

7 Zusammenfassung

Es sollte geprüft werden, ob die in vitro Perfusion von Schlachthoflungen eine Alternative zum Tierversuch bieten kann. Voraussetzung war eine befriedigende Standardisierung des Versuchsaufbaus. Die während der Perfusionen gemessenen Parameter wurden mit denen von narkotisierten Schweinen verglichen. Diese Studie sollte klären, ob durch Lebendbeschau und durch Organbeschau am Schlachthof eine gleichbleibende Qualität der entnommenen Lunge gewährleistet werden kann. Darüber hinaus sollte geprüft werden, welche Konservierungslösungen für die Aufbewahrung der Schlachthoflungen geeignet sind.

Eine Methode zur in vitro Perfusion von Schweinelungen wurde etabliert und aufgrund der gemessenen Parameter evaluiert. Die Perfusionen dauerten insgesamt 135 Minuten. 60 bis 90 Minuten nach Perfusionsbeginn wurde ein befriedigendes "Steady State" der Messparameter erreicht. Innerhalb der Gruppen wurden für die bei 60, 75 und 90 Minuten gemessenen jeweiligen Perfusionsparameter nahezu immer keine signifikanten Änderungen gefunden (Gruppen 2 bis 7). Einzelne Parameter, die abweichend kein "Steady State" erreichten, konnten als Charakteristikum dieser Gruppe belegt werden. Die in dieser "Steady State"-Periode gemessenen Werte wurden für die einzelnen Versuchsgruppen mit statistischen Prüfverfahren verglichen und graphisch oder in Tabellen dargestellt. Die Versuchstiere bzw. die perfundierten Lungen wurden in 7 Gruppen eingeteilt:

Gruppe 1- Messungen an Lungen narkotisierter Schweine; **Gruppe 2-** Lungen von den narkotisierten Schweinen, die direkt nach Entnahme perfundiert wurden; **Gruppe 3-** v. Baeyer II konservierte Lungen mit makroskopisch unauffälligem Lungenbefund; **Gruppe 4-** v. Baeyer II konservierte Lungen mit makroskopisch verdächtigem Lungenbefund; **Gruppe 5-** LPD (low potassium dextran) konservierte Lungen mit unauffälligem Befund in der Lebend Beschau; **Gruppe 6-** LPD konservierte Lungen mit verdächtigem Befund in der Lebendbeschau; **Gruppe 7-** mit isotoner Kochsalzlösung konservierte Lungen mit unauffälligem Befund.

Bei den Perfusionen wurden die Perfusionsdrücke (PAP pulmonal arterial pressure) etwa gleich hoch eingestellt, wie sie bei den narkotisierten Tieren gemessen worden waren (**Gruppe 1-** $3,43 \pm 1,15$; **Gruppe 2-** $3,00 \pm 0,63$; **Gruppe 3-** $3,19 \pm 0,58$; **Gruppe 4-**

3,41±0,84; **Gruppe 5-** 3,10±0,50; **Gruppe 6-** 2,86±0,71 und **Gruppe 7-** 2,75±0,97 [kPa]). Die im "Steady State" erreichten Lungenperfusionen waren allerdings erheblich niedriger als die bei den narkotisierten Schweinen gemessenen Lungendurchblutungen (**Gruppe 1** 21,01±15,62; **Gruppe 2** 1,19±0,92; **Gruppe 3** 0,65±0,40; **Gruppe 4** 0,34±0,21; **Gruppe 5** 0,78±0,20; **Gruppe 6** 0,39±0,19 und **Gruppe 7** 0,55±0,19 [ml/min/g]).

Gegenüber den Messungen an den lebenden Tieren (**Gruppe 1**) wurden während der Lungenperfusionen Massenzunahmen der Lungen durch sich zunehmend entwickelnde Ödeme beobachtet. Im "Steady State" (**Gruppen 2, 3, 5 und 7**) war während der Lungenperfusion die Durchblutung der Lungen wesentlich geringer, der Gesamtwiderstand deutlich erhöht, die Sauerstoffaufnahme schlechter, der Spitzendruck erhöht und die dynamische Compliance niedrigerer als die bei den narkotisierten Schweinen gemessenen Parameter (**Gruppe 1**).

Histologisch wurden in **Gruppe 5** nach Reperfusion Neutrophilenaggregation, Schwellung der Alveolarsepten und des Bindegewebes, Hämostasen sowie Desquamationen von Zellen und Einblutungen ins Alveolarlumen beobachtet.

Die pulmonal arteriellen bzw. pulmonal venösen Sauerstoffsättigungen, Kohlendioxidpartialdrücke und pH-Werte waren für **Gruppe 1 und 2** nicht signifikant verschieden. Das trifft auch für den pulmonal venösen Sauerstoffpartialdruck zu. Der pulmonal arterielle Sauerstoffpartialdruck ließ sich in vitro mit dem verwendeten Platten(de)oxygenators nicht ganz auf die bei den narkotisierten Schweinen gemessenen Werte absenken (**Gruppe 1** 5,33±0,51 und **Gruppe 2** 6,27±0,76 [kPa], mit $p < 0,05$).

