Kreislauf

Beeinträchtigungen des Kreislaufs durch Polidocanol können in großer Vielfalt festgestellt werden. Es kommt zu Schäden am Endothel und der Membran der Erythrozyten. Aber auch Auswirkungen auf die Herzfrequenz, die Kontraktionskraft des Herzens und eine Schädigung des Myokards werden beobachtet. An isolierten Herzpräparaten von Meerschweinchen stellten Thies et al. die oben genannte Abnahme der Herzfrequenz und Kontraktionskraft fest. Dieser Effekt war nicht reversibel (THIES et al., 1982). Verantwortlich wird hierfür die Blockade der Na^+ -Kanäle, sowie eine zusätzliche Verminderung der Kalzium-, bzw. Kaliumleitfähigkeit aufgrund der Detergenzwirkung gemacht. Auch Rau et al. beobachteten an Kaninchen nach Gabe von Polidocanol einen deutlichen Abfall der Herzfrequenz, aber auch des arteriellen Blutdruckes (RAU et al., 1987). Die Schädigung der Blutgefäße kann auf Wechselwirkungen zwischen Polidocanol und Endothellipiden zurückgeführt werden (NISHIWAKI et al., 1991; SUZUKI et al., 1992).

2.8.2 Diclofenac

2.8.2.1 Historie

Diclofenac (Abb. 2) wird weltweit als nicht-steroidales, entzündungshemmendes Medikament angewendet. Es handelt sich hierbei um ein Derivat der Phenylacetylsäure mit stark analgetischer Wirkung (BHOGARAJU et al., 1999; FACHINFORMATION VOLTAREN, 1999; IVERSON et al., 1990; RHAMAKRISHNA und VISWANATH, 1994).

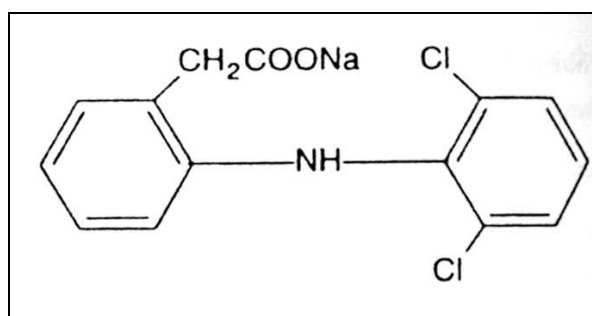


Abb. 2: Summenformel Diclofenac

2.8.2.2 Pharmakologie

Diclofenac ist ein Essigsäurederivat mit Diphenylaminstruktur. Es ist als Injektionslösung erhältlich, wobei in einer zwei Milliliter Ampulle 75 mg Diclofenac enthalten sind. Es handelt

sich um ein nicht-steroidales Antiphlogistikum (NSAID). Die Molmasse von Diclofenac beträgt 318,13 g/mol (FACHINFORMATION VOLTAREN, 1999).

Nicht-steroidale Antiphlogistika wirken analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch. Eine Gewebeschädigung, wie zum Beispiel eine Entzündung, führt zur Liberation endogener schmerzfördernder Substanzen, wobei der Arachidonsäuremetabolit Prostaglandin E₂ eine wesentliche Rolle spielt. Die Prostaglandinsynthese wird durch Antiphlogistika wie Diclofenac gehemmt, welche das Enzyme Cyclooxygenase inhibieren (SILBERNAGEL und DESPOPOULOS, 2001).

Die Entzündungshemmung der NSAID beruht auf einer Hemmung der Kapillarpermeabilität und einer Verminderung mesenchymaler Proliferation. Auch hier ist die Ursache dieser Vorgänge wieder in der Biosynthesehemmung der Prostaglandine zu finden (SILBERNAGEL und DESPOPOULOS, 2001).

2.8.2.3 *Pharmakokinetik*

Nach gleichmäßiger Verteilung im Organismus wird nach 20 Minuten eine maximale Plasmakonzentration von 2,5 µg/ml erreicht, wenn 75 mg Wirkstoff gegeben werden. Hierbei wird Diclofenac zu 99,7% an Serumproteine gebunden, dabei hauptsächlich an Albumin (KRETZ-ROMMEL und BOELSTERI, 1993). Das Verteilungsvolumen liegt bei 0,12 –0,17 l/kg. Eliminiert wird Diclofenac mit einer systemischen Clearance von 263 ± 56 ml/min. Die terminale Halbwertszeit liegt bei 1-2 Stunden. Verstoffwechselt wird Diclofenac hierbei hauptsächlich über Glukuronidierung. Aber auch ein- oder mehrfache aromatische Hydroxylierungen finden statt. Dadurch kommt es zur Bildung verschiedener phenolischer Metabolite, welche zu Glukuronsäure konjugiert werden. Reste werden über Galle und Kot ausgeschieden (FACHINFORMATION VOLTAREN, 1999).

2.8.2.4 *Klinische Anwendung*

Diclofenac wird bei schmerzhaften Prozessen im Rahmen der rheumatoiden Arthritis, Osteoarthritis oder bei der Therapie der Spondylitis eingesetzt (FACHINFORMATION VOLTAREN, 1999). Vereinzelt kommt es nach Behandlung mit Diclofenac zu einer Leberentzündung. Diese tritt frühestens drei Wochen, bzw. spätestens 12 Monate nach Behandlungsbeginn auf. Die Symptomatik variiert von symptomfrei bis zu einer letal

verlaufenden Hepatitis (BHOGARAJU et al., 1999; IVERSON et al., 1990; RHAMAKRISHNA und VISWANATH, 1994).

2.8.2.5 *Wirkung auf die Leber*

Hauptwirkung von Diclofenac ist die Hemmung der Cyclooxygenaseaktivität. Dies verursacht eine Verminderung der Produkte des Lipooxygenaseweges, die Ursache für die antiphlogistische, antipyretische und analgetische Wirkung (MAHMUD et al., 1996).

Die Hemmung dieser Stoffwechselwege führt zu einer verminderten Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen. Diese Stoffe gehören zur Gruppe der Eikosanoide, leiten sich also von mehrfach ungesättigten C20-Fettsäuren ab. Der für diesen Prozess notwendige Ausgangsstoff ist die Arachidonsäure. Diese liegt in der Phospholipidschicht als Ester vor und wird durch die Phospholipase freigesetzt. Eine Liberation kann wohl auf zwei Wegen erfolgen: einmal auf dem Cyclooxygenaseweg, bei dem als Produkt Prostaglandine und Thromboxane entstehen; zum anderen auf dem Lipooxygenaseweg, bei dem als Endprodukt Leukotriene und Hydroxy-Fettsäuren entstehen. Die Produkte haben lokal wirksame, hormonähnliche auto-, bzw. parakrine Funktion und sind als Mediatoren aktiv (VOET und VOET, 1994).

