

**Aus der Tierexperimentellen Einrichtung Charité, Campus Virchow- Klinikum,
Medizinische Fakultät der Humboldt- Universität zu Berlin,
eingereicht über das Institut für Veterinär - Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Titel der Arbeit: Autolog perfundierte Schweinelungen von Schlacht- und
Versuchstieren.**

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

**vorgelegt von
Alexander Baron von Engelhardt
Tierarzt
aus Kiel**

**Berlin
2003**

Journal-Nr.: 2525

**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan:	Univ.- Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter:	PD Dr. C. Große-Siestrup
Zweiter Gutachter:	Univ.- Prof. Dr. H. Hartmann
Dritter Prüfer:	Univ.- Prof. Dr. R. Rudolph

Deskriptoren:

animal testing alternative; reduction refinement replacement; experimental animal; pig; lung; isolated organ system; blood perfusion model; slaughterhouse; live estimation; ischaemia reperfusion injury; oedema; non heart beating donor; preservation; intracellular solution; extracellular solution; isotonic saline solution; NaCl; Low potassium dextran; LPD; v. Baeyer II; PAP; pulmonary arterial pressure; double occlusion technique; oxygen absorption; oxygen saturation; oxygen partial pressure; carbon dioxide partial pressure; pH; total pulmonary resistance; peak pressure; dynamic compliance

Tag der Promotion:

04.07.2003

Meinen Eltern

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Tierversuche, Versuchstiere und Alternativen	3
2.2	Pulmonaler Ischämie- Reperfusions- Schaden.....	5
2.2.1	Ischämie und Gewebehypoxie.....	5
2.2.2	Wiederbelebungszeiten der Lunge	7
2.2.3	Lungenkreislauf und Reperfusion	8
2.2.4	Flüssigkeitsaustausch durch die Kapillarwand.....	11
2.2.5	Ursachen der Ödementstehung.....	12
2.2.6	Zelluläre Mechanismen des Ischämie- Reperfusions- Schadens	13
2.3	In vitro Lungenperfusion	15
2.4	Schweine aus der landwirtschaftlichen Produktion	19
3	Tiere, Material und Methoden	22
3.1	Versuchstiere und für die Perfusion verwendete Lungen	22
3.1.1	Zur Lungenentnahme narkotisierte Schweine.....	22
3.1.2	Schlachthoflungen	22
3.1.3	Gruppenzuordnung.....	25
3.2	Vorarbeiten und Vorbereitung für die Lungenperfusion	28
3.2.1	Narkose und Lungenentnahme bei den narkotisierten Schweinen.....	28
3.2.2	Lungenentnahme von Schlachtschweinen.....	29
3.2.2.1	Lungenmassen am Schlachthof.....	31
3.2.2.2	Kanülierung der Lungengefäße	31
3.2.2.3	Konservierung der Lungen.....	32
3.2.2.4	Qualität der entnommenen Lungen	35
3.2.2.5	Transport und Dauer der Konservierung.....	38
3.2.3	Perfusionsaufbau (Abb. 1)	39
3.2.4	Lungenperfusion	43
3.2.5	Equilibrierung im Perfusionskreislauf.....	44
3.2.5.1	Drücke	44
3.2.5.2	Atemmechanik	46
3.2.5.3	pH- Wert	46
3.2.5.4	Elektrolyte	47
3.2.5.5	Hämatokrit	47

3.2.5.6	Deoxygenierung.....	47
3.2.6	Messungen während der Plateauphase.....	48
3.2.7	Messmethoden und daraus berechnete Parameter.....	48
3.2.7.1	Nicht eingestellte Parameter der Lungenperfusion	49
3.2.7.2	Berechnete Parameter.....	50
3.2.7.2.1	Änderung der Lungenmassen während der Perfusion.....	50
3.2.7.2.2	Blutfluss	51
3.2.7.2.3	Gefäßwiderstände, Gesamtwiderstand, pulmonal arterieller und pulmonal venöser Widerstand	52
3.2.7.2.4	Sauerstoffaufnahme	54
3.2.7.2.5	Dynamische Compliance	56
3.3	Histologische Untersuchungen der entnommenen Proben.....	56
3.4	Statistische Prüfverfahren.....	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Ischämiezeit.....	59
4.2	Pulmonal arterieller Druck, pulmonal venöser Druck und kapillärer Verschlussdruck.	59
4.3	Histologische Bestimmung von Alveolarseptendicke und Neutrophilen	61
4.4	Equilibrierung.....	64
4.5	Gemeinsame Grundgesamtheit.....	65
4.5.1	In vivo Messungen (Gruppe 1).....	65
4.5.2	Messungen bei in vitro Perfusionen.....	65
4.5.2.1	Vom Versuchstier entnommene Lungen (Gruppe 2)	65
4.5.2.2	Am Schlachthof entnommene Lungen.....	66
4.5.2.2.1	Makroskopisch unauffällige Qualität (Gruppe 3).....	66
4.5.2.2.2	Makroskopisch verdächtige Qualität (Gruppe 4).....	66
4.5.2.2.3	In Lebendbeschau unauffällige Tiere (Gruppe 5).....	66
4.5.2.2.4	In Lebendbeschau verdächtige Tiere (Gruppe 6)	67
4.5.2.2.5	Konservierung mit isotoner Kochsalzlösung (Gruppe 7).....	68
4.6	Gruppenweise Gegenüberstellung der Messparameter	68
4.6.1	In vitro Perfusion makroskopisch unauffälliger und verdächtiger Lungen.....	68