Aus den im wesentlichen übereinstimmenden Parametern zwischen den Gruppen **2** und **5** schließen wir, dass die Perfusion der am Schlachthof entnommenen Lungen mit der Perfusion der unter Laborbedingungen vom Versuchstier entnommenen Lungen vergleichbar ist.

Das histologische Bild (**Gruppe 5**) sowie die genannten Unterschiede zwischen **Gruppe 1** und **2** belegen einen Ischämie- Reperfusions- Schaden nach Lungenperfusion in unserem Modell.

Aufgrund der aufgestellten Auswahlkriterien waren die Schlachthoflungen als makroskopisch pathologisch oder als verdachtsweise von kreislaufkranken Tieren

stammend (**Gruppen 4** und **6**) beurteilt worden. Die Messparameter wurden mit denen von unverdächtigen Lungen (**Gruppen 3** und **5**) verglichen. Wichtige bei den verdächtigen Lungen gemessene Funktionsparameter unterschieden sich von denen an gesunden Lungen gemessenen Werten (z.B. Perfusionsrate **Gruppe 6** $0,39 \pm 0,19$ und **Gruppe 5** $0,78 \pm 0,20$ [ml/min/g]; Gesamtwiderstand **Gruppe 6** $9,25 \pm 6,53$ und **Gruppe 5** $3,25 \pm 1,02$ [kPa*min*g/ml]; pulmonal venöser Widerstand **Gruppe 6** $5,88 \pm 3,74$ und **Gruppe 5** $1,95 \pm 0,61$ [kPa*min*g/ml]); Sauerstoffaufnahme **Gruppe 6** $7,00 \pm 3,48$ und **Gruppe 5** $19,66 \pm 7,89$ [ml O₂*ml_{Blut}/min/g]). Die bei den verdächtigen Lungen in **Gruppe 4** während der Perfusion stetig weiter steigenden Gesamtwiderstände erreichten von 60 bis 90 Minuten nach Perfusionsbeginn kein "Steady State"; bei den unauffälligen Lungen in **Gruppe 3** war der Gesamtwiderstand im "Steady State" gleichbleibend. Eine sorgfältige Lebend- und Organbeschau auf dem Schlachthof ist eine entscheidende Voraussetzung, um Lungen von vergleichbarer Qualität für die Perfusionen zu erhalten.

Bei den mit Intrazellulärlösung konservierten Lungen (**Gruppe 3**) waren gegenüber den mit Extrazellulärlösung konservierten Lungen (**Gruppe 5**) die pulmonal arteriellen Widerstände erhöht (**Gruppe 3** $4,30 \pm 1,62$; **Gruppe 5** $1,41 \pm 0,61$ [kPa*min*g/ml]). Bei Konservierung mit hohen Kaliumkonzentrationen war schon während der Konservierung das Einfließen der Konservierungslösung erheblich verlangsamt. Die Parameter der mit isotoner NaCl-Lösung konservierten Lungen (**Gruppe 7**) unterschieden sich nicht von denen mit LPD-Konservierung, jedoch erreichten die Gesamtwiderstände in **Gruppe 7** kein befriedigendes "Steady State" (Anhang Tab. 13).

Wir empfehlen zur Überprüfung von Konservierungen den Vergleich mit Lungen einer Kontrollgruppe, die mit isotoner Kochsalzlösung konserviert werden.

Aus den Ergebnissen folgern wir, dass die Funktionsbedingungen unserer isoliert hämoperfundierten Lungen Veränderungen eines Ischämie- Reperfusions- Schadens aufweisen. Viele der gemessenen Perfusionsparameter glichen zwar den in vivo Werten, bei vielen der funktionellen Parametern traten jedoch deutliche Unterschiede auf. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Perfusionen von Lungen, die von Schlachtschweinen gewonnen wurden, für Fragestellungen zum Ischämie-Reperfusions- Schaden geeignet sein können.

8 Summary

Autologous perfused pig lungs of slaughtered- and of experimental animals

The question of whether in vitro perfusion of slaughterhouse lungs can offer an alternative to bioassay warrants investigation. A necessary requirement for answering this query is adequate standardisation of the experimental setup. The parameters measured during the ex-vivo perfusions were compared with those measured in anaesthetised pigs. This study attempts to clarify whether continuous quality of the lungs removed at the slaughterhouse can be guaranteed by inspection of the living animal and of the organ once removed. We also investigated which solutions for the preservation of the lungs taken from non-heart-beating donors are suitable.

We established a method of ex-vivo perfusion of pig lungs, and evaluated it according to the measured parameters. The perfusions took 135 minutes altogether. Sixty to 90 minutes after measuring commenced, the parameters reached an adequate "Steady State". Extremely few changes were found between the perfusion parameters measured within the groups (**Groups 2 to 7**) at 60, 75 and 90 minutes. Those deviating individual parameters reaching no "Steady State" were designated as characteristic for that group. The values for the individual experimental groups were measured and compared with statistic methods in the "Steady State" period and were illustrated graphically or in tables. The experimental animals and perfused lungs were divided into 7 groups:

Group 1- measurements of lungs from anaesthetised pigs; **Group 2**- lungs from anaesthetised pigs which were perfused directly after removal from the animal; **Group 3**- v. Baeyer II preserved lungs with macroscopically inconspicuous lung findings; **Group 4**- v. Baeyer II preserved lungs with macroscopically suspicious lung findings; **Group 5**- LPD (low potassium dextrane) preserved lungs from healthy animals; **Group 6**- LPD preserved lungs from animals with suspected disease; **Group 7**- macroscopically inconspicuous lungs from healthy animals preserved in 0,9% saline solution.