Bei dem Cyclooxygenaseweg setzt die Cyclooxygenase mit Hilfe von Sauerstoff Arachidonat zu Prostaglandin H₂, einem Endoperoxid, um. Aus dieser Vorstufe entstehen dann die Prostaglandine und Thromboxane. Bei dem Lipooxygenaseweg wird Arachidonat mit Hilfe der Lipooxygenase umgesetzt zu 5-Hydroperoxyeicosanotetraenoat (HETE). Dieses bildet die Vorstufe der Leukotriene. HETE macht die Chemotaxis möglich und fördert die Einwanderung von Leukozyten in ein Entzündungsgebiet (VOET und VOET, 1994).

Werden diese Stoffwechselwege gehemmt, kommt es zu einer Verminderung der Schmerzreaktion, typische Aufgabe der Prostaglandine, und auch zu einer Verminderung der Entzündungssymptome (BHOGARAJU et al., 1999).

2.8.2.6 *Einfluss auf den Energiestoffwechsel*

NSAID entkoppeln den mitochondrialen Energiestoffwechsel, indem sie die oxidative Phosphorylierung hemmen. Die oxidative Phosphorylierung ist eng gekoppelt mit der Atmungskette. Dieser Stoffwechselweg ist in der Membran der Mitochondrien verankert. Die

Atmungskette dient der Konservierung von Energie. Ein großer Energiebetrag wird hier in kleine brauchbare Portionen unterteilt. Die Atmungskette katalysiert die Übertragung von Elektronen von $\text{NADH} + \text{H}^+$ oder reduziertes Ubichinon auf molekularen Sauerstoff. Die Phosphorylierung wird dadurch gehemmt, dass der H^+ -Gradient durch konsequente Stimulation des Elektronentransports und Sauerstoffverbrauch der Atmungskette zusammenbricht. Die Atmungskette besteht aus drei Proteinkomplexen, die in der inneren Mitochondrienmembran liegen. Einer dieser Komplexe (Komplex V) ist die ATP-Synthase. Sie nimmt nicht am Elektronentransport der Atmungskette teil, sondern katalysiert die Bildung von ATP und Wasser aus $\text{ADP} + \text{P}_i$. Das Enzym besteht aus drei aktiven Zentren, welche zur Produktion von ATP drei Phasen eines Zyklus durchlaufen müssen. Zum Phasenwechsel sind Wasserstoffmoleküle notwendig. Diese erhält die ATP-Synthase durch die Aktivität der Komplexe I-IV der Atmungskette. Die Wasserstoffmoleküle gelangen bei diesen Abläufen in den Intermembranraum des Mitochondriums und werden dann durch die ATP-Synthase wieder in den Matrixraum transportiert. Durch Diclofenac wird ein Wasserstoffmolekülgradient ohne ATP-Bildung möglich (= Entkopplerfunktion). Normalerweise sind die ATP-Bildung und der Verbrauch von ATP eng miteinander gekoppelt, damit die Zelle effektiv haushalten kann (= Atmungskontrolle).

Wird also der Aufbau des Protonengradienten verhindert, laufen Substrat-Oxidation und Elektronentransport erheblich schneller ab und statt ATP entsteht Wärme (COOK, 1994; KOOLMAN und RÖHM, 1997; SILBERNAGEL und DESPOPOULOS, 2001).

2.8.2.7 Einfluss auf den Enzymhaushalt

Bhogaraju et al. beobachten in Einzelfällen bei Humanpatienten eine offensichtlich durch Diclofenac induzierte Leberentzündung, die im Extremfall letal verlaufen kann. Messbar ist der Leberschaden anhand eines Anstiegs der Transaminasen AST und ALT, wobei der Anstieg von Dosis und Dauer der Diclofenac-Einnahme abhängig ist. Es kommt neben den typischen Symptomen einer Leberentzündung auch zu Übelkeit, Juckreiz und Fieber. Der genaue Mechanismus, welcher die Entzündung hervorruft, ist weitgehend unbekannt. Bei Biopsien zeigt sich eine deutliche Eosinophilie (BHOGARAJU et al., 1999). Gómez-Léchon et al. gehen davon aus, dass die Toxizität einer Substanz differenziert werden kann. Sie unterscheiden intrinsische Hepatotoxine – diese wirken auf alle Individuen gleich toxisch - und idiosyncratische Hepatotoxine, die aufgrund von Metabolisierungsprodukten für bestimmte Individuen mehr oder weniger toxisch wirken (GOMÉZ-LÉCHON et al., 2001).

Letzteres ist bei Diclofenac als Mechanismus wahrscheinlich. Diclofenac wird durch aromatische Hydroxylierung und azyklische Glukuronidierung biotransformiert, wodurch hochreaktive Metaboliten erzeugt werden (FACHINFORMATION VOLTAREN, 1999). Diese Modifikation wird durch Cytochrome (CYPs) vollzogen. In die Produktion der toxischen Diclofenacmetaboliten sind hauptsächlich die CYPs CYP2C8, CYP2C19 und CYP2C18 involviert. Aber auch CYP2C9 (verantwortlich für die Formierung von 4'-OHDic und 3'-OHDic) und CYP2C19 (verantwortlich für die Formierung von 5'-OHDic und indirekt auch von N-5'Dihydroxydiclofenac) haben hier wichtige Funktionen. Letzteres gehört zu einer Reihe von Isoenzymen, die nicht jeder Mensch in sich trägt. Dieser Sachverhalt könnte eine Erklärung dafür sein, warum es bei Menschen zu der sehr variablen Art der Toxizität von Diclofenac kommt (BORT et al., 1996; GOMEZ-LECHON et al., 2001; KRETZ-ROMMEL und BOELSTERLI, 1993; WATKINS, 1992).

Die Metabolisierung Diclofenacs bewirkt die Bildung reaktiver Metabolite die toxischer sind als Diclofenac selbst. Zwei Hauptmetabolite sind hier zu nennen: 4'-Hydroxydiclofenac (4'-OHDic, entsteht zu fast 60%) und 5'-Hydroxydiclofenac (5'-OHDic, 40%). Andere Produkte sind 3'-Hydroxydiclofenac (3'-OHDic) und N,5-Dihydroxydiclofenac. Toxisch sind hiervon besonders 5'-OHDic und N,5-Dihydroxydiclofenac. Beide treten gleichzeitig in einen Redoxzyklus ein und tragen damit zu einer NADH^+ bzw. NAD^- -Verarmung bei. Alle Metaboliten finden sich in Plasma, Urin oder Galle. Bort geht in seinen Versuchen davon aus, dass die Toxizität hauptsächlich durch eine allergische Reaktion des Körpers getragen wird, die zu einem niedrigeren Hydroxylationstoffwechsel führt (BORT, R., 1999). Weitere Untersuchungen über die Toxizität von Diclofenac wurden unter anderem von Ramakrishna und Iverson gemacht. Beide untersuchten Fallstudien in der Humanmedizin (BHOGARAJU et al., 1999; IVERSON et al., 1990; RAMAKRISHNA und VISWANATH, 1994; WATKINS, 1992).