4.6.2	In vitro Perfusion der Lungen von in der Lebendbeschau unauffälligen und verdächtigen Tieren.....	72
4.6.3	Messungen in vivo und in vitro an Lungen von denselben Tieren	76
4.6.4	In vitro Perfusion an Lungen von den Versuchstieren und vom Schlachthof in Gruppe 5	81
4.6.5	Konservierung mit den drei Lösungen	86
5	Diskussion.....	91
5.1	Tierversuch und Ersatzmethode	91
5.2	Perfusion von Schlachthoflungen und Standardisierung	92
5.2.1	Bedeutung der Ischämiezeiten	92
5.2.2	Standardisierung und vorgegebene pulmonal arterielle Drücke	96
5.2.3	Pulmonal kapillärer Verschlussdruck	98
5.2.4	Massenzunahmen, pulmonales Ödem und histologische Befunde.....	100
5.2.5	Equilibrierung innerhalb der ersten 45 Minuten	103
5.2.6	“Steady State“- Phase im 60 bis 90 Minuten-Intervall.....	107
5.2.7	Organqualität und im “Steady State“ gemessene Parameter.....	111
5.2.7.1	Makroskopisch unauffällige und makroskopisch verdächtige Lungen.....	111
5.2.7.2	Lungen von in der Lebendbeschau unauffälligen und verdächtigen Tiere.....	114
5.2.8	In vitro Perfusion und Ischämie- Reperfusion- Schäden	115
5.2.8.1	Messungen an narkotisierten Schweinen (Gruppe 1)	115
5.2.8.2	Messungen in vivo und in vitro an Lungen von denselben Tieren	117
5.2.8.3	Messungen in vitro an Lungen von Versuchstieren und von Schlachthoftieren der Gruppe 5	124
5.2.9	Bedeutung der Konservierungslösung	127
6	Schlussfolgerung	132
7	Zusammenfassung	134
8	Summary	137
9	Literaturverzeichnis.....	140

Abbildungsverzeichnis	V
Selbstständigkeitserklärung	165
Danksagungen	166
Lebenslauf	167

Abkürzung	Erklärung
AMV	Atemminutenvolumen
art	arteriell
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BMELF	Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	cyclo Adenosinmonophosphat
C _{dyn}	dynamische Compliance
cGMP	cyclo Guanosinmonophosphat
CO ₂	Kohlendioxid
ΔP	hydrostatische Druckdifferenz
Δπ	kolloidosmotische Druckdifferenz
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
EC	Euro Collins-Lösung
FiO ₂	Sauerstoffanteil in der zugeführten Atemluft
HPF	High Power Field
K ⁺	Kaliumionen
LPD	Low Potassium Dextran
M _{perf}	Änderung der Lungenmasse während der Perfusion
MPG	Max-Planck-Gesellschaft
N	Anzahl der Lungen
n	Anzahl der Messungen
n.s.	nicht signifikant
Na ⁺	Natriumionen
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickoxid
N ₂	Stickstoff
O ₂	Sauerstoff
PAP	mittlerer pulmonal arterieller Druck
Part	pulmonal arteriell
P _c	hydrostatischer Druck in den Kapillaren
P _{eff}	effektiver Filtrationsdruck
PEG	Polyethylenglykol
P _i	hydrostatischer Druck im Interstitium

π_c	kolloidosmotischer Druck des Blutplasmas
π_i	kolloidosmotischer Druck der interstitiellen Flüssigkeit
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
Pven	pulmonal venös
PVP	Pulmonal venöser Druck
PVR	pulmonal vaskulärer Widerstand
PVR _{Qt}	blutflussbezogener Gesamtwiderstand zwischen den präkapillären- und postkapillären Widerstandsgefäßen der Lunge
Qt	Blutfluss pro Gramm Lungenmasse
R 1 bis 3	Rollerpumpen im Aufbau
Rart	pulmonal arterieller Widerstand
Rart _{Qt}	blutflussbezogener Anteil der präkapillären Widerstands- und Sphinktergefäße am Gesamtwiderstand
Rven	pulmonal venöser Widerstand
Rven _{Qt}	blutflussbezogener Anteil der postkapillären Widerstandsgefäße am Gesamtwiderstand
sO ₂	Sauerstoffsättigung des Hämoglobins
tHb	Gesamthämoglobinkonzentration
UW	University of Wisconsin
ven	venös
ZVD	zentral venöser Druck

Hiermit versichere ich, dass alle für die Anfertigung meiner Promotionsschrift genutzten Hilfsmittel und Hilfen im Kap. 3 sowie der Danksagung aufgeführt sind und ich die Arbeit auf dieser Grundlage selbstständig verfasst habe.

