

2 Literaturübersicht

2.1 Tierversuche, Versuchstiere und Alternativen

▪ Tierversuche und Alternativmethode

Im Zeitraum von 1991 bis 1997 konnte die Zahl der Versuche an Wirbeltieren in Deutschland von 2,4 auf 1,5 Millionen Tiere (um 38 %) verringert werden. Nach Einschätzung des Bundesministeriums für Landwirtschaft, Ernährung und Forsten ist dies ein Erfolg der strengen deutschen Tierschutz- Vorschriften und im vermehrten Einsatz von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch begründet (BMELF TIERSCHUTZBERICHT 1999). Zur Erforschung des pulmonalen Ischämie-Reperfusionsschadens (Kap. 2.2), der bei Lungentransplantationen auftritt, werden häufig Perfusionsmodelle (Kap.2.3) genutzt. Betrachtet man die Minderung der Versuchstierzahlen, so ist die Grundlagenforschung der Bereich mit weiterhin konstanter Zahl der für Versuche verwendeten Tiere. Speziell das Wachstumspotential für Lungentransplantationen und assoziierte Forschungen (Kap. 2.3) verdeutlicht den Bedarf an adäquaten Alternativen.

▪ Schweine als Versuchstiere

Die Lungentransplantationen betreffende Forschung bedient sich verschiedener Säugetiermodelle. Häufig handelt es sich um Tiere, wie Primaten (FUJIMURA et al., 1996), Hunde (MILLS et al., 1992) und Schweine (GRECO et al., 1999), deren Verwendung in Tierversuchen seitens der Öffentlichkeit besonders kritisch beurteilt wird.

Es ist sinnvoll, das Schwein als Organspender für derartige Untersuchungen zu wählen, da es in Körpermasse und dem Ablauf wichtiger Körperfunktionen gut mit dem Menschen vergleichbar ist (RENDAS et al., 1978; ENGELHARDT, 1966). Wegen der guten Übertragbarkeit von Ergebnissen aus der Erforschung von kardiovaskulären und pulmonalen Kreislauferkrankungen auf den Menschen werden Schweine in diesem Feld häufig eingesetzt (HANNON et al., 1991 und 1990). Die Ähnlichkeit mit dem Menschen ist so groß, dass die Verwendung von Schweineorganen für die Xenotransplantation gegenüber der von Primaten diskutiert wird (DORLING et al., 1997).

Es liegen eine große Anzahl an Untersuchungen vor, die für den Vergleich der Parameter Mensch- Schwein herangezogen werden können (HANNON et al., 1991

und 1990). Die Untersuchungen beziehen sich jedoch üblicherweise auf 25-30kg schwere Schweine. Dies ist in mehrfacher Hinsicht, je nach Fragestellung, problematisch.

So weisen 2 bis 3 Monate alte Schweine niedrige Gehalte an Hämoglobin auf (HANNON et al., 1990). Diese niedrigen Werte werden bei adulten Tieren nicht gefunden. In den Blutproben der von uns verwendeten Schlachtschweine (ca. 95kg) fanden wir Hämoglobingehalte von durchschnittlich 144 ± 30 g/l (weibliche und kastrierte Tiere), was dem bei Frauen gefundenen Wert von 140 g/l entspricht. Im Hinblick auf 2-3 Monate alte Schweine wird bei vielen Parametern eine Übereinstimmung zum Kind gefunden (HANNON et al., 1991). Vergleichende Untersuchungen von Mensch-Schwein-Parametern sind für 95 kg schwere Schweine nicht vorhanden.

▪ **Tierversuche und in vitro Lungenperfusionen**

Lungentransplantationen sind mit postoperativen Schmerzen und Medikamenteneinsatz verbunden. Bei der in vitro Perfusion kann es keine Schmerzen und Leiden geben. Für die bisher beschriebenen Organentnahmen für in vitro Lungenperfusionen wurden immer Versuchstiere verwendet (WRIGHT et al., 2000; SCHNEUWLY et al., 1999; GUSTIN et al., 1992). Das Gefäßsystem in vitro perfundierter Lungen wurde außerhalb des lebenden Organismus mit Flüssigkeiten (Salzlösungen oder Blut) durchströmt (WRIGHT et al., 2000). Teilweise wurden die Lungen beatmet. Bei der Verwendung der Schlachthoflunge wird kein Tier speziell für einen Versuch getötet.

2.2 Pulmonaler Ischämie- Reperfusions- Schaden

Bei Lungenembolien, bei kardiopulmonalem Bypass und bei Lungentransplantationen tritt mit beginnender Reperfusion nach Ischämie ein Ischämie-Reperfusions- Schaden auf (AMRANI und ROYSTON, 1999).

Ein Lungenödem entwickelt sich im Verlauf der Reperfusion, und es werden im wesentlichen erhöhte pulmonale Drücke, höhere Widerstände, niedrigere Flüsse, eine niedrigere Compliance, niedrigere pulmonal venöse Sauerstoffdrücke und Sättigungen gemessen (AMRANI und ROYSTON, 1999). Bei transplantierten Organen tragen neben hypoxischen und vasomotorischen Ursachen auch die Zerstörung der Lymphdrainage und die Denervation zur Ödementstehung bei (GRECO et al., 1999).

2.2.1 Ischämie und Gewebehypoxie

Eine mangelhafte Durchblutung bezeichnet man als Ischämie. Das Sauerstoffangebot des Blutes an die Gewebe wird vermindert. In der Folge entsteht eine Gewebehypoxie ($pO_2 < \text{normal}$) oder sogar eine Gewebeanoxie ($pO_2 = 0$), (GROS, 2004).

