

Aus der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow-Klinikum,
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Optimierung der normothermen ex-vivo-Maschinenperfusion der
Rattenleber durch Dialyse und Kupferzellhemmung mittels Glycin

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Joseph Maria George Vernon Gaßner

aus Washington D.C.

Datum der Promotion: 04.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (Deutsch).....	3
Abstract (English)	4
Einleitung	5
Methoden	8
Perfusionsaufbau und -ablauf.....	8
Zusammensetzung des Perfusats	9
Tiere und Gruppeneinteilung	10
Operationsverfahren.....	11
Biochemische Parameter, Blutgasanalyse und Galleproduktion	12
Gewebeprobeentnahme und histologische Beurteilung	12
Kupferzellaktivität mittels TNF α rtPCR-Analyse und TNF α -ELISA	13
Statistische Auswertung	14
Ergebnisse	15
Normotherme ex-vivo-Perfusion der Rattenleber	15
Metabolische Charakterisierung während der Maschinenperfusion	15
Histopathologische Beurteilung	16
TNF α -Expressionsprofil und Gewebekonzentration.....	17
Ex-vivo-Maschinenperfusion vorgeschädigter DCD Organe	18
Diskussion	19
Literaturverzeichnis	23
Eidesstattliche Versicherung	25
Auszug aus der Journal Summary List	27
Druckexemplar der ausgewählten Publikation	28
Lebenslauf	41
Publikationsliste	42
Danksagung	43
Anhang	44

Abstrakt (Deutsch)

Jedes Jahr übersteigt die Zahl der Patienten, die eine Lebertransplantation benötigen, die Zahl der durchgeführten Transplantationen um das Doppelte. Um diesen Mangel zu begegnen werden vermehrt Organe zur Transplantation genutzt, die vorbestehende Spendercharakteristika wie z.B. hohes Alter, makrovesikuläre Verfettung oder Organspende nach Herztod aufweisen. Diese Organe sind jedoch mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität nach Transplantation assoziiert, da die klassische statische hypotherme Konservierung bei solchen kompromittierten Organen zu einem verstärkten Ischämie-Reperfusionsschaden führt. Die normotherme *ex-vivo*-Maschinenperfusion stellt ein vielversprechendes Konservierungsverfahren für diese Organe dar. Ein standardisiertes Kleintiermodell für Untersuchungen mit normothermer *ex-vivo*-Maschinenperfusion der Leber steht bislang nicht zur Verfügung. In dieser Arbeit wird ein für diesen Zweck geeignetes Perfusionssystem entwickelt, welches aus einer selbstentworfenen Perfusionskammer, einer Rollenpumpe mit Druckmessung und einem Oxygenator besteht. Lebertransplantate von männlichen Wistar Ratten wurden über sechs Stunden über die Pfortader mit oxygeniertem, mit Rattenerthrozyten substituiertem Kulturmedium perfundiert. Ein zweiter Kreislauf, der mit dem Perfusionssystem über eine Dialysemembran verbunden war, wurde zur Vergrößerung des Lösungsvolumens dialysefähiger Stoffe im System genutzt. Zur weiteren Optimierung dieses Perfusionssystems wurde eine medikamentöse Hemmung der Kupfferzellaktivität mit Glycin erprobt. Der Pfortaderdruck und die Freisetzung von Transaminasen in das Perfusat waren während der gesamten Perfusionsdauer stabil. Mittels Dialyse konnte die Kaliumkonzentration signifikant reduziert werden, hieraus resultierte eine signifikant höhere Galle- und Harnstoffproduktion. Hämatoxylin-Eosin Färbung sowie die Immunhistologische Färbungen zum Nachweis von ssDNS-Brüchen und aktivierter Caspase 3 zeigten weniger sinuoidale Dilatation und Gewebeschaden in Lebern, welche sowohl mit Dialyse als auch mit Glycin behandelt wurden. Während die Kupfferzellen durch die beiden Verfahren erhalten wurden, führte die Behandlung mit Glycin zu einem signifikanten Rückgang der von Kupfferzellen produzierten TNF α -mRNS im Lebergewebe. Dieses optimierte Perfusionsprotokoll wurde anschließend an Rattenlebern mit verlängerter Warmischämie getestet, welche die Organspende nach Herztod simulieren und dementsprechend ein klassisches Leberschädigungsmodell darstellen: Hier zeigten sich durch Dialyse und Glycinbehandlung eine signifikant geringere Freisetzung von Transaminasen in das Perfusat, die feingewebliche Untersuchung ergab eine deutlich besser erhaltene Lebergewebsarchitektur.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte und optimierte normotherme Maschinenperfusionssystem ermöglicht eine Konservierung von Rattenlebertransplantaten über sechs Stunden. Dialyse und Glycinbehandlung zeigen einen synergistischen, positiven Effekt auf das Ergebnis nach Perfusion.

Abstract (English)

Transplantation of organs with extended donor criteria e.g. due to age or steatosis hepatitis are associated with an increased risk for early graft dysfunction or primary nonfunction. Normothermic *ex vivo* liver machine perfusion is a promising alternative preservation strategy for liver grafts from extended criteria donors. This is due to the higher susceptibility to ischemia reperfusion injury after hypothermic static storage. Standardized small animal models are not available for basic research on machine perfusion of liver grafts. A laboratory-scaled perfusion system was developed consisting of a custom-made perfusion chamber, a pressure-controlled roller pump, and an oxygenator. Male Wistar rat livers were perfused via the portal vein for 6 hours using oxygenated culture medium supplemented with rat erythrocytes. A dialysis membrane connected a second parallel circuit to the main circuit for solvent volume expansion. To optimize the perfusion outcome further, the flush solution and the perfusate were substituted with glycine for Kupffer cell attenuation. Portal pressure and transaminase release were stable over the perfusion period. Dialysis significantly decreased the potassium concentration of the perfusate and led to significantly higher bile and total urea production. Hematoxylin and eosin staining showed less sinusoidal dilatation and tissue damage in livers treated with dialysis and glycine. Immunostaining for ssDNA as well as activated caspase 3 showed decreased apoptosis and minimal necrosis. While Kupffer cells were preserved best by both treatments, TNF α mRNA tissue levels were reduced significantly. Finally, as proof of concept, the optimized perfusion protocol was tested with grafts exposed to prolonged warm ischemia, resulting in significantly lower transaminase release into the perfusate and preserved liver architecture compared to perfusion without dialysis and glycine.

In conclusion, this optimized laboratory-scale normothermic portovenous *ex vivo* liver perfusion system enables rat liver preservation over 6 hours. Both dialysis and glycine treatment were shown to be synergistic for preservation of liver grafts during perfusion.

Abstract modifiziert aus der Publikation „*Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine*“ [1]

Einleitung

Der hier erstellte Manteltext stellt eine ausführliche Darstellung des klinischen Hintergrunds, der zugrundeliegenden Hypothesen, eine präzise Schilderung der verwendeten Methodik und der Ergebnisse, sowie eine eingehende Diskussion und einen Ausblick der Forschungsergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten normothermen ex-vivo-Maschinenperfusionssystems der Leber dar. Dies wurde in Grundzügen bereits vorab in der Publikation „*Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine*“ 2019 in dem Fachjournal *Liver Transplantation* veröffentlicht [1].

Für das akute Leberversagen, die fortgeschrittene Leberzirrhose und bestimmte Stadien des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) stellt die Lebertransplantation weiterhin das einzige kurative Therapiekonzept dar. Während der letzten zehn Jahre hat sich der Mangel an verfügbaren geeigneten Spenderorganen in Deutschland jedoch erheblich verschärft. Dies liegt, neben einem durch den Allokationsskandal verursachten Rückgang der Spenderbereitschaft [2], maßgeblich jedoch an der zunehmend alternden und adipösen Bevölkerung sowie der Verbesserung von Therapiekonzepten für Erkrankungen, die in der Vergangenheit zum Hirntod geführt hatten [3]. Dieser Trend betrifft einen Großteil der westlichen Welt, wie beispielsweise die Daten des *United Network for Organ Sharing* (UNOS) für die USA aufzeigen: Hier kann ein Anstieg des Spenderalters sowie der Anzahl an Spenderorganen von Spendern mit einem BMI von über 30 beobachtet werden [4]. Die Transplantation von Organen von Spendern, welche den sogenannten erweiterten Spenderkriterien entsprechen (*extended criteria donors*, ECD), ist jedoch mit einem deutlich erhöhten Risiko für schwerwiegende Komplikationen wie Transplantatversagen und Notwendigkeit einer Retransplantation assoziiert [5, 6]. Eine weitere Möglichkeit, die Diskrepanz zwischen Organangebot und -nachfrage zu reduzieren, stellt die Organspende nach Herztod, die sogenannte *donation after circulatory death* (DCD), dar. Bei diesem Verfahren erfolgt die Organentnahme, anders als bei der klassischen Organentnahme nach Hirntod (der sogenannten *donation after cardiac death*, DBD), nach Eintreten des Herzstillstands [4, 7]. Aufgrund der aktuell gültigen Gesetzeslage und ethischer Bedenken ist die Organentnahme nach Herzstillstand in Deutschland bislang jedoch nicht möglich. In den USA, dem Vereinigten Königreich und auch Österreich ist die Organentnahme nach Herztod hingegen etabliert und stellt mittlerweile 10% bis 30% der transplantierten Lebern [4, 8]. Bei der Organentnahme nach Herztod sind die entnommenen Organe im Vergleich zur Organentnahme nach Hirntod einer warmen Ischämiezeit vor der Organkonservierungsphase ausgesetzt, weshalb solche Organe ebenfalls in die Kategorie der erweiterten Spenderkriterien eingestuft werden [9]. Insbesondere bei der Transplantation von Lebern nach DCD zeigte sich

ein um zehn Prozent höheres Risiko einer Ischämie-bedingten Schädigung der Gallenwege (*ischemic type biliary lesions*, ITBL) [10].

Das erhöhte Risiko für Komplikationen nach Transplantation von Lebertransplantaten mit erweiterten Spenderkriterien wird mit einer größeren Anfälligkeit für den Ischämie-Reperfusionsschaden erklärt [11]. Es wird postuliert, dass diese Organe aufgrund der relativen Hypoxie in der Phase der kalten Ischämie während der Lagerung auf Eis nach Reperfusion einen stärkeren Reperfusionsschaden erleiden. Es wird eine Kombination aus der Einschränkung der Mikroperfusion durch eine Blockade der Lebersinusoide, und dem Anfallen von Metaboliten und einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) angenommen.

Die ex-vivo-Maschinenperfusion der Leber wird als Konzept zur Evaluierung, Konditionierung und Optimierung von diesen vorgeschädigten, marginalen Lebertransplantaten diskutiert. Das Konzept wurde bereits zu Beginn der Transplantationsmedizin entwickelt, jedoch aufgrund der hohen technischen Anforderungen zu Gunsten der statischen hypothermen Konservierung zunächst nicht weiterverfolgt wurde [12]. Nachdem die Transplantation von Organen zur klinischen Routine geworden ist und der Bedarf an geeigneten Spenderorganen aktuell nicht gedeckt werden kann, hat dieses Konservierungsverfahren wieder zunehmend neue Aufmerksamkeit erfahren: Bei der ex-vivo-Maschinenperfusion wird das Spenderorgan kontinuierlich mit einer Konservierungslösung perfundiert. Dies erhält den Metabolismus sowie die Mikroperfusion im Organ aufrecht und gewährleistet einen Abtransport von anfallenden Metaboliten [13]. Die ex-vivo Maschinenperfusion wurde klinisch erstmals im Rahmen der Lungentransplantation evaluiert [14]. Hier konnte durch Nutzung der Maschinenperfusion das Ergebnis nach Transplantation und die Anzahl an Transplantationen signifikant gesteigert werden [15]. Daraufhin wurden Systeme zur Perfusion von Herzen, Niere und Leber entwickelt. Nasralla et al. [16] konnten 2018 in einer multizentrischen Studie zeigen, dass die normotherme ex-vivo-Maschinenperfusion (*normothermic ex vivo liver perfusion*, NEVLP) mit oxygeniertem Blut keinen negativen Effekt auf das Ergebnis nach Transplantation normaler Lebertransplantate hat. Diese Studie zeigte darüber hinaus, dass in der Gruppe mit Maschinenperfusion mehr Spenderorgane nach DCD akzeptiert wurden als in der Kontrollgruppe mit statischer hypothermer Konservierung. Es wird postuliert, dass durch die Beurteilung der Organfunktion während der Perfusionsphase das Risiko des Transplantatversagens reduziert werden kann. Neben der Möglichkeit einer Organbeurteilung während Maschinenperfusion wird des Weiteren angenommen, dass kompromittierte Organe mittels NEVLP vor Transplantation *ex vivo* konditioniert und optimiert werden könnten [17]. Obwohl erste Perfusionssysteme bereits klinisch erprobt wurden, fehlt es in Hinblick auf die Leber an stabilen und standardisierten Kleintiermodellen [18]. Experimentelle Forschung im Bereich der ex-vivo-Maschinenperfusion der Leber erfolgte hauptsächlich mittels aufwendiger Großtiermodelle, welche zwar eine zügige Translation in die Klinik ermöglichen, jedoch eine

logistisch, ökonomische, und ethische Herausforderung darstellen. Zur Erforschung pharmakologischer Konzepte zur Konditionierung marginaler Lebertransplantate, welche die Erprobung verschiedener Agenzien und Dosierungen erfordern, sind jedoch standardisierte Kleintiermodelle erforderlich. Ziel dieser Arbeit stellt die Entwicklung eines solchen Kleintiermodells zur normothermen Maschinenperfusion der Leber dar.