Alexander v. Engelhardt

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits auf folgenden Tagungen vorgestellt sowie als Originalarbeit publiziert:

Dittrich, S.; Dähnert, I.; Engelhardt, A. v.; Koios, D.; Hegemann, O.; Meissler, M.;

Grosse-Siestrup, C.; Lange, P. E. (2000):

The isolated perfused pig lung - gas exchange measurements for assessment of lung function.

In: Pittermann, W.; Kietzmann, M.; Grosse-Siestrup, C. (Hrsg.):

Proceedings of a workshop on isolated perfused organs.

London: Society for Laboratory Animal Science, S. 85- 94.

Engelhardt A. v.; Dittrich, S.; Lippek, F.; Hegemann, O.; Koios, D.; Gröben, J. v. d.;

Grosse-Siestrup, C.; Lange, P. E. (2000):

An alternative investigation method for animal experiments in ischemia/reperfusion injury. The use of pig lungs and blood from slaughterhouse for isolated organ perfusion.

Essen: 38. Tagung der Gesellschaft für Versuchstierkunde, 11. bis 14. September 2000.

PD Dr. C. Große- Siestrup ermöglichte mit der Überlassung des Themas diese Dissertation. Ich danke für die Anleitung und Unterstützung bei der Arbeit in der Tierexperimentellen Einrichtung in seiner Funktion als Projektleiter und Leiter dieser Institution. Ihm bin ich auch durch die gemeinsame Arbeit bei Einrichtung des Kurses „Versuchstiere, Tierversuche, Alternativmethoden“ zu Dank verpflichtet.

Die Dissertation wurde mit einem Forschungsstipendium (Proj. Nr. 511- 4003-0311021) der Charité, medizinische Fakultät der Humboldt- Universität zu Berlin, vertreten durch den Prodekan für Forschung Prof. Dr. Frömmel und dem Leiter der akademischen Verwaltung Dr. Bodin, unterstützt.

Einen besseren Betreuer als Dr. S. Dittrich, Projektgruppenleiter, Abteilung für angeborene Herzfehler, Leiter Prof. Dr. Lange, Deutsches Herzzentrum Berlin, kann ich mir nicht vorstellen. Ich danke Ihm für die reichlich gewährte Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dr. h.c. W. v. Engelhardt, Emeritus, der mich mit seiner großen Kompetenz in dieser Arbeit angeleitet und ermutigt hat. Meinen Eltern danke ich für alle Unterstützung im Rahmen dieser Arbeit.

Dr. M. Meissler danke ich für die Hilfe und Anleitung bei den Operationen.

Für die Anfertigung der histologischen Präparate und die Unterstützung bei der Auswertung bedanke ich mich bei Frank Lippek, Institut für Pathologie, Charité, medizinische Fakultät der Humboldt- Universität zu Berlin.

Die Arbeit in unserem “Perfusionsteam“ hat mir viel Freude bereitet, deshalb mein Dank an Olaf Hegemann, Dimitri Koios, Juliane Gräfin v.d. Gröben und Mike Dunz.

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Name Alexander Baron von Engelhardt
 Geburtsdatum,- ort 27.02.67 in Kiel

Eltern Dorothea Baronin von Engelhardt, geb. von Roth,
 Dipl. Psychologin
 Georg Robert Baron von Engelhardt, Dipl. Volkswirt,
 Geschäftsführer einer Krankenhaus- GmbH

Geschwister Boris Woldemar (Arzt im Praktikum)
 Lars Victor, Dr. med. (Assistenzarzt Orthopädie)

AUSBILDUNG

06/88 Abitur im Saarland
 09/91 Studienbeginn in Budapest
 09/92 Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
 09/97 Approbation als Tierarzt

BERUFLICHER WERDEGANG

10/88 – 04/89 Hilfskraft in der Pferdeklinik Telgte, Orientierung im Berufsbild
 11/97 – 03/98 Assistent in der Pferdeklinik Sottrum
 03/98 – 03/99 Einrichtung des Seminars- und Praktikums für Mediziner und
 Naturwissenschaftler "Versuchstiere, Tierversuche, Alternativ-
 methoden" in der Charité Campus Virchow- Klinikum, Tier-
 experimentelle Einrichtung unter Leitung PD Dr. Große-Siestrup
 Betreuung von Narkosen sowie des Herzchirurgischen Trainings
 an Schweinen (Prof. Hetzer et al. / Deutsches Herzzentrum
 Berlin) in den Tierexperimentellen Einrichtungen

03/98 – 07/00 Promotion und Erhalt eines Forschungs- Stipendiums der
 Charité

09/00 – 02/02 Assistent in der Kleintierklinik Prof. Kasa, Lörrach
 02/02 – 10/02 Überarbeitung der Promotion
 10/02 – bis heute Assistent in der Kleintierklinik Dr. Brandes, Northeim