Bei niedrigen alveolären Sauerstoffpartialdrücken ($< 8 \text{ kPa}$) treten lokale vasokonstriktorische Reaktionen in den Lungengefäßen auf. Der Mechanismus, der diese hypoxische Vasokonstriktion auslöst, ist unbekannt (BUSSE, 2000). Durch diese hypoxiebedingte Widerstandserhöhung wird die Durchblutung schlecht ventilierter Lungenbezirke eingeschränkt und der Blutstrom in gut ventilierte Bezirke umgeleitet (Euler-Liljestrand-Mechanismus), (THEWS, 2000 a).

Bei Anoxie droht der Tod. Nach einem Intervall, währenddessen noch keine Funktionsveränderungen auftreten, folgt eine Phase der eingeschränkten Zellfunktionen. Hieran schließt sich die Phase des vollständigen Funktionsverlustes der Zellen bei noch aufrecht erhaltener Zellstruktur.

Dann treten irreversible Schäden auf, bis nach einem weiteren Intervall der Zelltod eintritt. Die Phase der irreversiblen Schädigung ist gekennzeichnet von zunehmender Schädigung der Zellstrukturen (GROS, 2004).

Die Zeitintervalle bis zum Einsetzen des Zelltodes ergeben sich daraus, dass die Zellen über mehrere Energiereservoirare verfügen. Es bestehen begrenzte Vorratsmengen energiereicher Phosphate wie ATP. Um die Zellfunktionen aufrecht zu erhalten, muss ständig ATP gebildet werden. O₂-Vorräte liegen zunächst noch als physikalisch gelöster O₂ vor, aber auch gebunden an das im Gewebegebiet befindliche Hämoglobin der Kapillaren, darüber hinaus in Muskelfasern an Myoglobin. Wenn die O₂-Reservoirare aufgebraucht sind, können zahlreiche Gewebe Energie durch anaerobe Glykolyse gewinnen. Als Endprodukt der anaeroben Glykolyse fällt Milchsäure an, die eine intrazelluläre Azidose verursacht (GROTE, 2000).

Zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion ist die Volumenregulation der Zellen wichtig. Dies geschieht zum größten Teil über die Einstellung der intrazellulären Osmolalität durch die Na⁺-K⁺-Pumpe (GÄBEL, 2000 a). Hierdurch wird Kalium intrazellulär konzentriert. Getrieben vom K⁺-Konzentrationsgradienten, diffundiert Kalium durch K⁺-Kanäle von intra- nach extrazellulär und erzeugt so ein Membranpotential. Dieses verhindert wiederum, dass Chlorid in die Zelle einströmt. Dieser potentialabhängige geringe Chloridinflux ist wesentliche Voraussetzung für die Einstellung des osmotischen Gleichgewichts zwischen intra- und extrazellulär.

Ein Energie- bzw. O₂-Mangel (Ischämie) führt infolge des ATP-Mangels zu einer verminderten Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase und damit auch zu einem Chlorideinstrom, wodurch sich die Osmolalität der Zelle erhöht. Wasser strömt in die Zelle und es kommt zu einer Zellschwellung (GÄBEL, 2000 a).

Irreversible Schäden und schließlich der Zelltod setzen ein, wenn der Umsatz von Stoffen und Energie für die Erhaltung der Zellstruktur nicht mehr gewährleistet ist. Der O₂-Verbrauch und damit der Energieverbrauch des Gewebes ist in starkem Maße von der Temperatur abhängig. Mit sinkender Körpertemperatur (bei nicht erhaltener Temperaturregulation) ist auch der Energieumsatz eingeschränkt. Diesen Umstand macht man sich bei Operationen, die zu einer kurzzeitigen ischämischen Organsituation führen, und bei der Aufbewahrung von Organen für Transplantationen zunutze (GROTE, 2000 a). Für Transplantationen werden Lungen bevorzugt bei 4° C in Styroporbehältern auf Eis gelagert, transportiert und aufbewahrt (THABUT et al., 2001).

2.2.2 Wiederbelebenszeiten der Lunge

Eine Wiedererlangung der vollen Zellfunktion nach Anoxie ist möglich, solange die Zellen noch nicht irreversibel geschädigt sind.

In der Humanmedizin werden heute Lungen erfolgreich transplantiert, wobei die Ischämiezeiten zwischen 4 und 12 Stunden betragen (HOPKINSON et al., 1998). Entsprechend klinischen Recherchen konnte anhand der Ischämiezeit (323 ± 93 min, N=106 Herz/Lungentransplantationen) eine unabhängige Vorhersage für die Überlebenszeit der Empfänger erfolgen (SNELL et al., 1996). Die Rate der Überlebenden nach einem Monat, wie auch das Auftreten eines Ödems waren an die Ischämiezeit assoziiert (THABUT et al., 2001). Ein mehr als 5 stündiger Konservierungszeitraum war nicht akzeptabel (SNELL et al., 1996). Ischämiezeiten mit im Mittel 168 bzw. 180 min und maximal 221 min schienen keine Prävalenz¹ bezüglich der Risikofaktoren zu haben (KHAN et al., 1999). Experimente an Ratten mit verschiedenen Konservierungen legten nahe, dass das Überschreiten eines Grenzwertes von 4 Stunden für die Aufbewahrungszeit mit einem ausgeprägteren Auftreten des Ischämie- Reperfusionsschadens verknüpft zu sein scheint (CHIEN et al., 2000). Nach 4 Stunden fiel ein starker Anstieg der Permeabilität infolge Epithelschäden auf (Konservierung von Rattenlungen mit University of Wisconsin - Lösung und Aufbewahrung bei 4 °C für wechselnde Zeitintervalle), (ROONEY et al., 2000).