Um einen möglichen Schaden während der normothermen ex-vivo-Maschinenperfusion zu vermeiden, müssen stabile physiologische Bedingungen erreicht werden. Hierfür wurde eine Inklusion eines Dialysekreislaufs zur Stabilisierung des pHs und der gelösten Elektrolyte wie Kalium und Natrium in den Perfusionskreislauf erprobt. Die Möglichkeit einer pharmakologischen Behandlung der Spenderorgane während der normothermen Maschinenperfusion sollte mittels der Substitution des Perfusats mit Glycin evaluiert werden. Von einer solchen Behandlung können einerseits vorgeschädigte Organe profitieren, beispielsweise nach einer verlängerten warmen Ischämie im Rahmen der DCD, andererseits ist auch eine immunologische Vorbehandlung gesunder Spenderorgane möglich, um das Risiko von Abstoßungen zu reduzieren [19]. Glycin ist eine Aminosäure, welche in höheren Konzentrationen zu einer transienten Hyperpolarisation der Kupferzellen führt. Diese Hyperpolarisation wird durch einen spezifischen Glycinrezeptor vermittelt, der zu einem Einstrom von Chloridionen und einer Unterbrechung der intrazellulären aktivierenden Signalbahnen führt [20, 21]. Dadurch wird die parakrine Beeinflussung der umliegenden Hepatozyten, Endothelzellen und Thrombozyten mittels TNF α und weiterer Zytokine verhindert [22, 23]. *Schemmer et al.* konnten zeigen, dass die Manipulation von Lebern während der Explantation zu einer Steigerung des hepatozellulären Metabolismus und zu einem vermehrten Sauerstoffverbrauchs führt, was durch die Kupferzellhemmung mittels Glycins reduziert wird [24]. Auch die Vasokonstriktion und die Plättchenaggregation wird durch die transiente Hemmung mittels Glycins gehemmt, was zu einer verbesserten Mikroperfusion des Organs führt [25].

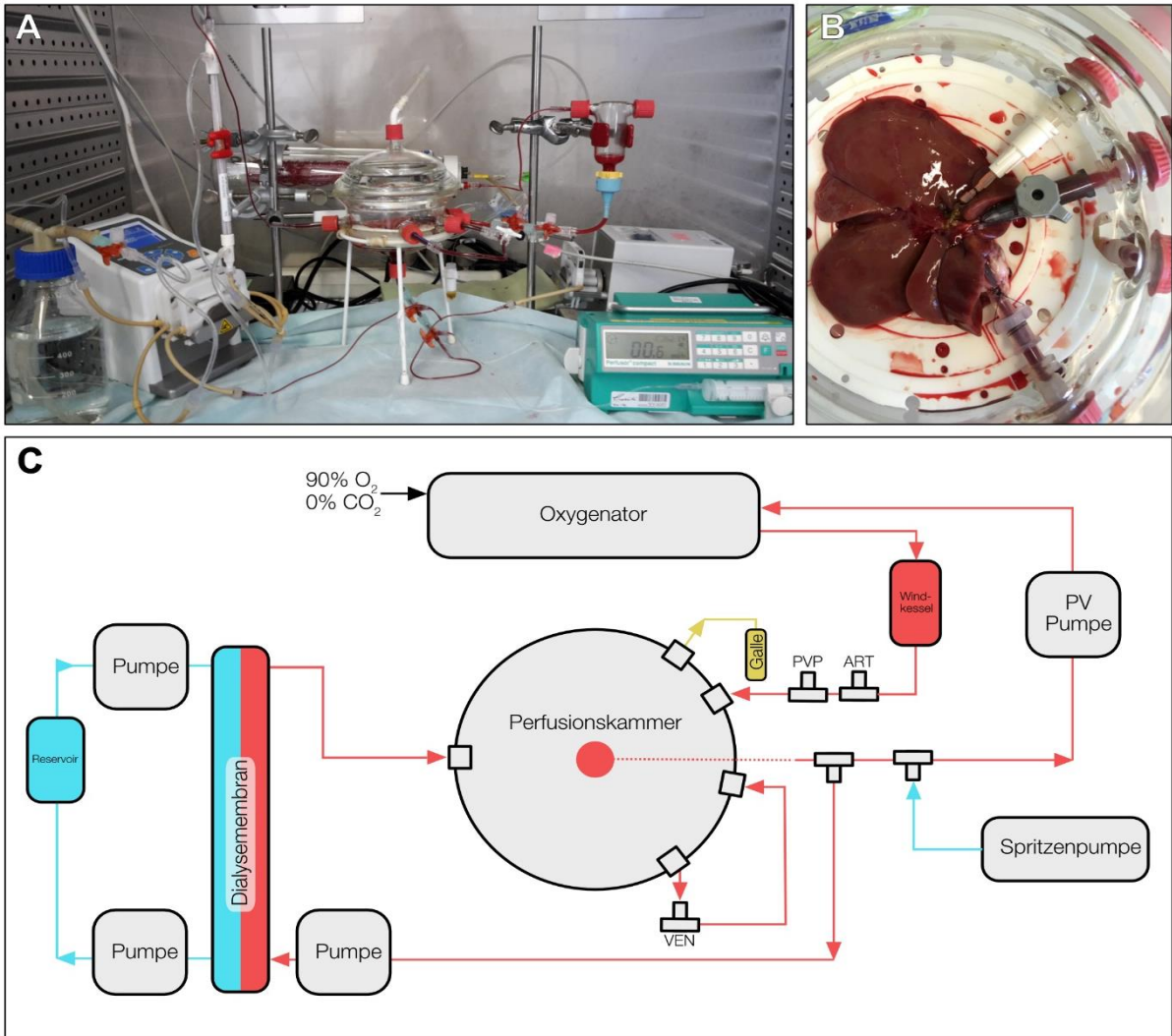
Ziel dieser Arbeit stellt dementsprechend die Entwicklung und Etablierung eines normothermen ex-vivo-Maschinenperfusionssystems für Rattenlebern dar. Darüber hinaus sollte dieses Perfusionssystem mit Lebertransplantaten von normalen und vorgeschädigten Ratten evaluiert werden.

Methoden

Perfusionsaufbau und -ablauf

Den zentralen Bauteil des Kreislaufs stellt eine für diese Anwendung entworfene Perfusionskammer aus Glas dar. Diese besteht aus einem Flanschgefäß mit 10cm Innendurchmesser, welches an der Unterseite einen konisch zusammenlaufenden Boden, der als Reservoir des Kreislaufs dient, mit einem Auslass besitzt. Des Weiteren wurden seitlich fünf Einlässe für die Konnexion der Leberhilumgefäße, des venösen Cavaabflusses und die Rückführung des dialysiertem Perfusats in das Reservoir angefügt (Glas Gaßner GmbH, Oberhaching, Deutschland). Aus dem Reservoir wird das Perfusat für den Organkreislauf mittels einer flussgesteuerter Pumpe in den Oxygenator befördert. Diese von Radnoti LTD entworfene Oxygenatorkammer (Radnoti LTD Dublin, Irland) wurde mit zwei parallelgeschalteten Silikonschläuchen mit einem Innendurchmesser von 1 mm und einer Wandstärke von 0,5 mm und einem Gesamtvolumen von 10 mL bestückt. Durch die Parallelschaltung wurden eine Verringerung des Flusswiderstands sowie eine ausreichend große Diffusionsoberfläche und geringe -Strecke für den Gasaustausch erreicht. Innerhalb der Oxygenatorkammer wurde mittels eines Gasmischers (DASGIP Eppendorf, Leipzig, Deutschland) mit einem kontinuierlichen Fluss von 15 slm eine Atmosphäre von 90 % Sauerstoff erzeugt. Zwischen den Oxygenator und den Pfortaderzufluss ist eine Glasblasenfalle geschaltet. Diese ist zu circa 30 % mit Perfusat gefüllt, so dass die Kompression der gefangenen Luft innerhalb der Blasenfalle einen Windkesselleffekt erzeugt, welcher den durch die Rollerpumpe erzeugten pulsatilen Fluss in einen laminaren Fluss auf der Pfortader umwandelt. Der Pfortaderdruck wird durch einen angeschlossenen Drucksensor gemessen und ebenso wie der durch die Pumpe erzeugte Fluss, kontinuierlich mit dem BDAS- Programm (Hugo Sachs Electronics, March-Hugstetten, Deutschland) aufgezeichnet.

In den Versuchen mit Dialysesystem wird das Perfusat mit einer zweiten Pumpe mit 10 ml/min aus dem Reservoir durch eine Dialysemembran (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA) und zurück in das Reservoir befördert. Als Dialysat werden 500 mL Ci-Ca Dialyseflüssigkeit K2 (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verwendet, die ebenfalls mittels zwei Pumpen im Gegenflussprinzip die Dialysemembranen umströmen. Die beiden Pumpen auf der Dialyseite sind vor und nach der Dialysekartusche geschaltet. Bei individueller Flusseinstellung der beiden Pumpen lässt sich eine möglicherweise auftretende Volumenverschiebung zwischen den beiden Kreisläufen über die Dialysemembran regulieren, indem die Druckverhältnisse innerhalb der Kartusche angepasst werden. Dieser Aufbau wird in einen auf 37°C temperierten Umgebungsschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) platziert (**Abbildung 1**).



Zusammensetzung des Perfusats

Das im Rahmen dieser Arbeit genutzte Perfusat basiert auf einem bereits für die Leberzellkultur etablierten Kulturmedium. Dieses besteht aus Phenolrot-freiem Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM, Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 1 g/dl Glukose, welches noch mit Penicillin/Streptomycin, Na-Pyruvat, L-Alanyl-L-Gluntamin, Insulin und Glucagon versetzt wurde (Tabelle 1)

Substanz	Konzentration der Substanz	Zusatzvolumen	Endgültige Konzentration
Penicillin/Streptomycin	10.000 µg/mL	5 mL	100 µg/mL
Na-Pyruvat	100 mM	5 mL	1 mM
L-Alanyl-L-Glutamin	200 mM	5 mL	2 mM
Insulin	5 IE/mL	60 µL	1 µM
Glucagon	50 µg/mL	14 µL	14 ng/mL

Tabelle 1: Kulturmediumzusätze

Um in dem Gesamtvolumen von 50mL einen Hämatokrit von 20 % zu erreichen, wurden 10 mL Rattenerthrozytenkonzentrat mit 5 mL frischgefrorenem Rattenplasma und 35 mL Kulturmediums resuspendiert. Es wurde außerdem Heparin hinzugegeben, um eine endgültige Konzentration von 10 IE/mL im Perfusat zu erreichen. In den Versuchsgruppen mit Glycin wurde eine Konzentration von 12 mM Glycin sowohl zu dem Perfusat als auch dem Dialysat hinzugefügt sowie kontinuierlich mit 45 mg/h in das System infundiert.

Tiere und Gruppeneinteilung

Alle Eingriffe am Tier wurden unter Achtung der EU-Richtlinien zum Schutz der für wissenschaftlichen Zwecke verwendeten Tiere (2010/63/EU) und nach Genehmigung durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo Berlin, O0365/11 und L0014/18) durchgeführt. Männliche Wistar Ratten wurden von Janvier (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) erworben. Die Tiere wurden gemäß den Haltungsstandards in einem 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und eine mindestens einwöchige Eingewöhnungsphase an die neue Haltungseinrichtung nach Transport gewährt. Die in den Versuchen verwendeten Tiere hatten ein Gewicht von 280 g bis 350 g.

Je vier Tiere wurden zufällig den sechs Untersuchungsgruppen zugeteilt. Die Versuche der Gruppe 1, welche als Kontrollgruppe dient, erfolgten ohne Dialysekreislauf und ohne Glycin. Um den Effekt der einzelnen Behandlungen zu testen, wurden die Gruppen 2 und 3 jeweils mit Dialysekreislauf oder Glycinbehandlung durchgeführt. Die Versuche in der Gruppe 4 erfolgten mit beiden Behandlungen. In den Gruppen 5 und 6 wurden Lebertransplantaten nach verlängerter Warmischämiezeit genutzt und es wurden für die Gruppe 5 das Perfusionsprotokoll der Gruppe 1 ohne Behandlungen und für die Gruppe 6 das optimierte Protokoll der Gruppe 4 verwendet (**Tabelle 2**).

	Perfusionsprotokoll	Tierzahl
Gruppe 1	G - , D -	4
Gruppe 2	G +, D -	4
Gruppe 3	G - , D +	4
Gruppe 4	G + , D +	4
Gruppe 5 (DCD)	G - , D -	4
Gruppe 6 (DCD)	G + , D +	4

Tabelle 2: Versuchsgruppen (G=Glycin, D=Dialyse, DCD=donation after circulatory death oder Tod nach Kreislaufversagen)

Operationsverfahren

Die Narkose der Tiere erfolgte mittels einer Isofluraninhalationsnarkose kombiniert mit subkutanen Injektionen von 100 mg/kg Metamizol (Winthrop Arzneimittel GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 12 mg/kg Ketamin (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland). Das Abdomen wurde von suprapubisch bis an beide Rippenbögen U-förmig eröffnet und die Leber dargestellt. Nach Trennen der Leberligamente erfolgte das Auslagern des Darmtrakts und Exposition des Leberhilums durch Inversion des Duodenums. Hier wurde der Gallengang mit einer selbstangefertigten Ableitung kanüliert. Diese Apparatur bestand aus einem 10cm langen Schlauch (Innendurchmesser: 0,58 mm und Außendurchmesser: 0,96mm), der in einem Luer-Slip befestigt wurde und einen kontinuierlichen Abfluss und späteres Auffangen der Galle ermöglichte. Über die Vena cava wurden 500 IE Heparin appliziert, die Aorta kanüliert und das Blut abgezogen, wobei circa 10 mL Rattenvollblut gewonnen wurden. Danach wurde das Zwerchfell eröffnet und die thorakale Vena cava angeschnitten, wodurch der Kreislauf endgültig zu stehen kam und eine Spülung der Leber möglich wurde. Die Spülung erfolgte mit jeweils 20 mL 4°C kalter Histidine-Ketoglutarat-Lösung (HTK, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Germany) über die Aorta und anschließend über die Pfortader. Im Falle der Behandlung mit Glycin enthielt die HTK-Spüllösung Glycin in einer Konzentration von 12mM. Die Antikoagulation garantierte hierbei eine vollständige Spülung der Leber ohne die Bildung von Mikrothromben, die die Mikroperfusion beeinflussen würden, und verhinderte das Gerinnen des gewonnenen Rattenblutes, so dass daraus Erythrozytenkonzentrat gewonnen werden konnte. Um den Leberkreislauf zu isolieren und die Verbindung in den künstlichen Kreislauf zu ermöglichen, wurden die Vena gastroduodenalis und die Ösophagusvenen zum Pfortadersystem hin ligiert und die Pfortader mit einer 16G Kanüle kanüliert. Als venöser Abfluss wurde die Vena cava abdominalis caudal der Leber mit einer selbstgebauten 10F Kanüle kanüliert. Die Vena cava wurde cranial der Leber verschlossen, darüber hinaus wurde die Vena suprarenalis dextra, welche lebernah in die V. cava pars abdominalis drainiert, ligiert. Die Makroskopie der Leber nach Organentnahme, insbesondere die Spülung von Blut, wurde durch den Entnahmekirurgen auf einer Skala von 1 bis 10, wobei 10 maximale Spülung entsprach, eingeschätzt. Die entnommene Leber wurde dann in ein vorgewogenes Gefäß mit 4°C kalter HTK-Lösung gelegt und dieses erneut gewogen, wodurch nach Abzug des Gewichts der Kanülen das Lebergewicht ermittelt wurde.