2.8.2.8 *Wirkung auf den Säure-Basen-Haushalt*

Diclofenac greift in den Glukosehaushalt ein. So kommt es unter Diclofenaceinfluss zu einem Anstieg von Laktat, Pyruvat und Glukose, da die Glykolyse (bildet aus Glukose Pyruvat) und Glykogenolyse (Gewinnen von Glukose durch Verbrauch des in der Leber gespeicherten Glykogens) gesteigert werden (KARLSON und KOOLMAN, 1994; SILBERNAGEL und DESPOPOULOS, 2001). Die Glukoneogenese wird nach Petrescu et al. wohl dosisabhängig und reversibel gehemmt. Dies führt zu einem verminderten Sauerstoffverbrauch der Zellen

(PETRESCU und TARBA, 1996). Die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung wurde zudem von Petrescu et al. bei isoliert perfundierten Rattenlebern, sowie Whitehouse bei isolierten Rattenmitochondrien beobachtet (MASUBUCHI et al., 1999; PETRESCU und TARBA, 1996; WHITEHOUSE, 1964).

Wie bereits erwähnt kommt es bei der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zu einem Absinken des ATP-Gehalts. Dadurch wird die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase gehemmt, so dass kaum noch ein Austausch von Natrium- und Kaliumionen möglich ist. Somit können die Ionengradienten an der Zellmembran nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zu einem Anstieg des extrazellulären Kalium (SILBERNAGEL und DESPOPOULOS, 2001). Das Ansteigen des Laktats und des extrazellulären Kaliums führen zu einem Abfall des pH und des Bikarbonats, so dass es nach einer Phase der Kompensation zu einer Azidose kommt, welche zudem durch die oben genannten toxischen Metaboliten forciert wird (WHITEHOUSE, 1964).

Diclofenac führt offensichtlich zu einer sich langsam forcierenden Hepatopathie. Diese äußert sich in einem Proteinverlust und in einem leichten Anstieg von Bilirubin. Die Schädigung der Membranen aufgrund der Azidose verschont auch die Erythrozyten nicht, was wiederum zu einem zusätzlichen Anstieg des Bilirubins führt (BHOGARAJU et al., 1999; IVERSON et al., 1990; PETRESCU und TARBA, 1997; RAMAKRISHNA und VISWANATH, 1994).

2.9 Einflüsse des Spenderorgans auf das Perfusionssystem

Bei der Nutzung von Schlachthofschweineorganen muss als wesentlicher Parameter der Zustand des Organs bei Entnahme betrachtet werden.

Drei Einflussfaktoren sind hier bedeutend. Zunächst muss der Stress, dem die Tiere durch den Transport an sich ausgesetzt sind, erwähnt werden. Die extreme Anforderung an den Körper der Tiere durch die ungewohnt starke Muskelbeanspruchung ist dabei wesentlich. Auch eine Vorbelastung mit Parasiten ist zu berücksichtigen (WARRIS, 1998).

Die Deutsche Landrasse reagiert extrem empfindlich auf Veränderungen im Lebensumfeld, wie zum Beispiel einen Transport. Sowohl der Verladevorgang, als auch der Transport sind hier Auslöser. Die Tiere entwickeln aufgrund der üblichen, bewegungsarmen Haltung kaum Körperkondition. Ein Transport stellt sehr hohe Anforderungen an den Körper der Tiere. Die

Schweine haben extrem viel Muskelmasse und ein dazu in Relation gesetzt sehr kleines Herz (WENDT et al., 2000). Dies führt bei Belastung zu einem insuffizienten Kreislauf. Die Muskulatur der Tiere kann dadurch nur unzureichend versorgt werden. Zudem weisen viele Tiere eine Mutation des Ryanodinrezeptors an den Muskelzellen auf (MARTENS, 1997). Dieser kann durch Stress leicht aktiviert werden. Es kommt zu einem starken Anstieg von Kalzium im Zytosol des Muskels und damit zu unkontrollierbaren Muskelkontraktionen. Die Muskelarbeit steigert die Körpertemperatur. Dem Körper geht dadurch Wasser verloren, welches die Tiere bis zum Erreichen des Schlachthofes nicht wieder aufnehmen können. Der Flüssigkeitsverlust führt wiederum zu einer Bluteindickung und diese belastet den Kreislauf. Die Tiere kommen in einen Sauerstoffmangel und produzieren durch vermehrte Glykolyse massiv Laktat. Es kommt in den Muskelzellen zu einer Laktatazidose, welche zu einer Muskeldegeneration führt. Dies belastet letztlich die Leber, in der das vermehrt anfallende Laktat abgebaut werden muss (MARTENS, 1997).

Ein zusätzlicher Faktor, der zu einer erhöhten Muskelarbeit beiträgt, liegt in der oftmals zu hohen Beladedichte in den Tiertransportern, aufgrund derer nicht alle Tiere gleichzeitig liegen können (WARRIS, 1998).

Auch parasitäre Belastungen sind zu berücksichtigen. Hier muss vor allem der Befall mit *Ascaris suum* erwähnt werden, welcher so genannte „Milk-spots“ in der Leber bildet. Das Gewebe kann dann stark geschädigt sein, so dass das Organ bei extremem Befall zur Perfusion ungeeignet ist. Wagner und Polley fanden heraus, dass ca. 44% der Schlachtlebern befallen sind, davon 8% schwer (WAGNER und POLLEY, 1997).

2.10 Konservierungslösungen

Die prinzipielle Eignung von Schweineorganen als Transplantationsorgan für den Menschen oder auch adäquates Organ für die Testung von Pharmaka, ist nachgewiesen worden (LOGAN und SHARMA, 1999; STORCK et al., 1998). Das Organ eines Schlachtschweines kommt dem menschlichen Organ sowohl vom Bau, als auch von der Größe und Funktion sehr nahe. Gentechnische Modifikationen eröffnen die Möglichkeit, Abstoßungsreaktionen zu minimieren (LOGAN und SHARMA, 1999; STORCK et al., 1998).

Die Entnahme des Organs hat großen Einfluss auf die spätere Tauglichkeit zur Perfusion. Sowohl mechanische Schäden am Organ, wie auch Schäden aufgrund der Länge der Warmischämie (Entnahmezeit) oder die Spülung mit einer Konservierungslösung und sich

anschließende Lagerung nehmen großen Einfluss auf die spätere Tauglichkeit des Organs (MIZRAHI et al., 1996; WEVERS, 2001).