Im Rattenmodell konnten an Pneumozyten Typ II nach 20 Stunden noch vitale Funktionen gemessen werden. Für LPD-konservierte Lungen (Kap. 2.3) wurden normale Level der Na⁺-K⁺-ATPase Aktivität gemessen, und die Aktivität konnte durch Terbutalingabe gesteigert werden (SUZUKI et al., 2000). Eine ähnliche Untersuchung im Maus- und Primaten- Lungentransplantationsmodell bestätigt die Na⁺-K⁺-ATPase Aktivität nach 24 stündiger Konservierung (FUJIMURA et al., 1996). In der Transplantationsmedizin werden die Spenderlungen am schlagenden Herzen konserviert, um die Ischämiezeit und damit den Ischämie- Reperfusionsschaden zu minimieren. Demgegenüber wird bei Transplantationsversuchen mit Lungen herztoter Spender eine funktionelle Verschlechterung und vermehrte Organschädigung beobachtet (GRECO et al., 1999). Jedoch scheint die

¹ Prävalenz: Häufigkeit des Merkmals im Verhältnis zur Anzahl der untersuchten Individuen.

Verwendung von Lungen von toten Spendern gerechtfertigt, da der Einfluss auf das Transplantationsresultat tolerierbar und der methodische Aufwand geringer ist (GRECO et al., 1999). Aufgrund des Organbedarfs ist die Verwendung von Organen von toten humanen Spendern wünschenswert. Ähnliche Funktionsverluste könnten an den perfundierten Schlachthoflungen (Entnahme vom toten Tier) gegenüber den perfundierten Lungen von narkotisierten Schweinen (Lebendentnahme und direkt anschließende Perfusion) zu beobachten sein.

2.2.3 Lungenkreislauf und Reperfusion

Eine deutliche Funktionseinschränkung (AMRANI und ROYSTON, 1999; GRECO et al., 1999; ALLISON et al., 1990) der Lungen nach Reperfusion stellen steigende Gefäßwiderstände und erhöhte pulmonal arterielle Drücke dar. Gleichzeitig sind ischämisch geschädigte Lungen durch eine erhöhte pulmonal kapilläre Permeabilität und ein Lungenödem gekennzeichnet (GLÜCKER et al., 1999). Mit Erhöhungen des PAP und des Widerstandes nahmen auch die Lungenmassen und die Schäden im Lungengewebe zu (HALLDORSSON et al., 2000).

Die wesentlichsten Widerstandsänderungen und damit die wesentlichste Regulation der Organdurchblutung in vivo erfolgt in den Arteriolen (präkapilläre Widerstandsgefäße und Sphinktergefäße). Änderungen des arteriellen Druckes im Kreislauf werden über das Produkt aus Blutfluss und Widerständen bestimmt. Die Gefäßwand der Arteriolen des Körperkreislaufs ist im Verhältnis zum Innenradius wesentlich dicker als in allen übrigen Gefäßabschnitten. Besonders ausgebildet ist die Schicht der zirkulären glatten Muskulatur, die für die Widerstandsänderungen verantwortlich ist.

Im Lungengefäßsystem sind die arteriellen und venösen Gefäßabschnitte wesentlich kürzer und dünnwandiger und die Durchmesser größer als in den entsprechenden Abschnitten des Körpergefäßsystems. Typische Arteriolen mit einer muskelreichen Media wie im Körpergefäßsystem sind hier nicht vorhanden. Insgesamt besitzen die Pulmonalgefäße nur einen geringen Anteil an glatter Muskulatur. Der Umfang einer Lungenkapillare entspricht in etwa dem einer halben Alveole. Insgesamt stellt das Kapillarbett der Lunge einen mit Endothel ausgekleideten spaltförmigen Raum (mit eingelagerten endothelialen Stützfeilern) dar. Da die Pulmonalkapillaren im

Gegensatz zu den Kapillaren des Körperkreislaufs nicht im nennenswerten Umfang von einem mechanisch stützendem Interstitium umgeben sind, besitzen sie eine sehr große elastische Weitbarkeit. Die Strömung in diesem Netzwerk lässt sich dabei besser als Schichtenströmung als eine Röhrenströmung nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz beschreiben und analysieren.

Hauptsächlich hieraus resultiert das ausgeprägte druckpassive Durchblutungsverhalten der Lungenstrombahn (BUSSE, 2000). Aus den o.g. mikrozirkulatorischen Besonderheiten resultiert ein Strömungswiderstand des Lungengefäßsystems, der etwa nur $\frac{1}{10}$ des Widerstands im Körperkreislauf beträgt. Entsprechend sind die Drücke im Lungenkreislauf wesentlich kleiner als im Körperkreislauf (im Bereich der Lungenkapillaren des Menschen liegen mittlere Drücke mit Druckschwankungen von 0,4 - 0,67 kPa vor), (BUSSE, 2000). Die Lungenperfusion von 5-6 l/min des Menschen wird durch eine mittlere Druckdifferenz zwischen Pulmonalarterie und dem linken Vorhof von nur 1 kPa aufrecht erhalten. Da der kolloidosmotische Druck des Plasmas wesentlich größer ist als der Blutdruck in den Lungenkapillaren, findet normalerweise in der Lunge keine Auswärtsfiltration, sondern nur eine Einwärtsfiltration in das Kapillarlumen statt (Kap. 2.2.4). Bei starker Erhöhung des pulmonal kapillären Druckes kann es jedoch zu einer Auswärtsfiltration kommen, bei der auch Flüssigkeit in die Alveolen übertritt (BUSSE, 2000).

HALLDORSSON et al. (2000) klemmten im in situ Modell den linken Bronchus und die Pulmonalarterie ab. Sie beobachteten eine Reduktion der Schäden nach Ischämie bei „druckkontrollierter“ Reperfusion gegenüber der „unkontrollierten“ Reperfusion. Bei der druckkontrollierten Reperfusion wurde lediglich ein (mittlerer pulmonal arterieller Druck) PAP von 2,66-3,99 kPa an den Schweinelungen zugelassen, wohingegen der uneingeschränkt wiedereinsetzende Blutfluss zu höheren Perfusionsdrücken (5,32-6,65 kPa) und ausgeprägteren Schäden führte.