Die Methodik der Vorschädigung im Sinne eines DCD-Modells ist an die in der Publikation von Schlegel et al. angelehnt. Durch Blutentzug direkt nach dem Eröffnen des Abdomens wurden die Lebern in den Gruppen 5 und 6 einer 30-minütigen Warmischämie ausgesetzt. Danach wurde das Abdomen wieder verschlossen und nach 30 Minuten die Spülung und alle vorbeschriebenen Schritte durchgeführt.

Biochemische Parameter, Blutgasanalyse und Galleproduktion

Perfusatproben wurden zu Beginn der Perfusion sowie nach 3 und nach 6 Stunden am venösen Ausfluss entnommen. Dialysatproben wurden am Anfang und am Ende der Perfusion gewonnen. Die Proben wurden anschließend für 10 Minuten bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert, um den Überstand zu erhalten. Dieser wurde dann durch das Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH photometrisch auf Alanintransaminasen (ALT), Harnstoff, Bilirubin und freies Hämoglobin untersucht. ALT wurde als Marker für eine Leberschädigung gewählt, während Harnstoff und Bilirubin über die Leberfunktion eine Aussage zulassen. Um die Gesamtproduktion von Harnstoff über die Perfusionsdauer zu berechnen, wurde die Konzentration auf das gesamte Plasmavolumen des Versuchs normiert. Das freie Hämoglobin wurde bestimmt, um die Hämolyse während der Perfusion beurteilen zu können. Blutgasanalysen wurden zu den gleichen Zeitpunkten am Zufluss als auch Abfluss gewonnen. Diese wurden dann mit einem ABL800 Flex Blutgasanalysegerät (Radiometer GmbH, Berlin, Deutschland) gemessen, um den Perfusat-pH, die Kaliumkonzentration und pO₂, pCO₂ prä- und posthepatisch zu bestimmen. Die Galleproduktion wurde durch die aufgefangene Galle, die stündlich gewogen wurde, bestimmt.

Gewebeprobeentnahme und histologische Beurteilung

Am Ende der Perfusionsphase wurde die Leber mit 20 mL 4°C kalter Ringerlösung gespült. Von den Leberlappen wurde dann, wie von Ruehl-Fehlert et al. [26] beschrieben, je eine von zentral bis peripher reichende Gewebeprobe für die histologische Begutachtung in 4 % Paraformaldehyd für 24 Stunden fixiert. Je drei weitere frische Proben der einzelnen Lappen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C zur späteren Aufarbeitung gelagert.

Zur histologischen Beurteilung des Gewebeschadens wurden die Hämatoxylin Eosin Färbung und immunhistologische Färbungen zum Nachweis von DNS Einzelstrangbrüchen (Anti-ssDNS) und auf die aktivierte Form der Caspase 3 (Caspase3a), welche beide Marker für Apoptose sind, genutzt. Um die Kupferzellen im Gewebe mittels Immunfluoreszenzmessungen nachzuweisen, wurden Antikörper gegen CD68, ein Marker für gewebeständige Makrophagen verwendet. Für die Färbungen wurde die Gewebeprobe in einer ansteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Von jeder der fünf Gewebeproben pro Leber wurden fünf 2µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden dann wieder in einer absteigenden Alkoholreihe bewässert und für die Färbungen verwendet.

Für die Hämatoxylin Eosin Färbung wurden die Schnitte zehn Minuten mit Meyer's Hämatoxylin bedeckt und anschließend zehn Minuten mit lauwarmem Wasser gebläut. Als nächster Schritt erfolgte dann die Gegenfärbung mit Eosin für eine Minute. Von jedem der gefärbten Gewebeschnitte wurden dann bei einer 100-fachen Vergrößerung fünf zufällige Ausschnitte fotografiert und einer Pathologin (R.A.) pseudonymisiert und ohne weitere Informationen zur Beurteilung vorgelegt. Das Lebergewebe wurde hinsichtlich von Nekrose

und Apoptose, sichtbar durch hepatozelluläres Aufblähen, Zellkernverlust und Zellzerfall, und hinsichtlich sinusoidaler Dilatation untersucht.

Die Antigendemaskierung erfolgte für die Anti-ssDNA Färbung mittels einer Kombination aus Saponin (0,1 mg/mL in Phosphatpufferlösung) und 20 mg/mL Proteinase K gefolgt von 30 Minuten Inkubation in 56 °C warmer Formalinsäure. Nach dem Blocken der gewebeeigenen Peroxidase wurde der aus der Maus stammende Anti-ssDNA-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10 aufgetragen und mit einem Peroxidase-gekoppelten Kaninchen-Anti-Maus-IgM-Antikörper markiert. Für die Anti-Caspase3a wurde das Antigen-Retreaval mittels Pepsins (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) durchgeführt und dann ebenfalls ein endogener Peroxidaseblock vorgenommen. Der Anti-Caspase3a-Antikörper wurde in einer Verdünnung 1:100 in 0,3%iger TritonX-100 Lösung über Nacht inkubiert. Ein LSAB2 System gekoppelt mit HRP von Dako (DakoCytomation Inc., Carpinteria CA, USA, #K0675) wurde laut Herstelleranweisungen zur Antikörperdetektion verwendet. Beide vorgenannten immunhistochemischen Färbungen wurden anschließend mit DAB gefärbt und erhielten anschließend eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 Minuten.

Für die Epitop-Demaskierung der Immunfluoreszenzfärbung auf CD68-Antigen wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei 37°C in Pepsin inkubiert. Zum Blocken unspezifischer Epitope wurde eine 3%ige Ziegen Serumlösung (Agilent Technologies) verwendet. Danach wurde der aus der Maus stammende monoklonale Anti-CD68-Antikörper (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, [ED1] #ab31630) in einer 1:50 Verdünnung aufgetragen. Zur Visualisierung des CD68-Antikörperkomplexes wurde ein mit Alexa Fluor® 647 gekoppelter sekundärer Antikörper auf die Gewebeschnitte gegeben.

Die Aufnahmen wurden unter einem Zeiss Axio Observer.Z1 Mikroskop mit einer AxioCam 1Cc5 für Hellfeldmikroskopie und einer AxioCam 506 mono für Immunfluoreszenzaufnahmen gemacht und mithilfe der Zen 2.3 Pro Software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) analysiert.

Kupferzellaktivität mittels TNF α rtPCR-Analyse und TNF α -ELISA

Für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion wurde Lebergewebe in 500 μ L TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in einer Retsch MM 400 Schwingmühle (Retsch GmbH, Haan, Deutschland) zerkleinert. Zu dem Homogenisat wurde Chloroform hinzugegeben und bei 12000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert, um die mRNS enthaltende obere wässrige Phase zu erhalten. Diese wurde in ein neues RNase-freies Mikroreagenzgefäß überführt, dort mittels Isopropanol ausgefällt und mit Ethanol gewaschen. Das so gewonnene Pellet wurde anschließend in 30 bis 100 μ L Diethylcarbonat gelöst und die RNS-Konzentration in einem NanoDrop 2000c UV-Vis Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bei 260 bis 280nm bestimmt. Für die Transkription in komplementäre DNS wurden von jeder Probe je 2 μ g RNS in neue Mikroreaktionsgefäße

überführt und mit einem RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in einem PTC-100 Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) umgeschrieben. Mittels eines Primers für TNF α wurde dessen relatives Vorkommen normiert auf die endogenen Kontrollen β 2-Mikroglobulin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase gemessen, was Rückschlüsse auf die Menge an TNF α mRNS in den Lebergewebeproben und dessen Expression zuließ.

Für die Bestimmung mittels ELISA wurde das TNF α Protein nach einer adaptierten Methode von Borovikova et al. isoliert [27]: Hierfür wurden 50mg Lebergewebe in einem Puffer bestehend aus 0,05 % Natriumazid und 0,5 % TritonX100 versetzt mit Proteinaseinhibitoren mit pH 7,2 homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann für 10 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Mit dem somit gewonnene Überstand wurde anschließend ein rattenspezifischer TNF α -ELISA MAX Deluxe ® (BioLegend, San Diego, CA, USA) nach Herstellervorgaben durchgeführt und mit einem Infinite 200 PRO Plattenleser (Tecan Group, Männedorf, Schweiz) gemessen. Um die bestimmte TNF α Menge zwischen den Gruppen vergleichbar zu machen, wurde sie auf das Gesamtprotein, welches mittels BCA-Tests aus dem Überstand bestimmt wurde, normiert.

Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der untersuchten Gruppen wurden die Daten mittels Median und Interquartalsbereich (IQR) dargestellt. Kategorische Daten wurden mittels Chi-Quadratstest analysiert. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Bei gegebener Normalverteilung wurden für die Gruppenvergleiche ANOVA-Tests angewandt, bei fehlender Normalverteilung der Kruskal-Wallis-Test. Als signifikant wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ bei 95 % Konfidenzintervall festgelegt. Für die statistische Berechnung wurde SPSS Statistics Version 24.0 für macOS (IBM Corp., Armonk, NY, USA) benutzt und für die graphische Darstellung wurde GraphPad Prism Version 6.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet.

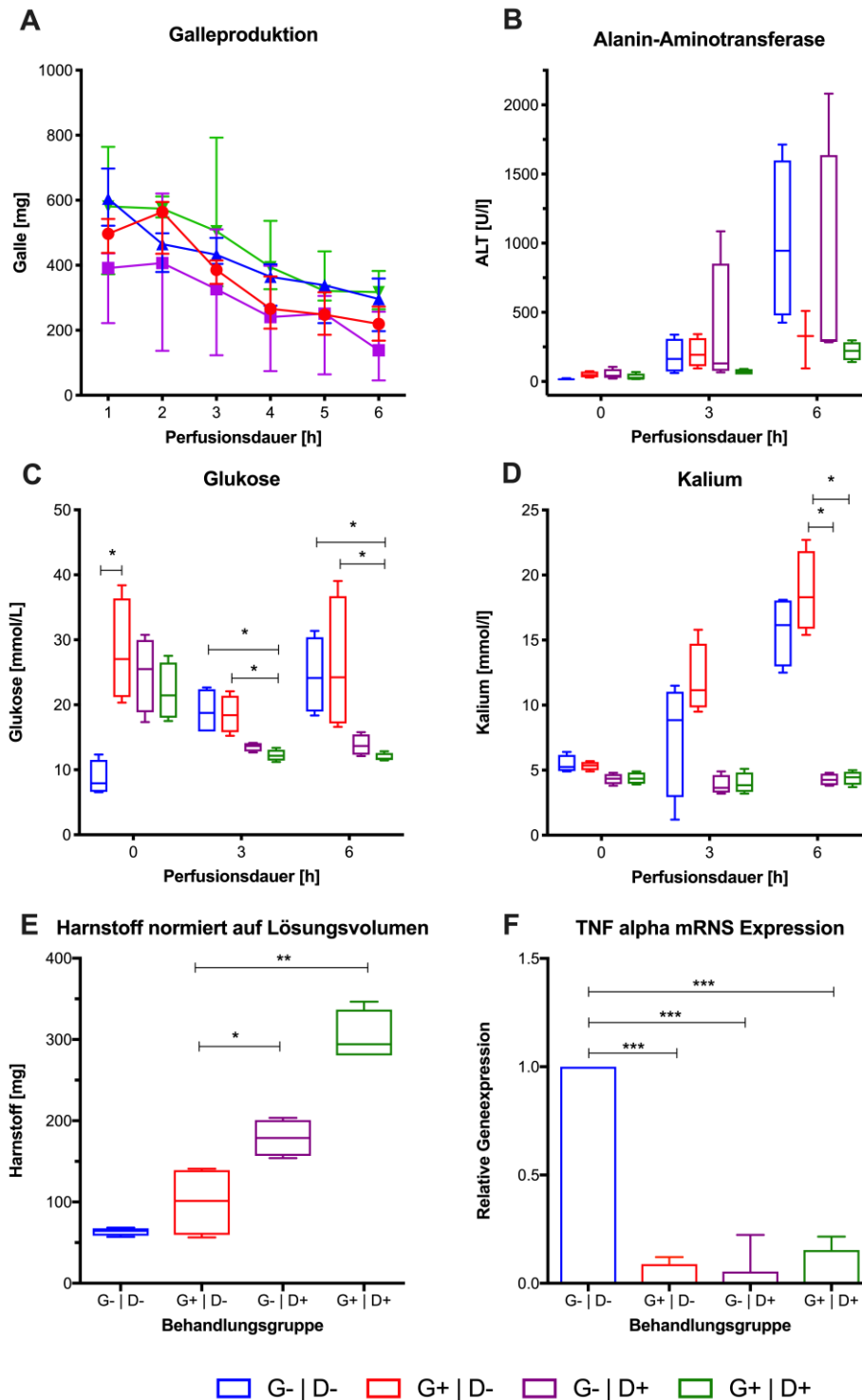
Ergebnisse

Normotherme ex-vivo-Perfusion der Rattenleber

Das Gewicht der Ratten und das Gewicht der isolierten Lebern unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen der DBD ($p = 0,19$ und respektive $p = 0,16$). Alle Operationen erfolgten gemäß dem festgelegten Protokoll. Sowohl die makroskopisch beurteilte Spülung des Organs als auch die Dauer der Kaltischämie, gemessen als Intervall zwischen intraoperativer Spülung und Beginn der Perfusion, waren in allen Gruppen vergleichbar ($p = 0,47$ und respektive $p = 0,61$). Der portalvenöse Perfusionsdruck befand sich über die gesamte Perfusionsdauer zwischen 4 und 9 mmHg und unterschied sich nicht zwischen den Versuchsgruppen. Die Galleproduktion nahm in allen Gruppen über die Perfusionsdauer ab, war aber in Versuchen mit Dialyse stets höher als in den Versuchen ohne integrierte Dialyse.