Das Tier muss zur Organentnahme in Rückenlage verbracht werden. Es soll eine Eröffnung des Abdomens über die Medianlinie erfolgen. Anschließend wird das Darmkonvolut ausgelagert, um die Aorta und V. cava erreichen zu können. Nach visueller Beurteilung des Organs wird zunächst das Zwerchfell durchschnitten, die Zwerchfellpfeiler aufgesucht und präpariert. Es erfolgt nun die Durchtrennung der cranialen Aorta, der A. hepatica und der V. portae, sowie der V. cava caudalis. Das Organ soll dabei nur so wenig wie möglich bewegt werden und die Entnahme so schnell wie möglich erfolgen. Direkt nach der Entnahme erfolgt die kalte Spülung des Organs mit einer geeigneten Konservierungslösung und die kalte Lagerung. Mizrahi et al. empfehlen, die Organversorgung möglichst lange während der Präparationsschritte beizubehalten und die Konservierungslösung über die A. und V. splenica durchzuführen (MIZRAHI et al., 1996). Andere Gruppen entnahmen das Organ und spülten direkt im Anschluss an die Entnahme mit kalter oder warmer Konservierungslösung unterschiedlicher Zusammensetzung, wobei sie gute Ergebnisse erzielten (ABOUNA, 1968; ADKISON et al., 1986; AHMED et al., 2001; BELL et al., 1994; CHANGANI et al., 1999; COHEN et al., 2000; RENTSCH et al., 1996; STEFFEN et al., 1990; SUMIMOTO et al., 1989; WEVERS, 2001).

Die Vitalität der zur Perfusion entnommenen Lebern hängt in bedeutendem Maße von der verwendeten Spüllösung ab. Eine gute Spüllösung minimiert die durch die Hypothermie bedingte Zellschwellung. Sie verhindert die intrazelluläre Azidose und die Erweiterung des interstitialen Raumes. Eine Schädigung durch freie Radikale sollte sie ebenso unterbinden. Sie soll die Substanzen bereitstellen, die eine Regeneration von hoch energetischen Phosphatprodukten ermöglichen (ADKISON et al., 1986). Zu den gängigen Lösungen zählen die Euro-Collins-, University-Wisconsin-, Ringer-Laktat-, Hartmann's-, sowie die HPF3- und HTK-Lösung. Alle genannten Lösungen wurden in ihrer Zusammensetzung von verschiedenen Forschungsgruppen variiert. Ferner wurde der Einfluss durch Osmotika zu diesen Lösungen untersucht (STEFFEN et al., 1990). Die Euro-Collins-Lösung (EC) enthält unter anderem Glukose und die Elektrolyte Na, K, Cl, sowie Phosphor. Versuche mit der EC und im Vergleich dazu mit der University-Wisconsin-Lösung (UW) bei Ratten zeigen, dass histologisch deutliche Anzeichen einer Ischämie bei Anwendung der EC-Lösung zu sehen sind. Hierzu zählen Nekroseherde. Die Hepatozyten zeigen sich abgerundet und lösen sich aus dem Zellverband. Das Parenchym ist durch Zelldetritus teilweise verstopft. Die Vitalität der

Organe ist unbefriedigend. Eine 30-stündige Konservierung in EC-Lösung schädigt die Organe so sehr, dass die Ratten mit solchen Transplantaten innerhalb von 48 Stunden nach der Transplantation versterben. Vergleichbares konnte auch in den histologischen Untersuchungen von Wevers nachgewiesen werden (WEVERS, 2001). Die hier perfundierten Schweinelebern zeigten im histologischen Bild eine passive Leberstauung, eine interstitielle Ödematisierung und eine vakuoläre Leberdegeneration. Auch die gemessenen Blutparameter zeigen eine deutliche Zellschädigung anhand sehr hoher AST-Werte. Das histologische Bild zeigt ischämiebedingte Nekrosen. Im Parenchym ist eine hämorrhagische Nekrose sichtbar. Auch das Organgewicht nimmt hier je nach Lagerungszeit bis zu 17,1% zu. Die Vitalität des Organs und die Überlebensdauer der Tiere in der UW-perfundierten Gruppe sind deutlich länger als in der EC-perfundierten Gruppe (STEFFEN et al., 1990). Häufig genutzt wird deswegen heute die UW-Lösung. Diese Lösung enthält Raffinose - ein Trisaccharid - statt Glukose und als Anionenspender Laktobionat, sowie das Kolloid Hydroxyethyl. Sumimoto et al. variierten die gängige UW-Lösung, indem sie neben der Hydroxyethylstärke auch andere Komponenten, wie Insulin, Adenosin, Baktrin und Allopurinol hinzufügten. Ferner kehrten sie das übliche Na^+/K^+ Verhältnis um. Normalerweise weist die UW-Lösung einen Na-Gehalt von 30 mEq/L und einen K-Gehalt von 120 mEq/l auf. Hier wurde dieses Verhältnis also umgekehrt, so dass der Na-Gehalt nun bei 120 mmol/l und der K-Gehalt bei 40 mmol/l lag. Als optimale Zusammensetzung erwies sich eine UW-Lösung mit Adenosin und dem oben genannten umgekehrten Natrium-, Kaliumgehalt. Die histologische Untersuchung der behandelten Organe zeigte keine pathologischen Veränderungen. Raffinose und das Laktobionatanion verhinderten eine Membranpassage von Elektrolyten und somit ein Eindringen von Wasser und Chlor in die Zelle. Es kam daher kaum zu einer Zellschwellung. Das Kolloid Hydroxyethyl steigerte die onkotische Wirkung der oben genannten Substanzen. Insulin, Baktrin, Allopurinol sowie Magnesiumsulfat und der Phosphatpuffer reduzierten Gluthation und dienten somit als Fänger für freie Radikale. Adenosin fungierte ferner als Regenerator für Adenosinnukleotide (AHMED et al., 2001; CHANGANI et al., 1999; COHEN et al., 2000; SUMIMOTO et al., 1989). Abouna et al. untersuchten die Eignung von Ringer-Laktat-Lösung (RL) zur Spülung von Schweinelebern. Hierzu wurde Schweinen die Leber entnommen und nach Spülung mit der Testsubstanz mit Humanblut perfundiert. Es wurden neben der RL-Lösung in Originalzusammensetzung auch fünf Variationen der RL hergestellt die sich im Elektrolytgehalt unterschieden sowie zusätzlich Insulin oder Dextran enthielten. RL führte sowohl bei der normo-, als auch bei der hypothermen Ischämie zu Schäden an der Zellmembran, indem es die Ionenpumpe inhibierte. Dies führte zu einem