In der Schweinelunge scheinen sich die hydrostatische Verhältnisse etwas von denen des Menschen zu unterscheiden. Der Druck in der Arteria pulmonalis schwankt beim Schwein zwischen systolisch $6,8 \pm 0,8$ kPa (51 ± 7 mmHg) bei 25-35 kg schweren Tieren und diastolisch $4,7 \pm 1,2$ kPa (35 ± 9 mmHg), (WACHTEL et al., 1963).

Werden Blutdruckmessungen im rechten Ventrikel vorgenommen, so stimmen sie in der Systole mit den pulmonal arteriell gemessenen Drücken überein. In der Diastole beträgt der im rechten Ventrikel gemessene Druck jedoch ca. 0 mmHg.

2.2.4 Flüssigkeitsaustausch durch die Kapillarwand

Der Austausch von Flüssigkeit zwischen Blut und Interstitium ist im wesentlichen abhängig von den vorherrschenden hydrostatischen (ΔP) und den kolloidosmotischen ($\Delta \pi$) Druckdifferenzen. Hierdurch kommt es beim Durchströmen der Kapillaren zu Filtration und Reabsorption von Wasser.

Der netto Flüssigkeitstransport durch die Kapillarwand wird bestimmt durch den effektiven Filtrationsdruck (P_{eff}) zwischen dem Blut und dem interstitiellen Raum:

$$P_{\text{eff}} = \Delta P - \Delta \pi = (\Delta P_c - \Delta P_i) - (\Delta \pi_c - \Delta \pi_i)$$

Der vom Blutdruck verursachte hydrostatische Druck in den Kapillaren des Kreislaufs (ΔP_c) ist normalerweise sehr viel größer als der hydrostatische Druck im Interstitium (ΔP_i). Die für wasserlösliche Stoffe verfügbaren Durchtrittsporen der Kapillarwand sind im Verhältnis zum Molekülradius des Wassers groß, so dass bei bestehender Druckdifferenz ($\Delta P_c - \Delta P_i$) eine Wasserströmung durch das Endothel möglich ist (Auswärtsfiltration). Die Blutflüssigkeit würde aufgrund der hydrostatischen Druckdifferenz (ΔP) größtenteils in das extravasale Gewebe versickern, stünde dem nicht die Druckdifferenz der kolloidosmotischen Drücke ($\Delta \pi$) entgegen. Der kolloidosmotische Druck des Blutplasmas ($\Delta \pi_c$) wird im wesentlichen durch die hohen Plasmaproteinkonzentration hervorgerufen (70-75g/l). Mit demgegenüber niedrigem Eiweißgehalt der interstitiellen Flüssigkeit ist auch der kolloidosmotische Druck der interstitiellen Flüssigkeit ($\Delta \pi_i$) niedrig. Die Proteine können nicht oder nur in sehr geringem Umfang durch das Gefäßendothel hindurchtreten. Diese kolloidosmotische Druckdifferenz macht eine ins Lumen der Gefäße gerichtete Wasserbewegung (Einwärtsfiltration) möglich (ENGELHARDT, 2000).

Der kolloidosmotische Druck verändert sich im Verlauf der Kapillare nicht nennenswert ($\Delta \pi_c \sim 3,2 \text{ kPa}$). Da der hydrostatische Druck vom Beginn der Kapillare bis zu ihrem Ende hin von 4 auf 2,53 kPa abnimmt, verändert sich auch der effektive Filtrationsdruck (P_{eff}) entlang der Kapillare. Am Anfang der Kapillare ist der nach außen gerichtete effektive Filtrationsdruck größer (ca. 0,8kPa). Der effektive Filtrationsdruck ist am Ende der Kapillare durch den niedrigeren hydrostatischen

Druck nach innen gerichtet (ca. $-0,67$ kPa). Damit kann Wasser aus dem Interstitium wieder in die Kapillare diffundieren (Reabsorption). Die effektiven Filtrationsdrücke am Anfang und Ende der Kapillaren bewirken eine insgesamt stärkere Nettofiltration in die Gewebe hinein. Diese Flüssigkeit wird als Lymphe über die Lymphgefäße abtransportiert (ENGELHARDT, 2000).

Im Lungenkreislauf ist der hydrostatische Druck in den Kapillaren niedriger, sodass der kolloidosmotische Druck und damit die Reabsorption überwiegt (Kap. 2.2.3).

2.2.5 Ursachen der Ödementstehung

Unter einem Ödem versteht man Schwellungen infolge Ansammlungen wässriger Flüssigkeiten im Interstitium. Pulmonale Ödeme resultieren im wesentlichen aus kapillär erhöhten hydrostatischen Drücken, erhöhter Kapillarpermeabilität und deren Kombination (GLÜCKER et al., 1999).

Bei einer Dilatation der präkapillären Widerstandsgefäße bzw. Konstriktion der postkapillären Venolen oder einer Erhöhung des venösen Drucks ist der Druck in den Kapillaren erhöht. Als Folge davon kommt es zu einer verstärkten Auswärtsfiltration, so dass das Lymphsystem nicht mehr in der Lage ist, die vermehrt anfallende Flüssigkeit abzutransportieren (ENGELHARDT, 2000).

Bei erhöhter Permeabilität der Kapillarwand (z.B. lokale Entzündungen) können lokal oder auch generalisiert Plasmaproteine aus den Kapillaren austreten und in das Interstitium gelangen. Dadurch sind die kolloidosmotischen Druckdifferenzen vermindert, die Filtration ist erhöht und die Reabsorption ist vermindert (ENGELHARDT, 2000). Bei in vitro Perfusionen könnten Perfusionslösungen verwendet werden, die proteinärmer sind als das Blut. Damit wäre der kolloidosmotische Druck im „Plasma“ vermindert und die Filtration in das Interstitium würde überwiegen.