Metabolische Charakterisierung während der Maschinenperfusion

Zu Beginn der Perfusion war der pH in allen Gruppen auf einem physiologischen Niveau, nahm jedoch über die Perfusionsdauer ab. Versuche ohne Dialyse zeigten azidotische Bedingungen am Ende der Perfusion ($\text{pH}_{6h} \text{G+|D-}$ 6,94 und IQR 0,33 $p = 0,05$). In Versuchen ohne Dialyse erreichten die Kaliumkonzentrationen im Perfusat über die Perfusionsdauer ein unphysiologisch hohes Niveau ($[\text{K}^+]_{6h} \text{G+|D-}$ 16,15 mmol/L und IQR 5,08; $p = 0,009$), während die Kaliumkonzentration in den Versuchen mit Dialyse stets im physiologischen Bereich gehalten werden konnten (3,5 – 4,5 mmol/L). Ebenso war die Glukosekonzentrationen im Perfusat während der gesamten Perfusionsdauer mit Dialyse niedriger ($[\text{Glukose}]_{6h} \text{G+|D-}$ 24,12 mmol/L und IQR 11,45; $p = 0,006$). Die ALT Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen ($p = 0,1$), in Versuchen mit Glycin ließ sich jedoch ein Trend zu geringeren ALT-Konzentrationen im Perfusat beobachten. Die Harnstoffkonzentrationen im Perfusat waren in den Gruppen ohne Dialyse signifikant höher ($p = 0,005$). Die berechnete Gesamtmenge des über die Laufzeit der Perfusion produzierten Harnstoffs normiert auf das Perfusativolumen waren in den Versuchen mit Dialyse jedoch signifikant höher ($p < 0,001$).



Histopathologische Beurteilung

In den Versuchen mit nicht vorgeschädigten Lebertransplantaten zeigte die Hämatoxylin Eosin Färbung nur eine geringfügige sinusoidale Dilatation (**Abbildung 2 A-D**). Die durch die Pathologin beurteilten Nekrose- und Apoptoseareale waren in der Gruppe mit Dialyse und Glycinbehandlung mit einem Median von 6,5% und IQR 2,52 am geringsten und in der Gruppe ohne Behandlung mit Dialyse und Glycin am höchsten. Sowohl der immunhistologische Nachweis von DNS-Einzelstrangbrüche und auch der aktivierten Form der Caspase 3 zeigten

große nekrotische Areale und eine Vielzahl an Apoptosen in den Versuchsgruppen ohne Dialyse im Vergleich zu denen mit Dialyse (**Abbildung 2 E-L**). Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse der HE Färbung, welche den geringsten Anteil an Nekrose und Apoptose in den Lebern mit Dialyse und Glycinbehandlung zeigte. Die CD68 Immunfluoreszenzfärbung ergab nur wenige positive Zellen in der Kontrollgruppe G-|D- und vereinzelte Zellen in den Lebern mit entweder Dialyse oder Glycin. Dahingegen waren in den Lebern, die die kombinierte Behandlung erhalten hatten, viele positiv gefärbte Zellen darstellbar (**Abbildung 2 M-P**)

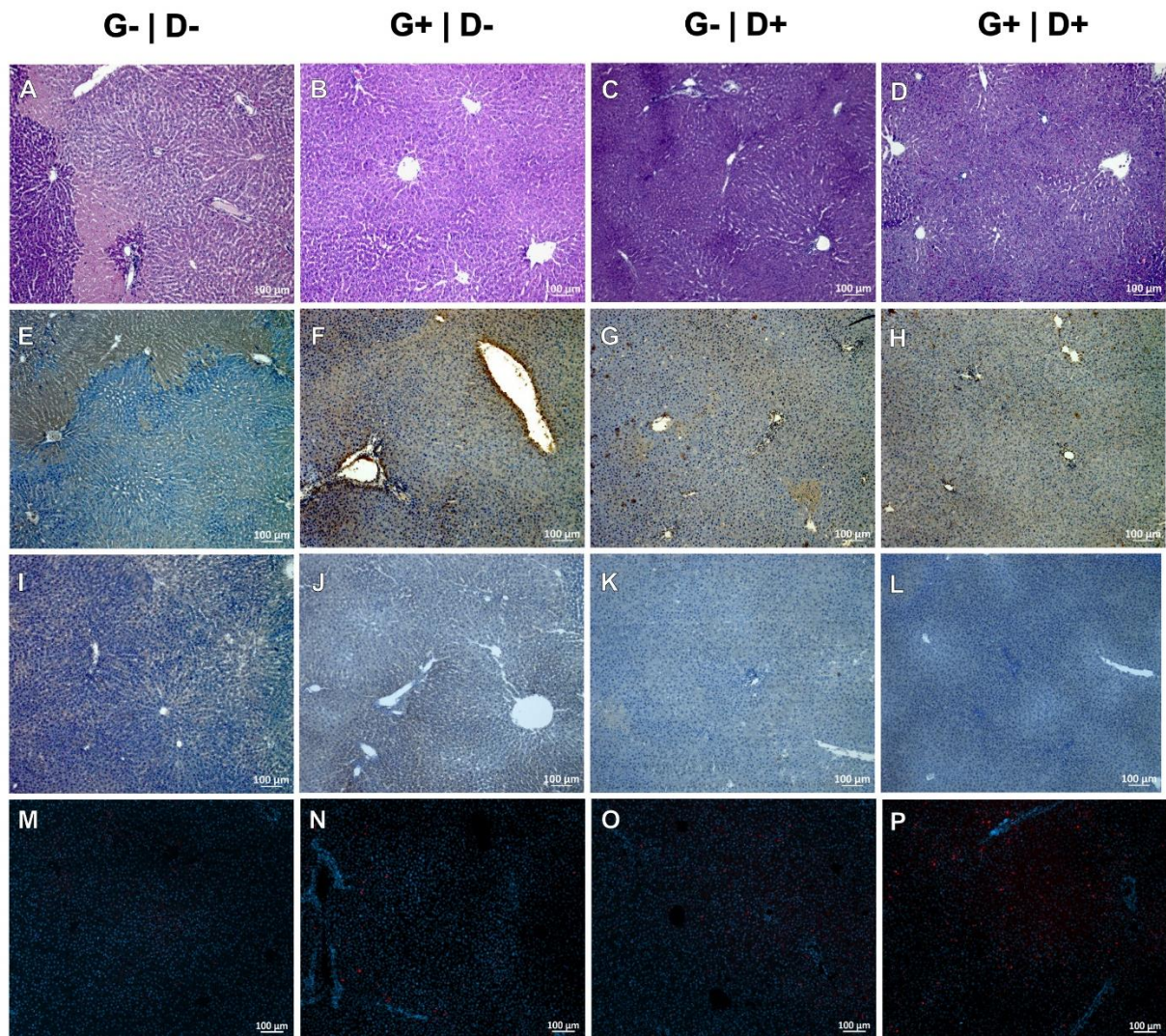


Abbildung 2: A-D Hämatoxylin Eosin Färbung, E-H Immunhistochemischer Nachweis von DNS-Einzelstrangbrüche, I-L Immunhistochemischer Nachweis der aktivierten Form der Caspase 3, M-P Immunfluoreszenz Färbung nach Kupferzellen mittels Anti-CD68-Antikörper; Graphik modifiziert aus Gassner et al. [1].

TNF α -Expressionsprofil und Gewebekonzentration

B2-Mikroglobulin erwies sich als eine gute endogene Kontrolle für die qT-PCR. Im Gegensatz hierzu wurde die Expression von GAPDH im Lebergewebe durch die Dialyse beeinflusst. Die Menge an TNF α -mRNS war in der Gruppe ohne Dialyse und Glycinbehandlung 6-fach höher als in den anderen Gruppen ($p < 0,001$), wohingegen die Menge an TNF α im Gewebe normiert auf den Proteingehalt sich nicht signifikant zwischen den Versuchsgruppen unterschied.

Ex-vivo-Maschinenperfusion vorgeschädigter DCD Organe

Die Gruppen der durch die Warmischämie vorgeschädigten Rattenlebern unterschieden sich weder im Gewicht der Tiere noch im Lebergewicht oder der Kaltischämiezeit von denen der gesunden Lebern. Die makroskopische Spülung nach Organentnahme wurde jedoch signifikant schlechter eingeschätzt ($p = 0,004$). Der portalvenöse Perfusionsdruck war zu Beginn signifikant höher im Vergleich zu den nicht vorgeschädigten Organen ($p = 0,01$). DCD Organe ohne Dialyse und Glycinbehandlung hatten einen durchweg erhöhten Perfusionsdruck, wobei sich der portovenöse Druck durch die kombinierte Behandlung rasch normalisierte. Dieser Unterschied erreichte jedoch aufgrund der geringen Fallzahl keine Signifikanz (P_{PV6h} 8,95 mmHg und IQR 3,5mmHg vs. 6,1 mmHg und IQR 1,28mmHg, $p = 0,2$, **Abbildung 3 A**). Die Kalium- (**Abbildung 3 B**), Glukose- und Harnstoffkonzentrationen waren wie bei den normalen Lebern durch die Dialyse und Glycinbehandlung auf einem deutlich physiologischeren Niveau. Das kombinierte Behandlungsprotokoll mit Glycin und Dialyse verbesserte ebenfalls die Zellschädigungsmarker: Die ALT Freisetzung war signifikant niedriger ($p = 0,03$, **Abbildung 5 C**) und die histopathologische Beurteilung in der HE-Färbung zeigte signifikant weniger Nekroseareale. Dies bestätigte sich auch in den immunhistochemischen Färbungen (**Abbildung 3 D-I**).

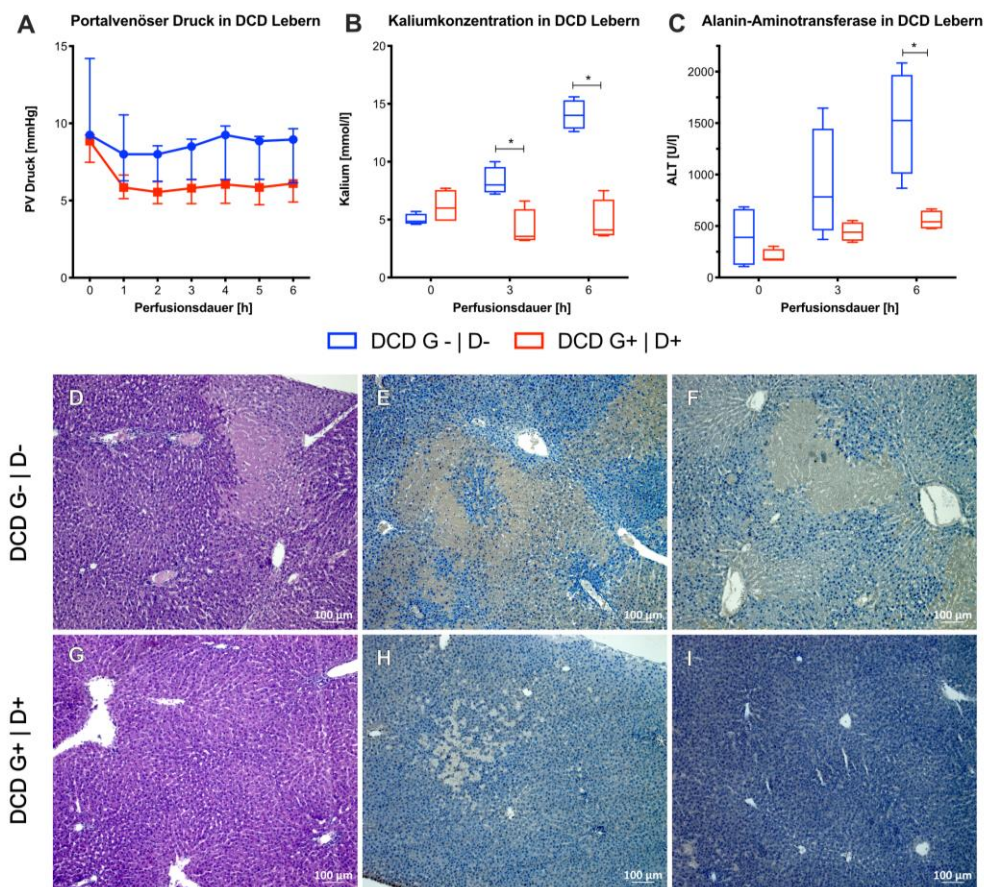


Abbildung 3: Ergebnisse der Perfusionsversuche mit vorgeschädigten Organen nach warmer Ischämie; **A:** Portalvenöser Druck in mmHg über die Perfusionsdauer, **B:** Kaliumkonzentration im Perfusat, **C:** ALT Konzentration im Perfusat zu den verschiedenen Messpunkten. **D-F:** HE, Immunhistologischer Nachweis von anti-ssDNS und Anti-Caspase3a in Lebern mit Kontrollprotokoll und G-I für das optimierte Protokoll. Graphikmodifiziert aus der Publikation von Gassner et al. [1]

Diskussion

Der Organmangel und die zunehmende Nutzung von Spenderorganen mit erweiterten Spenderkriterien, einschließlich die international weit verbreitete Nutzung von Lebertransplantaten nach DCD für die Lebertransplantation treiben die Entwicklung der ex- vivo-Maschinenperfusion voran. Obwohl die Maschinenperfusion bereits Gegenstand zahlreicher klinischer Studien ist, sind zahlreiche Fragen bislang noch nicht abschließend geklärt. Die hypotherme Perfusion bei 4° bis 10°C und die normotherme Perfusion bei 37°C sind bislang am besten untersucht, während die subnormotherme Perfusion bei 21°C vor allem im klinischen Bereich eher eine untergeordnete Rolle spielt. *Ravikumar et al.* und *Selzner et al.* konnten anhand klinischen Phase 1 Studien in Europa und den USA die Sicherheit und Machbarkeit der normothermen ex-vivo-Maschinenperfusion demonstrieren [28, 29]. *Nasralla et al.* zeigten darüber hinaus, dass die normotherme Maschinenperfusion im Vergleich zur klassischen statischen Kaltlagerung keine negativen Effekte hat [16].