Verlust intrazellulären Kaliums, Chlors und Magnesiums. Somit konnten Chlor, Natrium und Wasser aus dem extrazellulären Raum in die Zelle eindringen. Es kam zu einer Inversion der Zellladung und zu einem Verlust von anorganischem Phosphor und Aminosäuren. Durch den darauf basierenden Zusammenbruch der oxidativen Phosphorylierung folgte eine Akkumulation von Laktat und somit ein Abfall des Gewebe-pH und eine Glykogenverarmung. Die klassische RL-Lösung zeigte hier besonders bei kalter Spülung zellschädigendes Potential. Die Zugabe von Dextran erwies sich dabei als protektiv. Die Zelle zeigte kaum noch Glykogen- und einen sehr geringen Kaliumverlust. Der Sauerstoffverbrauch der reperfundierten Organe war sehr gut (ABOUNA, 1968). Auch Rentsch et al. unternahmen Versuche mit RL-Lösung, verglichen hierbei jedoch die Kalt- und die Warmspülung. Sie spülten Rattenlebern mit 4°C bzw. 37°C temperierter RL-Lösung. Die warme RL-Lösung führte zu einer deutlich verminderten Haftung von weißen Blutzellen an den Sinusoiden. Auch die Kupfferzellaktivität war deutlich geringer als bei der Kaltspülung. Die Stoffwechsellleistung nach Warmspülung war deutlich besser als bei Kaltspülung (RENTSCH et al., 1996; SCHÖN et al., 2001). Versuche mit der Hartmann-Lösung von Bell et al. zeigten, dass diese Lösung zur Spülung ungeeignet ist. Es kam hier zu deutlichen Zellschäden mit geringer Galleproduktion, hohem Kaliumverlust und hohen AST-Spiegeln (BELL et al., 1994; BELL et al., 1997). Die Verwendung von HTK-Lösung (= Lösung nach Breitschneider), einer kardioplegischen Lösung, erwies sich als sehr positiv. Transplantationsorgane für Humanpatienten wurden mit dieser Lösung gespült und zeigten anschließend nach Transplantation eine sehr gute Vitalität mit gutem Sauerstoffverbrauch und Galleproduktion. Die Lösung bot einen guten Schutz gegen die Ausbildung eines Zellödems (GUBERNATIS et al., 1990). Klöppel et al. setzten verschiedenen Konservierungslösungen Osmotika zu und konnten damit zeigen, dass der volumenmindernde Effekt durch Raffinose sehr gut verwirklicht wird (KLÖPPEL et al., 1994). Zuletzt soll nun noch die HPF3-Lösung vorgestellt werden, die von Schön et al. eingesetzt wurde. Die HPF3-Lösung entspricht nahezu der Elektrolytzusammensetzung des Plasmas. Es wurden von Schön et al. Versuche mit Schweinelebern durchgeführt und dazu drei Gruppen gebildet. Eine Organgruppe wurde ausschließlich mit HPF3-Lösung gespült, die anderen beiden Gruppen erhielten noch Zusätze, wie Fruktose, Oleat und 20 essentielle Aminosäuren (Gruppe 2), bzw. Schweineblut, Radikalfänger und den Kalziumkanalblocker Verapamil (Gruppe 3). Die beste Organvitalität wurde mit der Komposition der Gruppe 2 erzielt. Hier waren die Enzymwerte am niedrigsten. So lag zum Beispiel AST bei 170 ± 5 U/l und ALT bei 10 ± 5 U/l, sowie LDH bei 70 ± 14 U/l. Eine ausbalancierte, osmotische Komposition von Elektrolyten ist somit entscheidend für eine

optimale Organfunktion nach Spülung. Die hier verwendete Fruktose verhindert den hypoxischen Zelltod und ist ein Monosacharidspender. Das Oleat ist eine für den Energiestoffwechsel wichtige Fettsäure. Die hier zugegebene Aminosäuremischung ist eine gute Grundlage für einen vitalen Zellstoffwechsel (SCHÖN et al., 1993).

2.11 Organschäden durch Ischämie und Spülung

Zu Versuchszwecken entnommene Schlachthoforgane werden vor der eigentlichen Reperfusion mit einer kalten Konservierungslösung durchgespült, um Blutreste zu entfernen und den Zellstoffwechsel abzusenken. Eine möglichst schnelle Abkühlung ist dabei anzustreben (YADAV et al., 1997). Die auftretende Ischämie, in Form einer Warmischämie (Entnahme des Organs aus dem Spendertier) und Kaltischämie (Spülung mit der kalten Konservierungslösung) bedeutet eine Unterbrechung der Durchblutung (sinusoidaler Blutstau) und damit eine Hypoxie mit der Gefahr des Zelltodes (BURRA et al., 2001; SCHÖN et al., 1993). Warm- und Kaltischämie führen zu einem negativen Einfluss auf biochemische Vorgänge, Zellmilieu, Elektrolytimbalanz und Radikalbildung (BELL et al., 1997; CLAVIEN et al., 1992; GERLACH et al., 1997; HASSELGREN, 1987; IKEDA et al., 1991). Histologisch sind diese Einflüsse an Schädigungen der die Sinusoide auskleidenden Zellen (SLC), den Kupfferzellen und den Zellmembranen im Allgemeinen sichtbar (CLAVIEN et al., 1992; GERLACH et al., 1997). Das schnelle Herunterkühlen des körperwarmen Organs führt zu einem starken Abfall der metabolischen Rate und einer 12- bis 13fach verminderten Enzymaktivität (CLAVIEN et al., 1992). Der unphysiologische Energiezustand und das Substratdefizit führen zu einem Mangel an ATP und ADP, wodurch es zu einer Steigerung der anaeroben Glykolyse kommt. Intrazellulär führt dies zu einer Laktatazidose und zu einem vermehrten Anfall von Hypoxanthin (CLAVIEN et al., 1992; LEMASTERS et al., 1983). Die Hypoxanthinoxidase oxigeniert Xanthin, wodurch freie Sauerstoffradikale entstehen, die zu einer Schädigung der Zellmembran durch Peroxidierung der dort vorhandenen freien Fettsäuren führen (ADKISON et al., 1986; CLAVIEN et al., 1992, HASSELGREN, 1987). Gleichzeitig werden Proteasen aktiviert (HOFFSTEIN et al., 1975; WILDENTHAL, 1978) und greifen so zusätzlich die geschädigte Zellmembran an. Die Na^+/K^+ -ATPase wird durch den Temperaturabfall gehemmt, so dass sich Na^+ und K^+ intrazellulär ansammeln (CLAVIEN et al., 1992). Die negative intrazelluläre Ladung geht durch Cl^- -Einstrom verloren, was einen Wassereintritt in die Zelle und damit deren Anschwellen bewirkt (BELL et al., 1997; CLAVIEN et al., 1992; GERLACH et al., 1997; IKEDA et al., 1991; LEMASTERS et al., 1983). Diese Veränderungen bewirken ein Abheben der SLC von den Endothelzellen. Die Endothelzellen enthalten Fenestrationen, die nun kollabieren und dicke Stränge bilden.