Bei Störungen des Lymphabflusses steigen die hydrostatischen Drücke im Gewebe an. Dadurch sind die für die Filtration verantwortlichen Kräfte zwar vermindert, die für die Reabsorption notwendigen Drücke reichen jedoch nicht aus, um die im Interstitium angesammelte Flüssigkeit in die Kapillaren zu transportieren.

2.2.6 Zelluläre Mechanismen des Ischämie- Reperfusion- Schadens

Durch die Ischämie herrschen in der Lunge hypoxisch-anoxische Bedingungen. Dies bewirkt einen ATP-Mangel und damit letztlich eine Laktatazidose und einen Abfall des innerzellulären pH (Kap. 2.2.1). Die ATP-Verarmung vermindert die Aktivität der Na^+ - K^+ -Pumpe und bewirkt dadurch einen gestörten Ionentransport (FISHER et al., 1994 und Kap. 2.2.1). Zunehmend kommt es zu einem Ausgleich zwischen den extra- und intrazellulären Ionenkonzentrationen und damit auch zu einer zunehmenden Depolarisation der Zellmembranen (FISHER et al., 1994 und Kap. 2.2.1, 2.2.5). Ausgehend von diesen zellulären Prozessen entsteht der Ischämie-Reperfusion- Schaden im Lungenparenchym (AMRANI und ROYSTON, 1999; FISHER et al., 1994). Im Verlauf der Reperfusion (FISCHER et al., 2000) kommt es zu Blutungen aus den alveolären Kapillaren in das Interstitium und die Alveolen sowie zu Zerstörungen von Alveolarepithelzellen (NOVICK et al., 1992).

Freie Radikale besitzen ungepaarte Elektronen, die chemisch sehr reaktionsfreudig sind. Sie werden von den Mitochondrien produziert und ermöglichen die kontrollierte Energieabgabe zur Produktion von ATP. Neben der ATP-Produktion entstehen Oxigenradikale im Zytoplasma während der Prostaglandinsynthese, im Endothel und durch aktivierte Neutrophile im Interzellularraum (AMRANI und ROYSTON, 1999). Normalerweise ist die Aktivität dieser radikalproduzierenden Enzyme gut kontrolliert. Die ATP- Depression lässt die Katabolite Xanthin und Hypoxanthin entstehen, die einerseits zur Erzeugung freier Radikale führen, andererseits bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck durch eine kalziumabhängige Protease radikalabbauende Xanthindehydrogenase in den Radikalbildner Xanthinoxigenase transformieren (AMRANI und ROYSTON, 1999).

Radikale greifen Proteine an. Sie schädigen die Zellen bis hin zum Zelltod. Histologisch fallen fehlende Prominenz der Pneumozyten- Typ I- Kerne, dann Zellschwellungen, Zerreißen der Alveolarsepten, Blutungen in das Alveolarlumen, Desquamation von Epithelzellen und Membrandeformation wie zunehmende Wandstärke der Alveolarsepten, gefolgt von kontinuierlich steigender Gewichts- und Ödementwicklung auf (FISCHER et al., 2000; AMRANI und ROYSTON, 1999; FISHER et al., 1994).

In Abwesenheit von ATP (2.4.3) wird intrazellulär die kalziumabhängige Phospholipase A₂ aktiviert, die Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Zellwand spaltet (AMRANI und ROYSTON, 1999). Durch zunehmende Produktion von freien Oxigenradikalen und von Arachidonsäuren wird die Zellmembranpermeabilität zunehmend gestört.

Mit Arachidonsäure- Gaben oder Freisetzung aus der Zelle in das Gefäßsystem wird ein Anstieg des Gefäßwiderstandes, eine Zunahme der Gefäßpermeabilität und die Ausbildung eines Ödems ausgelöst (AMRANI und ROYSTON, 1999).

Eines der Hauptsymptome des Ischämie- Reperfusion- Schadens ist die vasomotorische Dysfunktion (Kap. 2.2 und ALLISON et al., 1990). Das Endothel beeinflusst über die Produktion vasoaktiver Substanzen die Weitstellung der Gefäße und ist maßgeblich an der Steuerung und Aufrechterhaltung der Durchblutung beteiligt (AMRANI und ROYSTON, 1999). Die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur wird über cyclo- Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclo- Guaninmonophosphat (cGMP) vermittelt (AMRANI und ROYSTON, 1999). Die Erzeugung der basalen cGMP- Konzentration ist an den kontinuierlichen Stickoxid (NO)-Ausstoß der Endothelzellen gebunden.

Als Inaktivatoren des NO gelten freie Radikale, eine Komplementaktivierung und freies Hämoglobin, das durch die Hämolyse auch in unserem Modell entsteht (AMRANI und ROYSTON, 1999). Durch den niedrigen Blutfluss und durch verminderte Hemmwirkung des NO auf Blutplättchen- und Neutrophilenaggregation ist deren Anheftung an das Endothel erleichtert. Kalzium steuert zusätzlich die Anheftung von Leukozyten durch die Abgabe der Vasokonstriktoren Thromboxan A₂ und Serotonin in das Plasma. Die hohen Kalziumkonzentrationen nach der Laktatazidose (FISHER et al., 1994) bewirken in den glatten Muskelzellen die Abnahme von cAMP (AMRANI und ROYSTON, 1999). Durch Mangel von cAMP und cGMP ist die vasodilatierende Wirkung vermindert. Es folgen Störungen der Hämodynamik sowie eine zunehmende Ödembildung (AMRANI und ROYSTON, 1999 und Kap 2.2.5).