Die hypotherme Perfusion stellt am ehesten eine Weiterentwicklung der klassischen statischen Kaltlagerung dar. Der Wirkmechanismus der hypothermen Maschinenperfusion zielt darauf ab, den Ischämie-Reperfusionsschaden zu minimieren [30]. Bei der Transplantation kommt es zu der verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Mitochondrien. Nach Reperfusion führt der umgekehrte Elektronenfluss von Komplex II zu I, ausgelöst durch hohe Succinatkonzentrationen, zu einer Beladung des nun vorhandenen Sauerstoffs mit überschüssigen Elektronen. Die Sauerstoffspezies führen zu Zellschädigung, der Aktivierung der Kupferzellen und der Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen [31]. Die Perfusion mit oxygenierter Konservierungslösung, wie es im Regelfall bei klinisch genutzten hypothermen Perfusionssystemen erfolgt, führt zu einem Rückgang des umgekehrten Elektronenflusses durch Reduktion der Succinatkonzentrationen und kann ebenfalls zu einer Regeneration der ATP-Mengen führen. Durch den Erhalt des intravasalen Drucks wird dazu eine Verengung des Sinusoidalraums verhindert und die Mikroperfusion des Organs verbessert [30].

Die normotherme Perfusion zielt neben der verbesserten Mikroperfusion auf einen Erhalt des Zellmetabolismus durch physiologische Bedingungen ab. Durch Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff wird die aerobe ATP-Synthese aufrechterhalten, ohne dass die zellulären Energiespeicher verbraucht werden. Das produzierte Kohlendioxid wird abtransportiert und kann das Perfusat über den Oxygenator verlassen, so dass es nicht zu einer Übersäuerung des Gewebes sowie des Systems kommt. Durch den funktionierenden Metabolismus und die normalen Temperaturen können aber im Vergleich zur hypothermen Perfusion schädliche Zellsignalmechanismen, die bei niedrigen Temperaturen geblockt werden, schnell zunehmen. Durch den, relativ zu dem bei hypothermen Bedingungen, erhöhten Metabolismus ist bei der normothermen Perfusion die Hinzugabe von Sauerstoffträgern, welche eine regulierte Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe gewährleisten, unumgänglich [32]. Künstliche Sauerstoffträger,

basierend auf Hämoglobinkonglomeraten, die in Zukunft für die ex-vivo-Perfusion eingesetzt werden könnten, sind ebenfalls Gegenstand von Forschung und Entwicklung [33]. Durch den im Rahmen der normothermen Perfusion erhaltenen Metabolismus kommt es jedoch zu einem vermehrten Anfall an metabolischen Abfallprodukten, welche zu einer schädlichen Konzentration im Perfusat akkumulieren können. *Tolboom et al.* konnte Ratten-Lebertransplantate nach 6 Stunden normothermer Perfusion mit einem integrierten Dialysesystem erfolgreich transplantieren [34]. In den hier beschriebenen Versuchen ohne Dialyse konnte ein starker Anstieg der Kalium-, Glukose- und Harnstoffkonzentrationen beobachtet werden. Durch die Integration eines Dialysekreislaufs konnten diese Metabolitenkonzentrationen in physiologischen Bereichen gehalten werden. Die in dieser Arbeit beschriebene Dialysemethodik stellt dadurch, dass das Dialysat ohne Austausch oder Verwerfen kontinuierlich zirkuliert wird, eine Dialyse mit begrenzter Kapazität zur Lösung und Verdünnung dialysefähiger Stoffe dar. Ein Austausch von Elektrolyten und kleinerer Moleküle wird über die Dialysemembran erreicht, ohne dass größere Perfusatbestandteile wie Erythrozyten übertreten. Wie an der Kalium- und Harnstoffkonzentrationen während Perfusion beobachtet werden kann, reicht die Kapazität jedoch in diesem Aufbau aus, um schädliche Konzentrationen vermeiden zu können. Sollte in Zukunft eine längere Perfusionsdauer angestrebt werden, wäre ein Entfernen jedoch gegebenenfalls notwendig. In dem hier beschriebenen Kreislauf wäre dies auch möglich. Der Vorteil der hier genutzten Art der Dialyse ist der geringe Bedarf an Dialysat im Vergleich zu einem *single-pass* System. Es reduziert in einem experimentellen Setting den Aufwand und die Kosten, was auch für klinisch angewendete Systeme, insbesondere mobile Perfusionssysteme, sinnvoll erscheint. Obwohl die Lebertransplantate in Versuchen ohne Dialyse hohen Kaliumkonzentrationen und niedrigen pH Niveaus ausgesetzt wurden, führte dies nicht zu einer signifikant höheren Freisetzung von Transaminasen. Dies kann durch die geringe Fallzahl der Versuche, aber auch durch die hohe Toleranz der Hepatozyten gegenüber niedrigen pH-Werten bedingt sein [35]. Infolge der Dialyse verbesserten sich die funktionellen Parameter der Leber deutlich: Harnstoff als Marker für die metabolische Aktivität der Leber konnte in allen Versuchen in steigender Konzentration im Perfusat während der Perfusionsdauer beobachtet werden. In den Versuchen ohne Dialyse zeigten sich zum Ende der Perfusion signifikant höhere Konzentrationen als in den Versuchen ohne Dialyse. Diese hohen Harnstoffkonzentrationen schaden dem Organ [36]. Bei einer Analyse der über das gesamte Perfusionsvolumen normierten Gesamtmenge an Harnstoff zeigte sich, dass die Versuche mit Dialyse zu einer signifikant höheren Harnstoffproduktion führten, was einer höheren metabolischen Aktivität entspricht. Auch die höhere Gallproduktion in den Versuchen mit Dialysekreislauf ist ein Zeichen der bei physiologischen Perfusionsbedingungen verbesserten Leberfunktion. Die Dialyse und die damit einhergehende Plasmavolumenvergrößerung führte darüber hinaus dazu, dass sich das Volumen des Organkreislaufs nicht veränderte, so dass der Hämatokrit

durch die hinzugefügten 10 mL Rattenerythrozyten gleichblieb und die Nutzung zusätzlicher Versuchstiere zur Blutgewinnung vermieden werden konnten.

Wie zuvor beschrieben, ist während der Phase der normothermen Maschinenperfusion bei erhaltenem Metabolismus eine pharmakologische Behandlung der Lebern denkbar. Goldaracena et al. demonstrierten beispielsweise, dass in Schweinelebern während normothermer Maschinenperfusion eine antiinflammatorische Behandlung und eine Unterdrückung der Replikation des Hepatitis C Virus möglich ist [37]. Durch die Applikation von Glycin sowohl während der Spülung als auch während der Perfusion der Organe sollte die Möglichkeit einer pharmakologischen Behandlung in dem entwickelten Perfusionssystem erprobt werden. Glycin wurde aufgrund seiner guten Verträglichkeit und der hemmenden Wirkung auf die Kupfferzellen gewählt [38]. Durch die Glycin-Applikation während der Perfusion konnten keine signifikanten Veränderungen auf die Perfusionsparameter gezeigt werden. Die Freisetzung von ALT in das Perfusat war in der Gruppe mit kombinierter Dialyse- und Glycinbehandlung am geringsten, erreichte aufgrund der hohen Varianz der anderen Gruppen und der niedrigen Fallzahl jedoch keine Signifikanz. In der histologischen Begutachtung wurde der Effekt des Glycins deutlicher. Hier konnte sowohl in der Hämatoxylin Eosin Färbung als auch den immunhistologischen Färbungen eine deutliche Reduktion des Zelluntergangs während der Perfusion mit Glycin beobachtet werden. Dies wäre durch den zuvor beschriebenen Effekt der Kupfferzellaktivierung auf den hepatozellulären Metabolismus und auch durch die Steigerung des Sauerstoffbedarfs zu erklären. Interessanterweise zeigte sich in der CD68 Immunfluoreszenzfärbung eine höhere Anzahl an Kupfferzellen nach Perfusion mit Glycin als ohne. In der isolierten Leber sind Kupfferzellen die einzige Quelle des proinflammatorischen Zytokins $\text{TNF}\alpha$. Aus diesem Grund wurde die $\text{TNF}\alpha$ mRNA Expression und die Menge an $\text{TNF}\alpha$ im Lebergewebe als Aktivitätsmarker der Kupfferzellen interpretiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kupfferzellen wie angestrebt durch die Glycinbehandlung inaktiviert werden, da sich eine signifikant reduzierte $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Expression ohne höhere $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung in das Gewebe in den Gruppen mit Behandlung zeigen ließen. Da sich Kupfferzellen selbst in vivo nicht innerhalb von 6 Stunden deutlich vermehren [39], wird der vermehrte Nachweis von Kupfferzellen in den Gruppen mit Dialyse und Glycinbehandlung durch ein gesteigertes Überleben erklärt. Durch die Hemmung der Kupfferzellaktivität als auch durch die durch die Kupfferzellen verursachte zytokingesteuerte Vasokonstriktion ist die Reperfusion nach der Phase der Kaltischämie und die Mikroperfusion des Organs verbessert. Zusätzlich überstehen die Kupfferzellen die Perfusionsphase durch die ausgiebigere Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr sowie die reduzierte Aktivität besser und stellen somit auch ein guter Marker für das verbesserte Ergebnis nach Perfusion unter optimierten Bedingungen dar. Diese Hypothese kann auch die hohen Mengen an $\text{TNF}\alpha$ -mRNA in den Versuchen ohne Dialyse und Glycinbehandlung erklären: Da aktivierte Kupfferzellen bei unphysiologischen Perfusionsbedingungen apoptotisch werden, ist die Translation gestört

und die mRNA bleibt im Gewebe zurück. Diese Hypothese gilt es mit weiteren Analysen zu verifizieren. Für eine Transplantation hätte dies jedoch Implikationen: Zunächst einmal müsste die Hemmung auch während der Transplantation und besonders der Reperfusion durchgeführt werden. *Hidaka et al.* belegten jedoch, dass Kupferzellen einen Einfluss auf die Organakzeptanz nach der Transplantation haben [40]. Zudem konnte aufgezeigt werden, dass Kupferzellen, sobald die erste Phase der Reperfusion und Kupferzellaktivität überstanden ist, durch ihre antigenpräsentierende Rolle zu einer höheren immunologischen Toleranz gegenüber der Spenderleber führen, was auch das Immunprivileg der Leber erklären kann [41].

Im Sinne einer Machbarkeitsstudie sollte anhand von durch Warmischämie vorgeschädigten Organen untersucht werden, ob die in den gesunden Organen beobachteten positiven Ergebnisse der Behandlung mit Dialyse und Glycin auch auf ECD Organe übertragen werden können. Das Modell der Warmischämie nach Kreislaufversagen durch Blutentzug wurde aus mehreren Gründen gewählt: Der Herztod ist ein gut standardisiertes Modell zur Abbildung der Verhältnisse nach Organentnahme nach Herzstillstand. Die Untersuchungen können mit geringem technischem Aufwand durchgeführt werden. Im Gegensatz beispielsweise zu einem Fettleberinduktionsprotokoll geht dieses Verfahren nur zu einer geringen Belastung für die Spendertiere einher, da alle Prozeduren in tiefer Narkose durchgeführt werden. Außerdem war es für die Versuche von Vorteil, dass das gewonnene Blut zur Isolation von Rattenerythrozyten für die Perfusion verwendet werden konnte, was eine Reduktion der Zahl der benötigten Tiere ermöglichte. Die Perfusion der DCD Organen mit Glycin und Dialyse Protokoll zeigte eine deutliche Verbesserung des Perfusionsergebnisses im Vergleich zu Perfusion ohne diese Optimierung: Der portalvenöse Druck wurde reduziert, die Freisetzung von Transaminasen war signifikant geringer und auch die histopathologische Analyse zeigte eine deutliche Reduktion des Zelluntergangs bis hin zu minimalem Zellschaden. Dies entspricht den aus Großtiermodellen und klinischen Studien gewonnenen Ergebnissen, wonach das Ergebnis nach Transplantation durch normothermer Maschinenperfusion von ECD-Lebertransplantaten verbessert wird [42, 43]. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Perfusionssystem ist es in Zukunft möglich, Protokolle zu entwickeln, welche eine Rekonditionierung von ECD Lebertransplantaten für die Transplantation ermöglichen. Des Weiteren sind physiologische und pharmakologische ex-vivo-Untersuchungen, die sonst an lebenden Tieren durchzuführen wären, im Rahmen von *Refinement*-Studien möglich, die leberspezifische pharmakodynamische und metabolische Prozesse beobachtet und beeinflusst werden können.

Das im Rahmen dieser Forschungsarbeit entwickelte Lebermaschinenperfuionsmodell ermöglicht eine normotherme Maschinenperfusion von Rattenlebern über einen Zeitraum von sechs Stunden. Durch die kombinierte Behandlung mit Dialyse und Glycin konnte eine deutliche Verbesserung des Ergebnisses nach Perfusion erzielt werden, insbesondere in der

Gruppe der vorgeschädigten Organe. Die Dialyse führt durch physiologische Perfusionsbedingungen zu einer verbesserten metabolischen Leberfunktion. Die transiente Hemmung der Kupferzellaktivität führt zu einer verbesserten initialen Reperfusion und zu einem deutlich geringeren Zellschaden.