Hierdurch werden die hepatozellulären Mikrovilli ins Sinusoidallumen exprimiert, es kommt zur Leukozytenakkumulation und Plättchenaktivierung mit dadurch bedingter Verlegung der Lumina (BELL et al., 1997; CLAVIEN et al., 1992; GERLACH et al., 1997). Die Reperfusion wird hierdurch deutlich erschwert (GERLACH et al., 1997; KOIZUMI et al., 1989; MCKEOWN et al., 1988; TERAMOTO et al., 1993; WEVERS, 2001).

Es ist möglich, diese Ischämieschäden durch Vorbehandlung mit bestimmten Substanzen zu minimieren (ADKISON et al., 1986; BURRA et al., 2001; HASSELGREN, 1987; IKEDA et al., 1991). Burra et al. verabreichten hierzu vor Induktion einer zweistündigen Ischämie durch Abklemmen des hepatischen Hilus in einer Gruppe L-Arginin und in einer Gruppe Oligotid und verglichen diese beiden mit einer unbehandelten Kontrollgruppe. L-Arginin schützte hierbei nachweislich vor der oben genannten Lipoperoxidation und dem Anstieg von Malondialdehyd (BURRA et al., 2001). Hasselgren stellte in einer Übersichtsarbeit die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zusammen. Es ergab sich hierbei, dass eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit Chlorpromazin eine Akkumulation von Ca^{2+} während der Ischämie deutlich verringert, da es den Influx hemmt und zusätzlich lysosomale Enzyme aktiviert. Ebenso wirkt sich die Gabe von Chloroquin positiv auf die Vitalität des Spenderorgans aus. Chloroquin verhindert eine Degeneration der Phospholipide und trägt somit zur Aufrechterhaltung der Zellmembran als semipermeabler Barriere bei. Besonders effektiv zeigte sich die Behandlung der Organe mit Coenzym Q_{10} . Coenzym Q_{10} ist ein Radikalfänger und verhindert somit die Ansammlung freier Sauerstoffradikale. Diese Beobachtung machten auch Adkison und Kollegen (ADKISON et al., 1986). Zusätzlich wird durch Coenzym Q_{10} die mitochondriale Respirationsrate gesteigert und damit das Energieniveau des Gewebes verbessert. Eine Verminderung des Ca^{2+} -Influses wurde hier ebenfalls beobachtet.

2.12 Perfusionssysteme

Humanpatienten mit akutem Leberversagen konnte früher kaum geholfen werden. Deshalb widmeten sich viele Gruppen der Suche nach Systemen, die es ermöglichen den Zustand des Leberversagens zu überbrücken oder den Zustand des Patienten wenigstens zu verbessern. Es können sechs Ansätze unterschieden werden (ABOUNA, 1968; CHEN et al., 1997; FLENDRIG et al., 1999; HORSLEN et al., 2000; MAKOWKA et al., 1995; SAKAMOTO et al., 1996; SCHÖN et al., 1993; YANAGA et al., 1990). Das Patientenblut kann über ein System gefiltert werden (CHEN et al., 1997; FLENDRIG et al., 1999; MAKOWKA et al., 1995) - hierzu zählen auch so genannte Bioreaktoren (SCHÖN et al., 1993). Eine weitere

Möglichkeit besteht darin, dem Patienten ein Spenderorgan tierischen Ursprungs unter das Eigenorgan zu setzen, welches dann die Eigenleber entlastet (HORSLEN et al., 2000). Sehr belastend ist die Leberektomie mit Anschluss des Patienten an einen Perfusionskreislauf, welcher ein Spenderorgan tierischen Ursprungs enthält (MAKOWKA et al., 1995). Die nächste Stufe sind Perfusionssysteme ohne Dialyseeinheit. Es folgen Perfusionssysteme mit Oxygenator, aber ohne Dialyseeinheit. Den Abschluss bilden komplexe Systeme mit Dialyseeinheit. Das Organ liegt einer Unterlage auf oder wird mehr oder weniger schwebend in einer mit Wasser gefluteten Kammer gelagert (NEUHAUS und BLUMHARDT, 1993).

2.12.1 Leberunterstützungssysteme

Eine solche Methode stellten Matsushita und Nosé 1986 vor. Das Patientenblut wurde in einem Plasmadetoxifikationsapparat gefiltert. Bisher waren dabei immer Kohlefilter verwendet worden. Diese Gruppe jedoch separierte das Plasma vom Gesamtblut. Das Plasma wurde über Membranen gefiltert und dann dem Blut wieder zugeführt. Dies ermöglichte es, dem Patienten lebenswichtige Gerinnungsfaktoren zuzusetzen und makromolekulare Toxine zu entfernen (MATSUSHITA und NOSÉ, 1986).

Ein MARS-System (**M**olekulares **A**dsorbierendes **R**ecycling-**S**ystem) sollte verhindern, dass Schadstoffe von den eingesetzten Zellen im Reaktor (z.B. vom Schwein) auf die menschlichen Blutzellen übertreten. Dieses System war nahezu undurchlässig für Proteine, ließ aber wasserlösliche und proteingebundene Toxine passieren. Das System wurde bei 13 Patienten angewandt die an Leberversagen litten und auf die Standardtherapie nicht ansprachen. Die Überlebensrate der Patienten lag bei 69% (STANGE et al., 1999).

2.12.2 Hybride Bioreaktoren und künstliche Leberunterstützungssysteme

Bei dem von Flendrig et al., sowie Chen et al. genutzten BAL-System (**B**ioartificial-**L**iver-**S**ystem) wurden metabolisch aktive Hepatozyten in einen extrakorporalen Bioreaktor verbracht. Dort hatten sie keinen direkten Kontakt mit dem Blut. Sie waren durch semipermeable Membranen von diesem getrennt. Das BAL-System enthielt einen Plasmakreislauf mit einem Bioreaktor und einem Blutkreislauf, in welchen ein Plasmaseparator eingebaut war. Chen et al. wandten das System an 28 Patienten mit Leberversagen an. Die Patienten wurden über einen Plasmaseparator mit dem Zirkulationskreislauf des BAL-Systems verbunden. Flendrig et al. wandten das System an 31 Schweinen an. Bei diesen wurde eine totale Devaskularisation der Leber durch einen terminolateralen Portokavalshunt durchgeführt und der Gallengang zugenäht. Das Blut wurde aus der