Die Zellen des geschädigten Parenchyms und Endothels setzen Mediatoren frei, die das Komplement- und das Gerinnungssystem aktivieren, die ihrerseits über Mediatoren die Entzündungszellreaktion initiieren (AMRANI und ROYSTON, 1999).

Thrombozyten, Makrophagen und Leukozyten werden mobilisiert, lagern sich in den Gefäßen an und produzieren freie Radikale.

2.3 In vitro Lungenperfusion

Für die in vitro Perfusion wurden Schweinelungen entnommen und in einem Perfusionsaufbau mit Eigenblut perfundiert (SCHNEUWLY et al.; 1999). Dabei wurde nach einer ischämischen Phase (Lungenentnahme und Aufbewahrung) reperfundiert. Als Folge der in vitro Perfusionen wurde bei den Lungen ein Ischämie-Reperfusions-Schaden beobachtet (FEHRENBACH et al., 2001 und 1999; SCHNEUWLY et al.; 1999). Bei der in vitro Lungenperfusion wurde, verglichen mit Transplantationsmodellen am lebenden Tier, eine Zunahme des pulmonalen Gesamtgefäßwiderstandes und eine stärkere Ödementwicklung beobachtet (NOVICK et al., 1992). Der rapide Anstieg des pulmonalen Widerstandes und die Ödementstehung kennzeichnen die Problematik bei Lungentransplantationen und sind daher Gegenstand der aktuellen Forschung (MÜLLER et al., 2002 und 1999; KEMMING et al., 1998). Wie in dieser Arbeit wurden schon in vitro Perfusionen von Schweinelungen beschrieben, die als Perfusionsmedium autologes Blut verwendeten (WRIGHT et al., 2000; SCHNEUWLY et al., 1999).

Ein weiteres Feld für den Einsatz von in vitro Perfusionsmodellen stellen Untersuchungen zu Abstoßungsreaktionen im Rahmen der Xenotransplantation dar (SCHELZIG et al., 2001).

Zur Erforschung des Ischämie-Reperfusions-Schadens werden in vivo und in vitro Modelle verwendet (WRIGHT et al., 2000). In vivo Modelle beinhalten meist eine Allotransplantation nach Konservierung und werden meist an größeren Tieren durchgeführt (WRIGHT et al., 2000; FUJIMURA et al., 1996). „Weltweit weisen Lungentransplantationen mit exponentieller Entwicklungstendenz“ (HOSENPUD et al., 1997) „das größte Wachstum“ (RAMSEY et al., 1995) bei Organtransplantationen auf. Daraus folgt ein wachsender Forschungsbedarf, was sich auch in der Entwicklung ähnlicher in vitro Perfusionsmodelle von Schweinelungen (SCHNEUWLY et al., 1999; BRANDES et al., 2001; WRIGHT et al., 2000) zeitgleich zu unseren Untersuchungen zeigte.

Als ein Nachteil der in vitro Modelle wird der meist nicht pulsatile Fluss, der Kontakt des Blutes mit Fremdmaterial und die Anfälligkeit für venöse Obstruktionen

angesehen (WRIGHT et al., 2000). Die einfachsten dieser Modelle verwendeten ein kolloidales Perfusat, z.B. Hetastarch (WRIGHT et al., 2000), und maßen den pulmonalen Gefäßwiderstand und die Drücke in den Atemwegen. In neueren Modellen wurden die Lungen mit Blut perfundiert und pulmonal venös konnte der Blutsauerstoff über einen Membrandoxygenator eliminiert werden (WRIGHT et al., 2000). Diese Vorgehensweise erlaubt Messungen der Blutparameter, wie z.B. des Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruckes (DITTRICH et al., 2000). Zur Beschreibung der vaskulären Permeabilität wurden die Massenzunahmen der perfundierten Lungen herangezogen (SCHNEUWLY et al., 1999).

Bei in vitro Lungenperfusionen wurde der Blutfluss meistens über die Schwerkraft aufrechterhalten. Die Flüsse waren dabei deutlich niedriger als bei lebenden Tieren (DITTRICH et al., 2000; SCHNEUWLY et al., 1999).

▪ **Konservierung**

Für die Aufbewahrung und den Transport von Lungen wurden meistens Konservierungslösungen verwendet (THABUT et al., 2001; MÜLLER et al., 2002 und 1999). Durch eine Konservierung sollen die Lungen außerhalb des Körpers am Leben erhalten werden. Die mit der Ischämie verbundenen Schädigungen sollen bei einer Aufbewahrung minimal gehalten werden. Bei den Konservierungslösungen werden bezüglich ihrer Zusammensetzung der Ionengehalte hauptsächlich 2 Typen diskutiert:

- **Intrazellulärlösungen**

Bei Intrazellulärlösungen entsprechen die Konzentrationen der wesentlichen Ionen denen der intrazellulären Flüssigkeit. Mit der Euro Collins- Lösung (EC) wurde ein Vertreter der Intrazellulärlösungen für Nierentransplantationen entwickelt (COLLINS et al., 1969). Collins et al. (1969) hofften den transmembranären Ionentransport und damit den Energieverbrauch der Zellen zu minimieren, damit ihr Strukturhalt möglichst lange aufrecht erhalten werden kann (Kap. 2.2.1). K^+ würde nicht mehr durch die Kaliumkanäle nach extrazellulär diffundieren, wenn die K^+ Konzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle gleich sind. Andererseits würde dadurch das Membranpotential auf nahezu 0 mV steigen:

$$E_K = -61 * \log ([K^+_{\text{intrazellulär}}]/[K^+_{\text{extrazellulär}}]) \text{ mV} = -61 * \log (1) \text{ mV} = 0 \text{ mV}$$

Lösungen wie Euro Collins und University of Wisconsin (UW) wurden auch bei der Konservierung von Lungen verwendet und sind überwiegend im Gebrauch, obwohl jüngere Studien bei vielen Fragestellungen ein besseres Abschneiden von Extrazellulärlösungen belegen (SCHNEUWLY et al., 1999).