Literaturverzeichnis

1. Gassner, J.M.G.V., M. Nösser, S. Moosburner, R. Horner, P. Tang, L. Wegener, D. Wyrwal, F. Claussen, R. Arsenic, J. Pratschke, I.M. Sauer, and N. Raschzok, Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine. *Liver Transpl*, 2019. 25(2): p. 275-287.
2. Tacke, F., D.C. Kroy, A.P. Barreiros, and U.P. Neumann, Liver transplantation in Germany. *Liver Transpl*, 2016. 22(8): p. 1136-42.
3. Pais, R., A.S. Barritt, Y. Calmus, O. Scatton, T. Runge, P. Lebray, T. Poynard, V. Ratziu, and F. Conti, NAFLD and liver transplantation: Current burden and expected challenges. *J Hepatol*, 2016. 65(6): p. 1245-1257.
4. UNOS. Donor data for Age, BMI and donation mode. 2017; Available from: <http://optn.transplant.hrsa.gov>.
5. Lue, A., E. Solanas, P. Baptista, S. Lorente, J.J. Araiz, A. Garcia-Gil, and M.T. Serrano, How important is donor age in liver transplantation? *World J Gastroenterol*, 2016. 22(21): p. 4966-76.
6. de Graaf, E.L., J. Kench, P. Dilworth, N.A. Shackel, S.I. Strasser, D. Joseph, H. Pleass, M. Crawford, G.W. McCaughan, and D.J. Verran, Grade of deceased donor liver macrovesicular steatosis impacts graft and recipient outcomes more than the Donor Risk Index. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012. 27(3): p. 540-6.
7. Monbaliu, D., J. Pirenne, and D. Talbot, Liver transplantation using Donation after Cardiac Death donors. *J Hepatol*, 2012. 56(2): p. 474-85.
8. Organ Donation and Transplantation Activity Report 2017-18. NHS Blood and Transplant.
9. Manara, A.R., P.G. Murphy, and G. O'Callaghan, Donation after circulatory death. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 2012. 108(suppl_1): p. i108-i121.
10. O'Neill, S., A. Roebuck, E. Khoo, S.J. Wigmore, and E.M. Harrison, A meta-analysis and meta-regression of outcomes including biliary complications in donation after cardiac death liver transplantation. *Transpl Int*, 2014. 27(11): p. 1159-74.
11. Zhai, Y., H. Petrowsky, J.C. Hong, R.W. Busuttil, and J.W. Kupiec-Weglinski, Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. 10(2): p. 79-89.
12. McKenna, G.J. and G.B.G. Klintmalm, Chapter 1 - The History of Liver Transplantation, in *Transplantation of the Liver (Third Edition)*, R.W. Busuttil and G.B.G. Klintmalm, Editors. 2015, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 2-22.
13. Petrowsky, H. and P.-A. Clavien, Chapter 44 - Principles of Liver Preservation, in *Transplantation of the Liver (Third Edition)*, R.W. Busuttil and G.B.G. Klintmalm, Editors. 2015, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 582-599.
14. Steen, S., T. Sjoberg, L. Pierre, Q. Liao, L. Eriksson, and L. Algotsson, Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet*, 2001. 357(9259): p. 825-9.
15. Reeb, J. and M. Cypel, Ex vivo lung perfusion. *Clin Transplant*, 2016. 30(3): p. 183-94.
16. Nasralla, D., C.C. Coussios, H. Mergental, M.Z. Akhtar, A.J. Butler, C.D.L. Ceresa, V. Chiocchia, S.J. Dutton, J.C. Garcia-Valdecasas, N. Heaton, C. Imber, W. Jassem, I. Jochmans, J. Karani, S.R. Knight, P. Kocabayoglu, M. Malago, D. Mirza, P.J. Morris, A. Pallan, A. Paul, M. Pavel, R.P. MTP, J. Pirenne, R. Ravikumar, L. Russell, S. Upponi, C.J.E. Watson, A. Weissenbacher, R.J. Ploeg, P.J. Friend, and E. Consortium for Organ Preservation in, A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature*, 2018. 557: p. 50-56.
17. Mergental, H., B.T.F. Stephenson, R.W. Laing, A.J. Kirkham, D.A.H. Neil, L.L. Wallace, Y.L. Boteon, J. Widmer, R.H. Bhogal, M. Perera, A. Smith, G.M. Reynolds, C. Yap, S.G. Hubscher, D.F. Mirza, and S.C. Afford, Development of Clinical Criteria for Functional Assessment to Predict Primary Nonfunction of High-Risk Livers Using Normothermic Machine Perfusion. *Liver Transpl*, 2018. 24(10): p. 1453-1469.
18. Schlegel, A., P. Kron, R. Graf, P. Dutkowski, and P.A. Clavien, Warm vs. cold perfusion techniques to rescue rodent liver grafts. *J Hepatol*, 2014. 61(6): p. 1267-75.
19. Dutkowski, P., M. Linecker, M.L. DeOliveira, B. Mullhaupt, and P.A. Clavien, Challenges to liver transplantation and strategies to improve outcomes. *Gastroenterology*, 2015. 148(2): p. 307-23.
20. Wheeler, M., R.F. Stachlewitz, S. Yamashina, K. Ikejima, A.L. Morrow, and R.G. Thurman, Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *Faseb j*, 2000. 14(3): p. 476-84.
21. Froh, M., R.G. Thurman, and M.D. Wheeler, Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. 283(4): p. G856-63.
22. Qu, W., K. Ikejima, Z. Zhong, M.P. Waalkes, and R.G. Thurman, Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. 283(6): p. G1249-56.

23. Schemmer, P., Z. Zhong, U. Galli, M.D. Wheeler, L. Xiangli, B.U. Bradford, L.O. Conzelmann, D. Forman, J. Boyer, and R.G. Thurman, Glycine reduces platelet aggregation. *Amino Acids*, 2013. 44(3): p. 925-31.
24. Schemmer, P., N. Enomoto, B.U. Bradford, H. Bunzendahl, J.A. Raleigh, J.J. Lemasters, and R.G. Thurman, Activated Kupffer cells cause a hypermetabolic state after gentle in situ manipulation of liver in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001. 280(6): p. G1076-82.
25. Thurman, R.G., P. Schemmer, Z. Zhong, H. Bunzendahl, M. von Frankenberg, and J.J. Lemasters, Kupffer cell-dependent reperfusion injury in liver transplantation: new clinically relevant use of glycine. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd*, 1998. 115: p. 185-90.
26. Ruehl-Fehlert, C., B. Kittel, G. Morawietz, P. Deslex, C. Keenan, C.R. Mahrt, T. Nolte, M. Robinson, B.P. Stuart, and U. Deschl, Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Exp Toxicol Pathol*, 2003. 55(2-3): p. 91-106.
27. Borovikova, L.V., S. Ivanova, M. Zhang, H. Yang, G.I. Botchkina, L.R. Watkins, H. Wang, N. Abumrad, J.W. Eaton, and K.J. Tracey, Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000. 405(6785): p. 458-62.
28. Ravikumar, R., W. Jassem, H. Mergental, N. Heaton, D. Mirza, M.T. Perera, A. Quaglia, D. Holroyd, T. Vogel, C.C. Coussios, and P.J. Friend, Liver Transplantation After Ex Vivo Normothermic Machine Preservation: A Phase 1 (First-in-Man) Clinical Trial. *Am J Transplant*, 2016. 16(6): p. 1779-87.
29. Selzner, M., N. Goldaracena, J. Echeverri, J.M. Kathis, I. Linares, N. Selzner, C. Serrick, M. Marquez, G. Sapisochin, E.L. Renner, M. Bhat, I.D. McGilvray, L. Lilly, P.D. Greig, C. Tsien, M.S. Cattral, A. Ghanekar, and D.R. Grant, Normothermic ex vivo liver perfusion using steen solution as perfusate for human liver transplantation: First North American results. *Liver Transpl*, 2016. 22(11): p. 1501-1508.
30. Schlegel, A., P. Kron, and P. Dutkowski, Hypothermic machine perfusion in liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 2016. 21(3): p. 308-14.
31. Chouchani, E.T., V.R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijevic, S.Y. Sundier, E.L. Robb, A. Logan, S.M. Nadtochiy, E.N.J. Ord, A.C. Smith, F. Eyassu, R. Shirley, C.H. Hu, A.J. Dare, A.M. James, S. Rogatti, R.C. Hartley, S. Eaton, A.S.H. Costa, P.S. Brookes, S.M. Davidson, M.R. Duchon, K. Saeb-Parsy, M.J. Shattock, A.J. Robinson, L.M. Work, C. Frezza, T. Krieg, and M.P. Murphy, Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 2014. 515(7527): p. 431-435.
32. Barbas, A.S., N. Goldaracena, M.J. Dib, and M. Selzner, Ex-vivo liver perfusion for organ preservation: Recent advances in the field. *Transplant Rev (Orlando)*, 2016. 30(3): p. 154-60.
33. Matton, A.P.M., L.C. Burlage, R. van Rijn, Y. de Vries, S.A. Karangwa, M.W. Nijsten, A.S.H. Gouw, J. Wiersema-Buist, J. Adelman, A.C. Westerkamp, T. Lisman, and R.J. Porte, Normothermic machine perfusion of donor livers without the need for human blood products. *Liver Transpl*, 2018. 24(4): p. 528-538.
34. Tolboom, H., R. Pouw, K. Uygun, Y. Tanimura, M.L. Izamis, F. Berthiaume, and M.L. Yarmush, A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue Eng*, 2007. 13(8): p. 2143-51.
35. Currin, R.T., G.J. Gores, R.G. Thurman, and J.J. Lemasters, Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. *FASEB J*, 1991. 5(2): p. 207-10.
36. Lau, W.L. and N.D. Vaziri, Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back. *Clin Sci (Lond)*, 2017. 131(1): p. 3-12.
37. Goldaracena, N., V.N. Spetzler, J. Echeverri, J.M. Kathis, V. Cherepanov, R. Persson, M.R. Hodges, H.L. Janssen, N. Selzner, D.R. Grant, J.J. Feld, and M. Selzner, Inducing Hepatitis C Virus Resistance After Pig Liver Transplantation-A Proof of Concept of Liver Graft Modification Using Warm Ex Vivo Perfusion. *Am J Transplant*, 2017. 17(4): p. 970-978.
38. Schemmer, P., B.U. Bradford, M.L. Rose, H. Bunzendahl, J.A. Raleigh, J.J. Lemasters, and R.G. Thurman, Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am J Physiol*, 1999. 276(4 Pt 1): p. G924-32.
39. Bouwens, L., M. Baekeland, R. De Zanger, and E. Wisse, Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology*, 1986. 6(4): p. 718-22.
40. Hidaka, M., S. Eguchi, M. Takatsuki, A. Soyama, S. Ono, T. Adachi, K. Natsuda, T. Kugiyama, T. Hara, S. Okada, H. Imamura, S. Miura, and H. Miyaaki, The Kupffer Cell Number Affects the Outcome of Living Donor Liver Transplantation from Elderly Donors. *Transplant Direct*, 2016. 2(8): p. e94.
41. You, Y., J. Zhang, J. Gong, Y. Chen, Y. Li, K. Yang, and Z. Liu, Mesenchymal stromal cell-dependent reprogramming of Kupffer cells is mediated by TNF-alpha and PGE2 and is crucial for liver transplant tolerance. *Immunol Res*, 2015. 62(3): p. 292-305.
42. Boehnert, M.U., J.C. Yeung, F. Bazerbachi, J.M. Knaak, N. Selzner, I.D. McGilvray, O.D. Rotstein, O.A. Adeyi, S.M. Kandel, P. Rogalla, P.M. Yip, G.A. Levy, S. Keshavjee, D.R. Grant, and M. Selzner, Normothermic acellular ex vivo liver perfusion reduces liver and bile duct injury of pig livers retrieved after cardiac death. *Am J Transplant*, 2013. 13(6): p. 1441-9.
43. Pavel, M.C., E. Reyner, J. Fuster, and J.C. Garcia-Valdecasas, Liver transplantation from type II donation after cardiac death donor with normothermic regional perfusion and normothermic machine perfusion - first case reported in the international literature. *Cir Esp*, 2018.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Joseph Gaßner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Optimierung der normothermen ex-vivo-Maschinenperfusion der Rattenleber durch Dialyse und Kupferzellhemmung mittels Glycins*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben ist. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation:

Publikation: **Joseph M.G.V. Gassner**, M. Nösser, S. Moosburner, R. Horner, P. Tang, L. Wegener, D. Wyrwal, F. Claussen, R. Arsenic, J. Pratschke, I.M. Sauer, Nathanael Raschzok, “*Improvement of normothermic ex vivo machine perfusion of rat liver grafts by dialysis and Kupffer Cell inhibition with glycine*”, *Liver Transplantation*

Online Veröffentlichung: 31.01.2019 Akzeptiertes Manuskript online: 20.10.2018

Beitrag im Einzelnen:

Die hier vorgestellte Forschungsarbeit geht aus der durch die *Organ Recovery Group* (Projektleitung: Priv.-Doz. Dr. Nathanael Raschzok) der Experimentellen Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Leitung: Prof. Dr. Igor M. Sauer) angestrebten Etablierung einer normothermen ex-vivo-Lebermaschinenperfusion im Kleintiermodell hervor. Ich habe dieses Perfusionssystem zusammen mit Maximilian Nösser und Simon Moosburner etabliert. Die beschriebenen operativen Verfahren wurden ebenfalls gemeinsam mit Maximilian Nösser an die in der Arbeitsgruppe vorbestehenden Methoden angepasst. Die Konzeption der Glycinbehandlung, die Literaturrecherche und die verwendeten Methoden zur Bestätigung unserer Hypothesen wurden von mir erstellt. Ich habe den Großteil der Perfusionsversuche (>80%) nämlich Organentnahme, Aufbau des Perfusionskreislaufs, Überwachung der Perfusion und Probenentnahme selbst durchgeführt. Bei der statistischen Analyse und der Anfertigung der Gewebeschnitte hatte ich die Unterstützung von Simon Moosburner. Die beschriebenen Färbungen der Schnitte habe ich zusammen mit Peter Tang, Markus Güttler und Simon Moosburner etabliert und angefertigt. Die Mikrographieaufnahmen der gefärbten Gewebeschnitte habe ich angefertigt und randomisiert für die Auswertung durch die Pathologin Dr. Arsenic zusammengestellt. Die PCR-Analyse habe ich in Unterstützung von Rosa Horner durchgeführt und die ELISA-Analyse selbst angefertigt. Das Manuskript zur Veröffentlichung in *Liver Transplantation* habe ich erstellt und mit Priv.-Doz. Dr. Nathanael Raschzok und Prof. Dr. Igor M. Sauer überarbeitet. Die Bilder für die verschiedenen Graphiken wurden von mir aufgenommen und mit Hilfe von Simon Moosburner in ihrer Form zusammengestellt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers (PD Dr. med. Nathanael Raschzok)