linken Femoralarterie des Versuchsschweines in einen Zentrifugenplasmaseparator geleitet, um das Plasma vom Blut zu trennen. Anschließend wurde das Plasma in das BAL-System geleitet, danach mit dem Blut wieder vereint und dem Versuchstier zugeführt. Die Tiere mit dem eingesetzten BAL-System zeigten längere Überlebenszeiten. Die Blutammoniak- und Totalbilirubinwerte waren deutlich niedriger als bei den Tieren ohne eingesetztes BAL-System (CHEN et al., 1997; FLENDRIG et al., 1999). Da Schweinehepatozyten eine große Ähnlichkeit mit humanen Hepatozyten haben, eignen sie sich gut als Modell. Busse und Gerlach entwickelten daher einen Bioreaktor, der mit Schweinehepatozyten und sinusoidalen Endothelzellen bestückt wurde. Drei Kapillarsysteme wurden hierzu verwoben, um Dreidimensionalität zu erreichen und somit die Situation des Organs Leber möglichst naturgetreu zu imitieren (BUSSE et al., 1999; GERLACH et al., 1994; GERLACH, 1996; GERLACH et al., 1997). Schon 1975 hatten Wolf et al. einen ähnlichen Ansatz gemacht und kombinierten Leberzellen mit Kapillaren zu einem dreidimensionalen System. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass Hepatozytenkulturen über mehrere Wochen am Leben erhalten werden konnten und sich dabei selbst in gewebeähnlichen Strukturen organisierten. Aldinger und Gerlach wandten ein Leberunterstützungssystem bei Schweinen an. Vor dem Versuch wurden Schweinehepatozyten isoliert und in den Bioreaktor verbracht. Den Tieren wurde die Leber entfernt und sie wurden an das System angeschlossen (ALDINGER, 2001).

2.12.3 Humane Leberunterstützungssysteme mit und ohne Schweinespenderleber

Bei diesem Ansatz verblieb das Eigenorgan des Patienten immer am Platz. Darunter wurde temporär das Spenderorgan eines Schweins implantiert und über End-zu-End-Anastomosen mit dem Patientenorgan verbunden. Hierdurch war es möglich, ein bereits bestehendes Leberkoma aufzuheben (MAKOWKA et al., 1995).

Über Katheter stellten Chari et al. eine Verbindung zwischen dem Patienten und einer extrakorporal gelagerten Schweineleber her. Das Patientenblut trat aus der Femoralarterie aus, passierte einen Membranoxygenator und dann das Spenderorgan, bevor das Blut über die Jugularvene dem Patienten wieder zugeführt wurde. Es waren deutliche Verbesserungen des Bewusstseins aufgrund der Verminderung des Serumammoniaks herbeizuführen. Auch die Serumbilirubinwerte fielen deutlich ab (CHARI et al., 1994).

Einen vergleichbaren Ansatz unternahmen Nakamura et al. Hier wurden Empfängertiere (Schweine) durch einen Seit-zu-Seit-Portokavalshunt leberinsuffizient gemacht. Das Blut des Empfängertieres wurde dann über die Femoralarterie einem extrakorporalen Kreislauf

zugeführt, welcher ein Spenderorgan enthielt. Das gefilterte Blut wurde dem Empfängertier über die Femoralvene wieder zugeführt. Selbst 12 bis 24 Stunden Perfusionsdauer schädeten den Donororganen nicht. Auch histologisch waren keine signifikanten Schäden sichtbar. Gleichzeitig war das System in der Lage, schnell auf metabolische Forderungen des Empfängerorganismus zu reagieren (NAKAMURA et al., 1999).

2.12.4 Isolierte Hämoperfusion

Yanaga et al. entwickelten ein „Leberperfusions- und Schutzsystem für große Tiere“ (Schweine). Ausgangsgerät war hier die Nierenperfusionsmaschine Model MOX-100². Diese Perfusionsmaschine wurde im Aufbau an die anatomischen Verhältnisse der Leber angepasst. Als Versuchstier wurde das Schwein gewählt. Das Organ wurde in einer Wanne gelagert. A. hepatica, V. portae und der Gallengang wurden kanüliert. Das Blut gelangte aus einem Reservoir in die V. portae. Dabei wurde das Blut der A. hepatica vor Eintritt in die Leber über eine pulsatile Pumpe in eine Luftfalle geleitet. Durch die V. cava gelangte das Blut über eine Rollerpumpe in einen Wärmeaustauscher, in welchem ein Membranoxygenator eingebaut war. Nach Passage einer Luftfalle floss das Blut in das oben genannte Reservoir zurück. Der Aufbau erlaubte eine reproduzierbare Reperfusion der Leber. Somit waren biochemische und hämodynamische Untersuchungen möglich. Zudem war der Aufbau kostengünstig und einfach zu bedienen (YANAGA et al., 1990).

Den Perfusionsapparat ORPH3000C nutzen Sakamoto et al. um Schweinelebern mit Humanblut zu perfundieren. Das Blut gelangte aus einem Reservoir über eine Rollerpumpe in den Wärmeaustauscher. Bevor es den Membranoxygenator passierte, wurden der pH, O₂- und der CO₂-Gehalt gemessen. Danach erfolgte der Eintritt in das Tierorgan. Mit einem Laser-Mikrozirkulationszähler wurde der Fluss gemessen. Über einen Filter geleitet gelangte das Blut wieder in das Reservoir. Die Ergebnisse zeigten, dass der Apparat ORPJ3000C gut zur Organperfusion geeignet war und für Xenotransplantationsstudien nützlich sein konnte (SAKAMOTO et al., 1996).

Der Aufbau von Abouna enthielt eine Kammer, in welche das Organ verbracht wurde. Über ein Reservoir erhielt das Organ seine Blutversorgung. Der Ductus choledochus wurde kanüliert und an ein Auffanggefäß für die Galle angeschlossen. Nach Durchfließen der Leber gelangte das Blut, einen Flussmesser passierend, in den Oxygenator. Nach Passage des

² Waters Instruments, Ltd, Rochester, MN

Wärmeaustauschers und eines Filters erreichte das Blut wieder das Reservoir. Die Perfusion wurde acht Stunden aufrechterhalten und mit Humanblut durchgeführt. Ein negativer Einfluss des Humanblutes wurde nicht nachgewiesen (ABOUNA, 1968). Einen vergleichbaren Ansatz wählten Schön et al. Auch dieser Perfusionskreislauf enthielt eine Dialyseeinheit und einen Oxygenator. Somit konnten der pH und der Gehalt an Elektrolyten angepasst werden. Die Gesamtdauer der Perfusion konnte so enorm gesteigert werden (SCHÖN et al., 2001).