Gegen die Konservierung mit kaliumreichen Lösungen spricht auch, dass hohe Kaliumkonzentrationen eine starke pulmonale Vasokonstriktion verursachen (MIYOSHI et al., 1992 und PUSKAS et al., 1992) und eine Relaxation der Gefäße verschlechtern (CHAN et al., 1993).

- Extrazellulärlösungen

Extrazelluläre Lösungen sind an der Zusammensetzung der in extrazellulären Flüssigkeit vorliegenden Ionenkonzentrationen orientiert.

Für Pneumozyten Typ II konnte bei der Verwendung von LPD (low potassium dextran)-Lösung eine höhere metabolische Aktivität und eine geringere Zytotoxizität gegenüber der EC-Lösung belegt werden (SUZUKI et al., 2000). Es ist Ziel der Konservierung, die Vitalität der Organe zu erhalten. Auf ein Erlöschen der Funktion der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ folgt letztendlich der Zelltod. Die Pneumozyten vom Typ II behielten nach Konservierung mit Extrazellulärlösungen (LPD) die basale Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ bei, und ihre Aktivität konnte durch β -adrenerge Agonisten gesteigert werden. Bei Konservierung mit Intrazellulärlösung (EC) wurden jedoch keine derartigen Aktivitäten beobachtet (SUZUKI et al., 2000). SUZUKI et al., (2000) schlussfolgerten daraus, dass LPD-Konservierung die Lungen vitaler erhält. Dies konnte bei den kaliumreich konservierten Lungen bisher nicht gesichert werden.

Bei der Konservierung von Lungen für Transplantationen schienen LPD -Lösungen gegenüber EC-Lösungen in der Humanmedizin im ersten Jahr die Überlebensrate der Empfänger zu steigern (MÜLLER et al., 2002 und 1999). Mittlerweile belegen Untersuchungen an 170 Patienten bessere klinische Ergebnisse nach Verwendung dieser Extrazellulärlösung verglichen mit der EC-Intrazellulärlösungen (THABUT et al., 2001). Es wurde eine geringere Ödematisierung nach Reimplantation beobachtet, und die hohe Mortalität im ersten Monat nach Transplantation trat nicht auf.

In Tiermodellen sind Extrazellulärlösungen, wie die LPD-Lösung, erfolgreich zur Konservierung von Lungen eingesetzt worden. Im Vergleich zur Intrazellulärlösung wurden bessere Lungenfunktion (geringere pulmonal arterielle Drücke, geringere Gesamtwiderstände, höhere pulmonal venöse Sauerstoffpartialdrücke) sowie eine geringere Massenzunahme der Lungen nachgewiesen (SCHNEUWLY et al., 1999; SUNDARESAN et al., 1995).

LPD enthält niedrige Kaliumkonzentrationen (6 mmol/l), ein Phosphat Puffer System und Dextran. Im in vitro perfundierten Modell der Schweinelunge bewirkte die Verwendung der etablierten LPD-Lösung Perfadex[®] eine höhere Oxygenierungskapazität, eine verminderte Generierung freier Radikale und eine geringere "wet to dry ratio"¹ (BRANDES et al., 2001).

Im Minipig- Lungentransplantationsmodell überlebten im Untersuchungszeitraum alle Empfänger nach LPD-Konservierung im Gegensatz zur Verwendung von EC-Lösung (STRUBER et al., 2000). Die Untersucher fanden in der LPD-Gruppe eine höhere dynamische Compliance, einen höheren Sauerstoffpartialdruck pro eingeatmeter Sauerstoffkonzentration (FiO₂) und einen geringeren Anteil von Wasser am Lungengewebe nach Reperfusion. Nach bronchoalveolärer Lavage wurde eine niedrigere Proteinkonzentration und eine geringere Veränderung der Zusammensetzung des Surfactants bei den LPD- gegenüber den EC-konservierten Lungen gemessen. STRUBER et al. (2000) vermuteten, dass EC- Konservierung die Funktion des Surfactant einschränkt, wohingegen die extrazelluläre Konservierungslösung vor Funktions- und Bildungsverlusten des Surfactant zu schützen scheint. Bei der Lungenperfusion im in vitro Schweinmodell waren der Atemwiderstand und die dynamische Compliance der LPD-konservierten Lungen konstant, bei den EC-konservierten Lungen fiel dagegen die dynamische Compliance unter den Wert der LPD-Gruppe (SCHNEUWLY et al., 1999). Bei Konservierung mit EC-Intrazellulärlösung wurden schwere alveoläre Ödeme, Rupturen und Blutungen der Alveolarsepten beobachtet. Demgegenüber waren bei der histologischen Untersuchung die LPD-Lungen in einem vergleichsweise guten Zustand erhalten (FEHRENBACH et al., 2001).

¹ Die "wet to dry ratio" soll Rückschlüsse auf den Grad der Ödematisierung ermöglichen.

Es war zu beobachten, dass verschiedene Autoren jeweils spezielle Konservierungslösungen oder deren Modifikationen bevorzugten. Auch die Untersuchungen von MIYOSHI et al. (1992) und PUSKAS et al. (1992) sprechen für die Verwendung niedriger Kaliumkonzentrationen. In der neueren Literatur wird immer häufiger die Verwendung von LPD-Lösung befürwortet. In welchem Umfang die jeweiligen Konservierungslösungen für die beobachteten günstigeren Effekte verantwortlich waren, wurde nach derzeitigem Kenntnisstand nicht gegenüber einer mit isotoner Kochsalzlösung konservierten Kontrollgruppe geprüft.