Within the perfusions the perfusion pressures (PAP pulmonary arterial pressure) were adjusted to those measured in the anaesthetised animals (**Group 1** $3,43\pm 1,15$; **Group 2** $3,00\pm 0,63$; **Group 3** $3,19\pm 0,58$; **Group 4** $3,41\pm 0,84$; **Group 5** $3,10\pm 0,50$; **Group 6** $2,86\pm 0,71$ and **Group 7** $2,75\pm 0,97$ [kPa]). However, the lung perfusion rates achieved were substantially lower than those measured in anaesthetised pigs (**Group 1**

21,01±15,62; **Group 2** 1,19±0,92; **Group 3** 0,65±0,40; **Group 4** 0,34±0,21; **Group 5** 0,78±0,20; **Group 6** 0,39±0,19 and **Group 7** 0,55±0,19 [ml/min/g]).

Compared to the measurements taken in living animals (**Group 1**) lung mass increased during the lung perfusions due to edema growth. In the “Steady State” (**Groups 2, 3, 5 and 7**) blood circulation of perfused lungs reduced, total resistance increased, oxygen absorption worsened during lung perfusion, peak pressure increased and dynamic compliance was lower than those parameters measured in the anaesthetised pigs (**Group 1**). Histologically, after reperfusion, we observed aggregation of neutrophils, swelling of the alveolar septa and connective tissue, haemostasis and desquamation of cells and bleedings into the alveolar space (**Group 5**). Oxygen saturations, carbon dioxide partial pressure and pH values from pulmonary arterial and pulmonary venous measurements did not differ significantly in **Groups 1 and 2**. That was also the case regarding pulmonary venous oxygen partial pressure. The low values of pulmonary arterial oxygen partial pressure measured in the anaesthetised pigs could not be reproduced in the experimental setup with the membrane oxygenators used (**Group 1** 5,33±0,51 and **Group 2** 6,27±0,76 [kPa], $p < 0,05$).

We conclude that the perfusion of lungs taken at the slaughterhouse is comparable to that of lungs taken under laboratory conditions, based on the group 2 and 5 parameters that so closely correspond.

However, the histological picture (**Group 5**) as well as the differences mentioned between **Groups 1 and 2** document an ischemic reperfusion injury after lung perfusion in our model.

Lungs in **Groups 4 and 6** were macroscopically suspicious or taken from animals with suspected disease. Their perfusion parameters were compared with those from healthy lungs (**Groups 3 and 5**). Those function parameters within the suspicious lungs differed from values measured in healthy lungs (e.g. perfusion rate **Group 6** 0,39±0,18 and **Group 5** 0,78±0,20 [ml/min/g]; total resistance **Group 6** 9,25±6,53 and **Group 5** 3,25±1,02 [kPa*min*g/ml]; pulmonary venous resistance **Group 6** 5,88±3,74 and **Group 5** 1,95±0,61 [kPa*min*g/ml]); oxygen absorption **Group 6** 7,00±3,48 and

Group 5 $19,66 \pm 7,89$ [$\text{mlO}_2 \cdot \text{ml}_{\text{Blut}} / \text{min/g}$]). No “Steady State” could be achieved within 60 to 90 min after commencing perfusion in the suspicious lungs from group 4, as total resistance kept rising. In contrast, the total resistance in healthy lungs from group 3 remained constant. Careful inspection of the pigs at the slaughterhouse and organ-inspection of the lung once removed is crucial in order to obtain healthy lungs for perfusion experiments.

Increased pulmonary arterial resistance as seen in the lungs preserved with intracellular solution (**Group 3**) was greater compared to the lungs preserved with extracellular solution (**Group 5**) (**Group 3** $4,30 \pm 1,62$; **Group 5** $1,41 \pm 0,61$ [$\text{kPa} \cdot \text{min} \cdot \text{g/ml}$]). Rinsing with preservation solution containing high potassium concentrations decelerated the flow of the preservation fluid, indicating high vascular resistance. The parameters of the lungs preserved in isotonic saline solution (**Group 7**) did not differ from those with LPD preservation. However, total resistances in **Group 7** failed to achieve a adequate “Steady State”. Regarding the efficacy of preservation methods, we recommend that lungs from a control group should be compared to those preserved in isotonic saline solution.

From our results we conclude that the functional conditions of our isolated haemoperfused lungs reveal changes indicating ischemic reperfusion injury. Many of the perfusion parameters measured resemble in vivo values. However, clear differences arose among the numerous functional parameters. The results available show that perfusion of lungs removed from slaughterhouse pigs can be suitable in the investigation of ischemic reperfusion injury.