Unterschrift des Doktoranden (Joseph Gaßner)

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Citation Report : Impact factor

JCR Year	SURGERY			TRANSPLANTATION			GASTROENTEROLOGY & HEPATOLOGY		
	Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile
2018	16/203	Q1	92.365	6/25	Q1	78.000	21/84	Q1	75.595
2017	22/200	Q1	89.250	8/25	Q2	70.000	24/80	Q2	70.625
2016	20/197	Q1	90.102	6/25	Q1	78.000	20/79	Q2	75.316
2015	11/200	Q1	94.750	5/25	Q1	82.000	18/79	Q1	77.848
2014	11/198	Q1	94.697	3/25	Q1	90.000	17/76	Q1	78.289
2013	14/204	Q1	93.382	4/26	Q1	86.538	16/75	Q1	79.333
2012	11/199	Q1	94.724	5/26	Q1	82.692	15/74	Q1	80.405
2011	15/199	Q1	92.714	8/24	Q2	68.750	20/74	Q2	73.649
2010	24/188	Q1	87.500	10/25	Q2	62.000	22/72	Q2	70.139
2009	10/167	Q1	94.311	4/24	Q1	85.417	14/66	Q1	79.545
2008	7/148	Q1	95.608	3/21	Q1	88.095	12/55	Q1	79.091
2007	8/139	Q1	94.604	4/21	Q1	83.333	13/50	Q2	75.000
2006	3/137	Q1	98.175	2/19	Q1	92.105	8/48	Q1	84.375
2005	3/139	Q1	98.201	2/20	Q1	92.500	6/46	Q1	88.043
2004	6/139	Q1	96.043	2/19	Q1	92.105	7/46	Q1	85.870
2003	4/141	Q1	97.518	2/18	Q1	91.667	6/47	Q1	88.298
2002	5/141	Q1	96.809	2/17	Q1	91.176	7/45	Q1	85.556

Copyright © 2019 Clarivate Analytics

By exporting the selected data, you agree to the data usage policy set forth in the Terms of Use

Journal Citation Report für das Journal *Liver Transplantation* am 23.07.2019 von ISI Web of Knowledge Clarivate Analytics exportiert.

Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine

Joseph M. G. V. Gassner,¹ Maximilian Nösser,¹ Simon Moosburner ,¹ Rosa Horner,¹ Peter Tang,¹ Lara Wegener,¹ David Wyrwal,¹ Felix Claussen,¹ Ruza Arsenic,² Johann Pratschke,¹ Igor M. Sauer,¹ and Nathanael Raschzok^{1,3}

¹Experimental Surgery, Department of Surgery, CampusCharité Mitte | CampusVirchow-Klinikum; ²Institute of Pathology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany; and ³Charité Clinician Scientist Program, Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

Normothermic ex vivo liver machine perfusion might be a superior preservation strategy for liver grafts from extended criteria donors. However, standardized small animal models are not available for basic research on machine perfusion of liver grafts. A laboratory-scaled perfusion system was developed consisting of a custom-made perfusion chamber, a pressure-controlled roller pump, and an oxygenator. Male Wistar rat livers were perfused via the portal vein for 6 hours using oxygenated culture medium supplemented with rat erythrocytes. A separate circuit was connected via a dialysis membrane to the main circuit for plasma volume expansion. Glycine was added to the flush solution, the perfusate, and the perfusion circuit. Portal pressure and transaminase release were stable over the perfusion period. Dialysis significantly decreased the potassium concentration of the perfusate and led to significantly higher bile and total urea production. Hematoxylin-eosin staining and immunostaining for single-stranded DNA and activated caspase 3 showed less sinusoidal dilatation and tissue damage in livers treated with dialysis and glycine. Although Kupffer cells were preserved, tumor necrosis factor α messenger RNA levels were significantly decreased by both treatments. For proof of concept, the optimized perfusion protocol was tested with donation after circulatory death (DCD) grafts, resulting in significantly lower transaminase release into the perfusate and preserved liver architecture compared with baseline perfusion. In conclusion, our laboratory-scaled normothermic portovenous ex vivo liver perfusion system enables rat liver preservation for 6 hours. Both dialysis and glycine treatment were shown to be synergistic for preservation of the integrity of normal and DCD liver grafts.

Liver Transplantation 25 275–287 2019 AASLD.

Received June 5, 2018; accepted October 3, 2018.

Recent years have shown a dramatic aggravation of the mismatch between donor organ demand and supply. This is due to various reasons, eg, the increasing incidence of nonalcoholic fatty liver disease in the general population⁽¹⁾ and, especially in Germany, a reluctance

for organ donation after brain death (DBD).⁽²⁾ Data from the United Network for Organ Sharing reveal a shift toward older donors as well as a higher percentage of livers from donors with a body mass index of 30 kg/m² or greater.⁽³⁾ Transplantation of organs from so-called extended criteria donors (ECDs), which are elderly or steatotic or biochemically compromised, is associated with a significantly higher risk for severe complications after transplantation.^(4,5) One option to ameliorate the gap between available liver grafts and patients on the waiting list is the use of organs from donation after circulatory death (DCD) instead of DBD donors, which was introduced into clinical use in several countries.⁽³⁾ Organs procured after circulatory death are exposed to longer periods of warm ischemia and are therefore often also considered extended

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; ART, arterial sampling; D, dialysis; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DBD, donation after brain death; DCD, donation after circulatory death; ECD, extended criteria donor; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; G, glycine; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; H & E, hematoxylin-eosin; HTK, histidine tryptophan ketoglutarate; mRNA, messenger RNA; NEVLP, normothermic ex vivo liver perfusion; PBS, phosphate-buffered saline; PVP, portal venous pressure; ssDNA, single-stranded DNA; TNF- α , tumor necrosis factor α ; VEN: venous sampling.

criteria organs.⁽⁶⁾ Organs from ECD or DCD donors are more susceptible to ischemia/reperfusion injury. The transformed cellular metabolism after ischemia produces more radical oxygen species and the accumulation of toxic metabolites, and the compromised microcirculatory system causes liver injury after rewarming of the organ from static cold storage.⁽⁷⁾

The poorer patient outcome of ECD or DCD liver grafts after static cold storage calls for new methods of organ preservation.^(8,9) In recent years, ex vivo machine perfusion has re-emerged as a possible alternative to static cold storage. Machine perfusion has been developed at hypothermic (4°C) as well as normothermic (37°C) conditions for organ preservation. Hypothermic perfusion allows for metabolite clearing and sustained microcirculation while limiting cell metabolism and biliary damage.⁽¹⁰⁾ Normothermic ex vivo liver perfusion (NEVLP) sustains the metabolic activity of the graft, which allows a more precise viability assessment of ECD liver grafts as well as mitigating preexisting damage by pharmacological intervention.⁽¹¹⁾

Because of the technical challenges of rodent NEVLP, most of this research is currently done using costly and logistically challenging porcine models.^(12,13) To foster the development of NEVLP and to investigate proposed pharmacological treatments on a large-scale basis, small animal experimental models of NEVLP are needed. Our aim was to develop a portovenous NEVLP setup for rat livers that maintains stable conditions during the preservation period. We included a dialysis circuit for plasma volume expansion and evaluated its ability to minimize accumulation of metabolites during the perfusion. Second, we wanted to investigate

whether pharmacological therapy with glycine can be used to improve the integrity of the graft during perfusion. Glycine is a simple amino acid and has been shown to exhibit cytoprotective effects on sinusoidal cells and hepatocytes,⁽¹⁴⁾ while temporarily reducing Kupffer cell activation⁽¹⁵⁾ and platelet aggregation.⁽¹⁶⁾ Kupffer cells, the liver's innate phagocytic cells, are thought to be one of the initiators of the inflammatory signaling chain of ischemia/reperfusion injury. Our NEVLP setup was evaluated with normal and DCD rat liver grafts.

Materials and Methods

PERFUSION SETUP AND PROCEDURE

The perfusion circuit consisted of a custom-designed glass perfusion chamber with multiple inlets (Glass Gaßner GmbH, Munich, Germany), a roller pump in combination with a pressure sensor, and a silicon membrane oxygenator (Radnoti, Dublin, Ireland) with a priming volume of 10 mL and 90% O₂ atmosphere. A glass bubble trap prevented air embolism, and the Windkessel effect generated a laminar portal flow (Fig. 1). The flow was set to 1 mL/minute/g liver weight, and the resulting portal pressure was continuously recorded with BDAS 2.0 software (Harvard Apparatus, Holliston, MA). In the dialysis group, the blood was also diverted from the reservoir via a second roller pump to the dialysis membrane (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA) with a constant flow of 10 mL/minute. We used 500 mL of Ci-Ca dialysate K2 (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) substituted with 500 IE of heparin (Rotexmedica, Trittau, Germany). Dialysate flow was generated by 2 pumps in front of and behind the dialysis membrane running at 10 mL/minute, which were adjustable to counteract volume shift. Heparin was continuously infused at 500 IE/hour using a syringe driver (Perfusor, B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany). The liver was flushed via the portal vein using 20 mL of Ringer's solution and placed on a silicon hammock exposing the hilum. The portal vein and vena cava were connected to the perfusion circuit and the bile duct to a preweighed collection tube.

ANIMALS AND GROUP PROTOCOLS

Male Wistar rats were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and kept on a 12-hour

Address reprint requests to Nathanael Raschzok, M.D., Department of Surgery, Campus Charité Mitte | Campus Virchow Klinikum, Experimental Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. Telephone: +49 30 450 652 356; FAX: +49 30 450 559 912; E-mail: nathanael.raschzok@charite.de

This work was funded by institutional financial support of the Charité–Universitätsmedizin Berlin and by a kickbox seed grant of the Einstein Center for Regenerative Therapies. Nathanael Raschzok is supported by the Berlin Institute of Health and Charité–Universitätsmedizin Berlin Clinician Scientist program.

Copyright © 2018 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI

10.1002/lt.25360

Potential conflict of interest: Nothing to report.

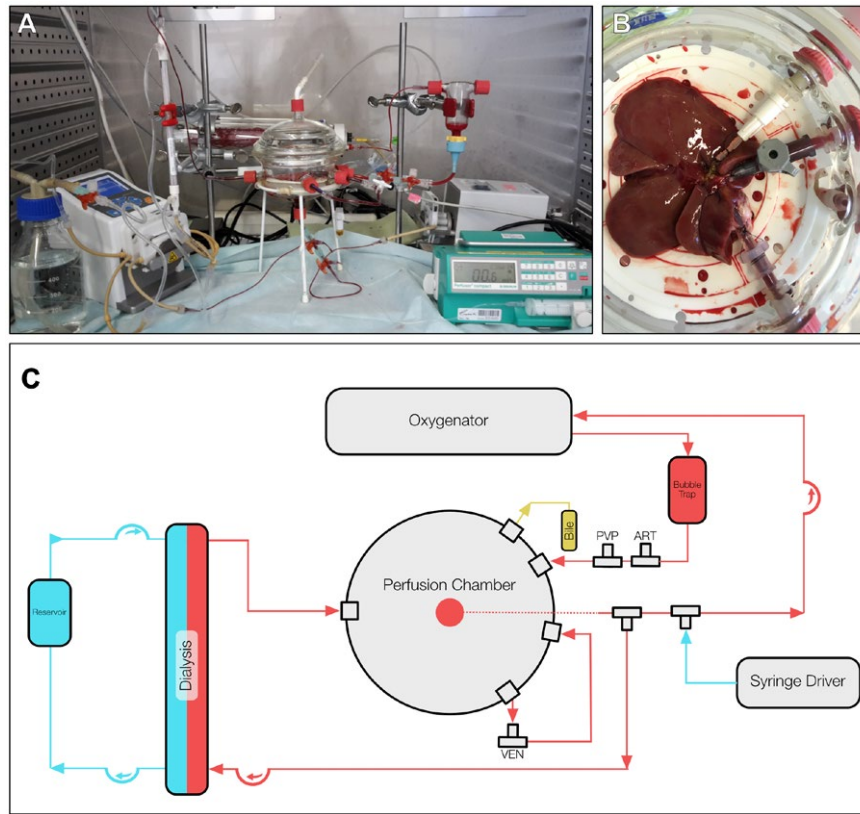


FIG. 1. (A) NEVLP setup. (B) Rat liver, placed in the perfusion chamber, is connected to (left to right) the bile duct, portal inflow, and venous outflow via the vena cava. (C) Schematic representation of the perfusion setup, consisting of a roller pump, a perfusion chamber, an oxygenator, and a dialysis circuit.

light-dark cycle. All procedures were approved by the local authorities for animal welfare and testing (T301/17, O0365/11, LaGeSo Berlin). Experiments were performed after a minimum of 1-week acclimatization and with a weight of 280 to 350 g. Rats were randomly assigned to 6 groups ($n = 4$) for evaluation of the NEVLP setup. As a baseline group, perfusion was performed without glycine (G) or dialysis (D) ($G^-|D^-$). One group received glycine treatment without dialysis ($G^+|D^-$), whereas another group received dialysis but no glycine ($G^-|D^+$). In the optimized perfusion group, grafts were treated with glycine and dialysis ($G^+|D^+$). For proof of concept with DCD grafts, 1 group was treated with neither glycine nor dialysis (DCD $G^-|D^-$), whereas the other group received both treatments (DCD $G^+|D^+$).