Eine Verfeinerung der Perfusionssysteme gelang Neuhaus et al. Hier wurden ebenfalls Schweinelebern genutzt. In die V. portae und die A. hepatica wurden nach der Entnahme Stents eingesetzt. Diese wurden dann mit speziellen Verbindungen gekoppelt. Das Organ wurde in eine Plastikhülle gelegt und mit den Verbindungen an den Perfusionsaufbau gesteckt. Die Leber lagerte hier in einer Plexiglaskammer. Diese wurde nach Verschluss der Verbindungen zwischen Plastikhülle und Plexiglaskammer mit Wasser geflutet. Dadurch legte sich die Folie direkt an das Organ. Somit war das Organ im Perfusionsaufbau nahezu physiologisch gelagert. Es schwebte in dem Wasserbad, auf das gesamte Organ wirkte ein gleichmäßiger Druck von außen ein. Die Drücke in den zu- und abführenden Gefäßen konnten dadurch absolut stabil gehalten werden. Es waren Versuche von über 24 Stunden Dauer möglich, ohne dass die Vitalität des Organs nachließ. Histologisch waren keine nennenswerten Veränderungen sichtbar (NEUHAUS et al., 1992).

Ito et al. untersuchten den Einfluss von automatischen Blutpumpen auf das Organ Leber in einem Perfusionskreislauf. Sie stellten fest, dass die Pumpen einen gleichmäßigen Fluss gewährleisten und störungsfrei arbeiteten. Es waren keine zellulären Schäden am Organ oder aufgrund von Sauerstoffmangel zu finden (ITO et al., 1995).

2.13 Kontrolle und Aufrechterhaltung der Organvitalität unter der Perfusion

Die Kontrolle der Organvitalität während der Perfusion ist von entscheidender Wichtigkeit. Dazu gehört einerseits die makroskopische Beurteilung, wie auch die ständige Kontrolle bestimmter Blutparameter. Hierzu zählen der pH, pO_2 und pCO_2 , sowie Bikarbonat, Kalium, Natrium und Chlor. Aber auch Parameter wie Glukose-, Laktat-, Enzym- (AST, ALT und LDH) und der Bilirubingehalt sind wichtig. Der Gallefluss ist ebenfalls ein Indikator für Lebervitalität. Der Gehalt an weißen Blutkörperchen und Thrombozyten sollte ebenfalls ständig kontrolliert werden (BORIE et al., 2001; FISCHER und WUSTROW, 1977, WEVERS, 2001).

Drapanas et al. untersuchten den Einfluss des Blutflusses auf die Organvitalität. Sie perfundierten Schweinelebern mit einem Fluss von 0,5 – 1,0 ml/g Leber/min. Dieser Wert gilt heute noch als Voraussetzung für eine erfolgreiche Perfusion. Bei diesem Fluss ist der pH nahezu konstant und braucht nicht mit Hilfe von TRIS-Puffer oder Bikarbonat eingestellt zu werden. Auch der Gallefluss ist dann mit 4,8 ml/h gut. Der Sauerstoffverbrauch ist maximal bei einem Fluss von 0,9 l/min., wobei 1 ml Blut pro Gramm Leber in der Minute fließen sollte und beträgt dann 0,03 cc/min/Gm. Eine im Anschluss durchgeführte histologische Untersuchung zeigte bei Drapanas et al. keine pathologischen Auffälligkeiten (DRAPANAS et al., 1966).

Auch Abouna wies auf die optimale Beurteilung der Vitalität des Organs Leber anhand der Galleproduktion und des Sauerstoffverbrauchs hin. Der Sauerstoffverbrauch verdeutlicht die Lebensfunktion des Organs, die Galleproduktion die Stoffwechsellistung. Laktat- und Pyruvatanfall geben indirekt Aufschluss über den Metabolismus. Sie weisen auf den NAD-Gehalt bzw. die Effizienz der Atmungskette durch Oxidation von NADH hin (ABOUNA, 1968). Bowers et al. und Foley et al. betonten die Bedeutung des Galleflusses als Vitalitätskriterium. Aber auch die Messung des pH und des Glukosegehaltes wurden hier hervorgehoben. In Perfusionen zeigte sich immer wieder eine deutliche Hyperglykämie (BOWERS et al., 1987; FOLEY et al., 1999).

Als besonders wichtigen Parameter stuft Krebs einen optimalen Elektrolytgehalt ein. Eine gute Balance sei hier von entscheidender Bedeutung. Ein Abfall von Bikarbonat gehe mit einer sprunghaften Bildung von Laktat einher. Dieses belaste die Leber zusätzlich. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung sei ebenfalls entscheidend. Diese verhindere die Bildung von Laktat aufgrund einer sonst notwendigen Steigerung des anaeroben Stoffwechsels. Da die Leber hauptsächlich Fette als Energielieferanten umsetzt, sei der Zusatz freier Fettsäuren wichtig. Die Entnahme des Organs bedingt eine Trennung vom Darmkonvolut, der wichtigsten Bezugsquelle für Fettsäuren. Ein Zusatz von Oleat oder anderen freien Fettsäuren zum Perfusionsmedium sei von Vorteil (KREBS, 1974).

2.14 Normwerte

Die Normwerte in der Literatur für das Tier Schwein sind teilweise voneinander abweichend. Die **Tabelle 1** soll einige Werte aus der Literatur vergleichend darstellen (JAKSCH und GLAWISCHNIG,1999; KRAFT und DÜRR, 1999).

Parameter	Kraft/Dürr	Jaksch/Glawischnig	FU-Berlin*
Enzyme usw.			
AST	bis 68 U/l	bis 40 U/l	bis 68 U/l
ALT	bis 35 U/l	bis 35 U/l	bis 35 U/l
Kreatinin	0,40 - 1,33 mmol/l	0,45 - 1,5 mmol/l	bis 0,43 mmol/l
Laktat			n.a.
Protein	8,6 mg/dl	5,0 - 8,0 g/dl	bis 8,3 g/dl
Albumin	1,8 - 3,1 g/dl	3,8 g/dl	n.a.
Elektrolyte			
Kalium	5,0 mmol/l	4,5 - 6,5 mmol/l	4,0 - 5,0 mmol/l
Säure-Basen			
pH (art.)	7,42	7,39 - 7,45	n.a.
HCO ₃ (art.)	20 - 30 mmol/l	20 - 26 mmol/l	n.a.
BE (art.)	3,5 mmol/l	1,0 - 4,0 mmol/l	n.a.
Blutbild (rot)			
Erythrozyten	5,8 - 8,1 10 ⁶ /pl	6,0 - 9,0 10 ⁶ /pl	5,8 - 8,1 10 ⁶ /pl
Hb	10,8 - 14,8 g/dl	11 - 15 g/dl	10,8 - 14,8 g/dl
Hkt	33 - 45%	30 - 42%	33 - 45%

n.a. = nicht angegeben

* = Klinik für Klauentiere, Leiter: Univ.Prof.Dr. R. Staufenbiel

Tab. 1: Darstellung der in der Literatur angegebenen Normwerte für das Schwein.