2.4 Schweine aus der landwirtschaftlichen Produktion

▪ Genetische Standardisierung, Alter, Ernährung und Haltung

Die moderne Schweineproduktion macht sich die wirtschaftlichen Vorteile der Standardisierung zunutze. Spezialisierte Firmen züchten Hybridlinien, die in der Schweinehaltung verwendet werden. Die Tiere stellen genetisch eine weitgehend homogene Zucht dar. Merkmale wie Mastzunahme, Futteraufwand, Schlachtkörperbewertung, Stresstabilität, Fleischbeschaffenheit und Zuchtleistung können unter Angabe geringer Standardabweichungen getestet werden. Die Schlachttiermassen unterscheiden sich bei den Hybridherkünften nur um wenige Gramm unterhalb von 94 kg. Das Alter der Tiere unterscheidet sich verfahrensbedingt nur wenig. Hybride der „deutschen Pig“ erreichen nach $102 \pm 8,5$ Tagen Mast und die der LRS „Landesverband Rheinischer Schweinezüchter“ nach 111 ± 13 Tagen Mast das Endgewicht (ROTH et al., 1997). Daher ist es möglich, Organe für die Perfusion von Schlachthoflungen zu erhalten, die bezüglich Ernährung, Gewicht, Abstammung und Alter wenig variieren.

▪ Pulmonale Infektionen

„Atemwegserkrankungen verursachen weltweit die größten wirtschaftlichen Verluste in der Schweineproduktion“ (KIRCHHOFF und RUNGE, 1998; HORST et al., 1997). Die Beschaffung gleichbleibend gesunder Lungen kann damit fraglich sein. In einer bakteriologischen Untersuchung von ALTROCK (1998) an 6560 Schweinen wiesen deutsche Mastschweine zu 43,3% und jüngere Schweine zu 27,8% pneumonisch veränderte Lungen auf. Hierbei handelte es sich in 54,2% der Fälle um multiple Infektionen. Als häufigster Keim wurde mit 49,3% *Pasteurella multocida* isoliert (ALTROCK, 1998). Bei 20212 deutschen Schweinen wurden 42,5% *Mykoplasma*

hyopneumoniae seropositive Blutproben gefunden. Mykoplasma hyopneumoniae war der am häufigsten nachgewiesene Keim bei der enzootischen Pneumonie der Schweine und konnte in 81,2% der Mastbestände nachgewiesen werden (HORST et al., 1997). Im Winter kommt es zu einer Häufung von Pneumonien (COWART et al., 1991). Andererseits gibt es Bestände, die hohe hygienische und mikrobiologische Standards erfüllen (JENSEN und BLAHA, 1997).

Zur graduellen Einteilung von Lungen nach dem Ausmaß ihrer pathologischen Läsionen gibt es verschiedene Messmethoden. Die subjektive Beurteilung mittels eines adspektorischen Scores (STRAW et al., 1986) korrelierte eng ($R^2 = 0,99$) mit serologischen und volumetrischen Verfahren bei enzootischer Pneumonie (DAVIES et al., 1995). Von 15515 Schweinen waren nur 35% der Schlachtlungen ohne makroskopisch ersichtliche pathologische Merkmale. Bei 47% fanden sich Veränderungen, die weniger als 10% des Lungengewebes umfassten (DAVIES et al., 1995). Die Bedeutung von übersehenen oder ignorierten geringgradigen Lungenveränderungen können möglicherweise die Verwendung von Schlachtschweinen als Spender für Lungenperfusionen als Alternativmethode in Frage stellen. Deshalb scheint ein auf Lebend- und Organbeschau beruhendes Auswahlverfahren außerordentlich wichtig.

Gegenüber der landwirtschaftlichen Tierhaltung kann für Versuchstierhaltungen von einer geringeren Prävalenz für Infektionen ausgegangen werden. Trotz aller Standards kam es auch in Versuchstieranlagen zu seuchenartig auftretenden Krankheitsausbrüchen und persistierenden Infektionen (NICKLAS et al., 1999). Über diese Tiere liegen im voraus maximal Erhebungen zum Gruppenstatus vor. Bei einer Beurteilung entnommener Lungen kann demgegenüber der Gesundheitsstatus jeder einzelnen Lunge beurteilt werden.

▪ **Schweine mit Herz- Kreislauf- Insuffizienz**

„Eine der gravierendsten Störungen des Atmungsapparates ist das bei Tieren recht häufige Lungenödem, ... das meist als Sekundärphänomen in der Folge einer Herz- oder Kreislaufinsuffizienz ... entsteht.“ (BICKHARDT, 1992). Die Herzinsuffizienz ist die häufigste Störung des Herz- Kreislaufsystems des Schweins (ZIMMER et al., 1997). Die Zuchtauswahl auf hohen Fleischanteil führte besonders in Deutschland vermehrt zu kreislaufinsuffizienten Tieren. Sie weisen den Symptomenkomplex der Belastungsmiopathie auf (WARRISS et al., 1998; MARTENS, 1997).

Die Pathogenese des Lungenödems bei Linksherzinsuffizienz beruht auf einer Auswärtsfiltration des Wassers aus dem Gefäß ins das Lungeninterstitium. Erhöhte Kapillarpermeabilität und Lecks („leakage“) in den Kapillaren bedingen ebenfalls einen Übertritt von Wasser. Durch diese Flüssigkeitseinlagerungen werden die elastischen Widerstände vergrößert und die Gasediffusion erschwert.

Bei der Belastungsmiopathie reagieren genetisch veranlagte Schweine auf Stress-Situationen (porcines Stress Syndrom) mit einer Entkoppelung der anaeroben Glykolyse und einer Laktatproduktion in den weißen Muskelfasern, die zu einer Azidose führt (WARRISS et al., 1998; MARTENS, 1997). Bei Stressempfindlichkeit und Schockgeschehen mündet die Belastungsmiopathie häufig in eine Herzinsuffizienz.