SURGICAL PROCEDURES

Animals were anesthetized using isoflurane inhalation and a subcutaneous injection of 100 mg/kg

of metamizole (Winthrop Arzneimittel GmbH, Frankfurt am Main, Germany) and 12 mg/kg of ketamine (CP-Pharma, Burgdorf, Germany). The abdomen was opened, and the liver was mobilized from its ligaments. The bile duct was cannulated using a custom-built cannula with 10-cm-long continuous tubing; 500 IE of heparin in 1 mL of Ringer's solution were administered via the abdominal vena cava inferior. The abdominal aorta was cannulated, and blood was collected for later use. The diaphragm was opened, and the thoracic aorta was clamped. The portal vein was then cannulated to flush the liver both via the aorta and the portal vein with 20 mL of 4°C cold histidine tryptophan keto-glutarate (HTK) solution (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Germany), either supplemented with 12 mM of glycine in the treatment group or without for the control group. Time between blood collection and cold flushing did not exceed 3 minutes. The right suprarenal vein, the esophageal vein,

as well as the cranial outflow of the vena cava were ligated. The abdominal vena cava was cannulated using a 10-Fr custom-built cannula just below the liver to allow outflow in a closed single inflow and outflow circuit. The liver was then transferred into a preweighed container filled with cold HTK solution, which was also supplemented with 12 mM of glycine in the treatment group. A DCD model adapted from Schlegel et al.⁽¹⁷⁾ was used: After breathing stopped under isoflurane narcosis, a 2-cm suprapelvic incision was made, and the aorta was exposed. After cannulation, blood was collected, and the incision was covered. After a warm ischemia period of 30 minutes, the incision was reopened, and both the aorta and portal vein were flushed with 10 mL of 1 U/mL saline. All other procedures were performed as with the normal livers.

COMPOSITION OF THE PERFUSATE

The collected blood was centrifuged at 4°C and 3200 rpm for 15 minutes. The resulting plasma phase was collected, and the buffy coat was suctioned off. The erythrocyte concentrate was suspended in low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biochrom, Berlin, Germany) used in our work group for rat hepatocyte cultivation.⁽¹⁸⁾ Total perfusion volume was 50 mL supplemented with harvested rat erythrocyte concentrate to achieve a hematocrit of 20% and 12.5 mL strain specific rat plasma. Glycine treatment was performed by adding glycine to perfusate and dialysate (12 mM) and continuous substitution to the perfusion circuit (45 mg/hour).

MEASUREMENT OF BIOCHEMICAL MARKERS, BLOOD GAS ANALYSIS, AND BILE COLLECTION

Perfusate samples were collected at the start of machine perfusion and after 3 and 6 hours. Dialysate samples were collected at the start and end of perfusion. Samples were centrifuged for 10 minutes at 10,000 rpm at 4°C. Levels of alanine transaminase (ALT), urea, bilirubin, and free hemoglobin were measured in the supernatant photometrically by Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH. Perfusate samples from the inflow and venous outflow as well as dialysate were used for blood gas analysis (ABL800 FLEX,

Radiometer GmbH, Berlin, Germany). The bile was continuously collected and weighed hourly.

TISSUE SAMPLING AND HISTOLOGICAL ANALYSIS

Livers were removed from the perfusion circuit at the end of perfusion and flushed with 20 mL of Ringer's solution. A minimum of 4 formaldehyde-fixed and freshly frozen tissue samples were preserved per liver lobe for later analysis. Meyers' hematoxylin-eosin (H & E) staining (AppliChem, Darmstadt, Germany) was performed on 2- μ m-thick paraffin sections. H & E stains from 5 different lobes of all perfused livers were examined by a pathologist (R.A.) who was blinded to the treatment group. The percentage of cell death was determined by hepatocellular ballooning, loss of nucleus, and cellular fragmentation. Immunohistochemistry staining for caspase 3a and single-stranded DNA (ssDNA) as well as immunofluorescent staining for CD68 were also performed on 2- μ m paraffin sections. For CD68 staining, antigen retrieval was achieved by incubating slides with pepsin for 30 minutes at 37°C (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). For blocking, 3% goat serum (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was used. For CD68 staining, a mouse monoclonal antibody ([ED1] #ab31630, Abcam, Cambridge, United Kingdom) was applied at a 1:50 dilution. After pepsin antigen retrieval and blocking with 3% peroxidase solution, an anti-active caspase 3 antibody (1:100 dilution, #ab2302, Abcam Cambridge, United Kingdom) in a 0.3% TritonX-100 solution was applied overnight. A Dako LSAB2 System horseradish peroxidase (#K0675, Dako Cytomation Inc., Carpinteria CA) with 3,3'-diaminobenzidine staining was used for detection according to manual instructions and counterstained with Meyer's hematoxylin. For ssDNA staining, saponin (0.1 mg/mL in phosphate-buffered saline [PBS]) and 20 mg/mL Proteinase K were used for permeabilization, followed by formamide incubation at 56°C. After endogenous peroxidase quenching, a dilution of 1:10 anti-ssDNA monoclonal antibody F7-26 (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) was applied, continuing with a rabbit peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin M (Cell Signaling Technology, Leiden, the Netherlands). Micrographs were taken with a Zeiss Axio Observer Z1 microscope using an AxioCam 1Cc5 for brightfield micrographs and AxioCam 506

mono for immunofluorescence stains. Pictures were analyzed with the Zen 2.3 Pro software (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany).

REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION ANALYSIS

The classic guanidine thiocyanate method was used for RNA isolation. Frozen liver tissue from each lobe was homogenized in 500 μ L of TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) using a Retsch MM 400 mixer (Retsch GmbH, Haan, Germany). The isolation and washing steps were performed according to published protocols. The RNA pellet was dissolved in 30–100 μ L of diethyl pyrocarbonate. RNA concentration was measured using the NanoDrop 2000c ultraviolet-visible spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) at 260–280 nm; 2 μ g of RNA were transferred and using a RevertAid First Strand complementary DNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) in a PTC-100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) complementary DNA was generated. Tumor necrosis factor α (TNF- α) expression was measured using a StepOne real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) cycler (ThermoFisher Scientific, Venlo, the Netherlands) and primers for TNF- α , glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and Beta-2-Microglobulin (Applied Biosystems, Foster City, CA) as endogenous control.

TISSUE TNF- α ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY

TNF- α was isolated from liver tissue by a method adapted from Borovikova et al.⁽¹⁹⁾ In short, 50 mg of tissue were added to a homogenization buffer of 0.05% sodium azide, 0.5% Triton X-100, and protease inhibitors in PBS with a pH of 7.2. After homogenization using a Retsch MM 400 mixer, supernatant was acquired after centrifugation with 12,000g for 10 minutes at 4°C and frozen at –20°C until further analysis. After thawing the supernatant, a rat TNF- α enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) MAX Deluxe (BioLegend, San Diego, CA) was used according to the manufacturer's instructions and measured using a plate reader Infinite 200 PRO (Tecan Group, Männedorf, Switzerland). A BCA analysis was performed at 1:50 dilution to normalize TNF- α on total protein content.

STATISTICAL ANALYSIS

Data are presented as median and interquartile range. Categorical variables were analyzed using the chi-square test. After testing for normality using the Shapiro-Wilk test, group variables were analyzed with 1-way analysis of variance or the Kruskal-Wallis test accordingly. Data are presented as 95% confidence intervals. Overall, a P value ≤ 0.05 was considered significant. Calculations were carried out using IBM SPSS Statistics, version 24.0 for macOS (IBM Corp., Armonk, NY). Graphs were generated using GraphPad Prism, version 6.04 (GraphPad Software, La Jolla, CA).

Results

NORMOTHERMIC EX VIVO PERFUSION OF RAT LIVERS

The animal weight and age as well as the weight of the isolated rat livers did not differ significantly with a median of 13.6 ± 2.15 g ($P = 0.19$ and $P = 0.16$, respectively). All operating procedures kept to the protocol, and macroscopic flush was consistent between groups. Cold ischemia time between the initial flush of the rat liver during surgery and the start of perfusion did not significantly vary between the groups ($P = 0.61$). Portal perfusion pressure remained in physiological ranges between 4 and 9 mm Hg and did not significantly diverge at any time (Fig. 2A). Bile production decreased over time in all groups but was consistently higher in perfusion experiments with dialysis (Fig. 2B).

METABOLIC CHARACTERIZATION OF THE PERFUSED RAT LIVERS

The initial pH for all experiments was physiologic but decreased during perfusion and reached acidic conditions in the experiments performed without a dialysis circuit ($\text{pH}_{6 \text{ hours}} \text{G}^+ \text{D}^- 6.94 \pm 0.33$; $P = 0.05$; Fig. 2C). The dialysis circuit was also necessary to keep potassium within physiologic levels during the perfusion period, which escalated quickly in perfusion setups without dialysis membrane reaching 4-fold higher concentrations ($[\text{K}^+]_{6 \text{ hours}} \text{G}^+ \text{D}^- 16.15 \pm 5.08$ mmol/L; $P = 0.009$; Fig. 2D). Similarly, perfusate

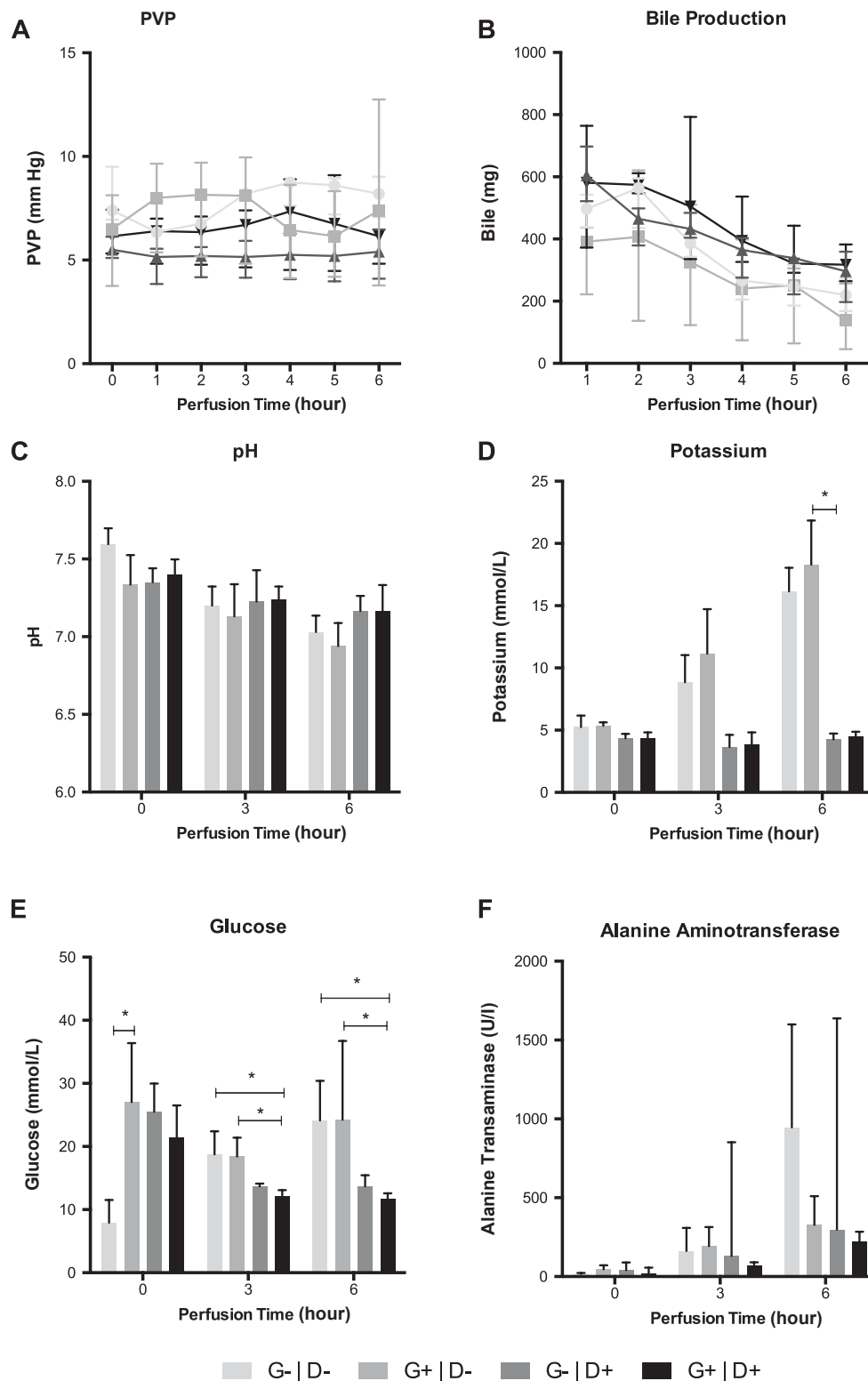


FIG. 2. Characterization of the perfusion parameters in normal liver grafts: (A) PVP; (B) bile production; (C) perfusate pH; (D) perfusate potassium; (E) perfusate glucose; (F) ALT normalized to liver wet weight. * $P \leq 0.05$; data are shown as median and interquartile range.

glucose concentration was maintained at a lower level with dialysis over the entire course of the perfusion ($[Glucose]_{6\text{ hours}}^{G-|D-} = 24.12 \pm 11.45 \text{ mmol/L}$; $P = 0.006$; Fig. 2E). Glycine and dialysis alone and in combination led to reduced ALT release, but it did not reach significance (Fig. 2F). Urea concentrations in the perfusate significantly increased without dialysis ($P = 0.005$; Fig. 3A). Adjusted to the dilution volume

of the dialysis circuit, dialysed to significantly higher total production of urea during perfusion ($P < 0.001$; Fig. 3B).

HISTOPATHOLOGY

H & E stains revealed only limited sinusoidal dilatation in all groups (Fig. 4A-D). The amount of

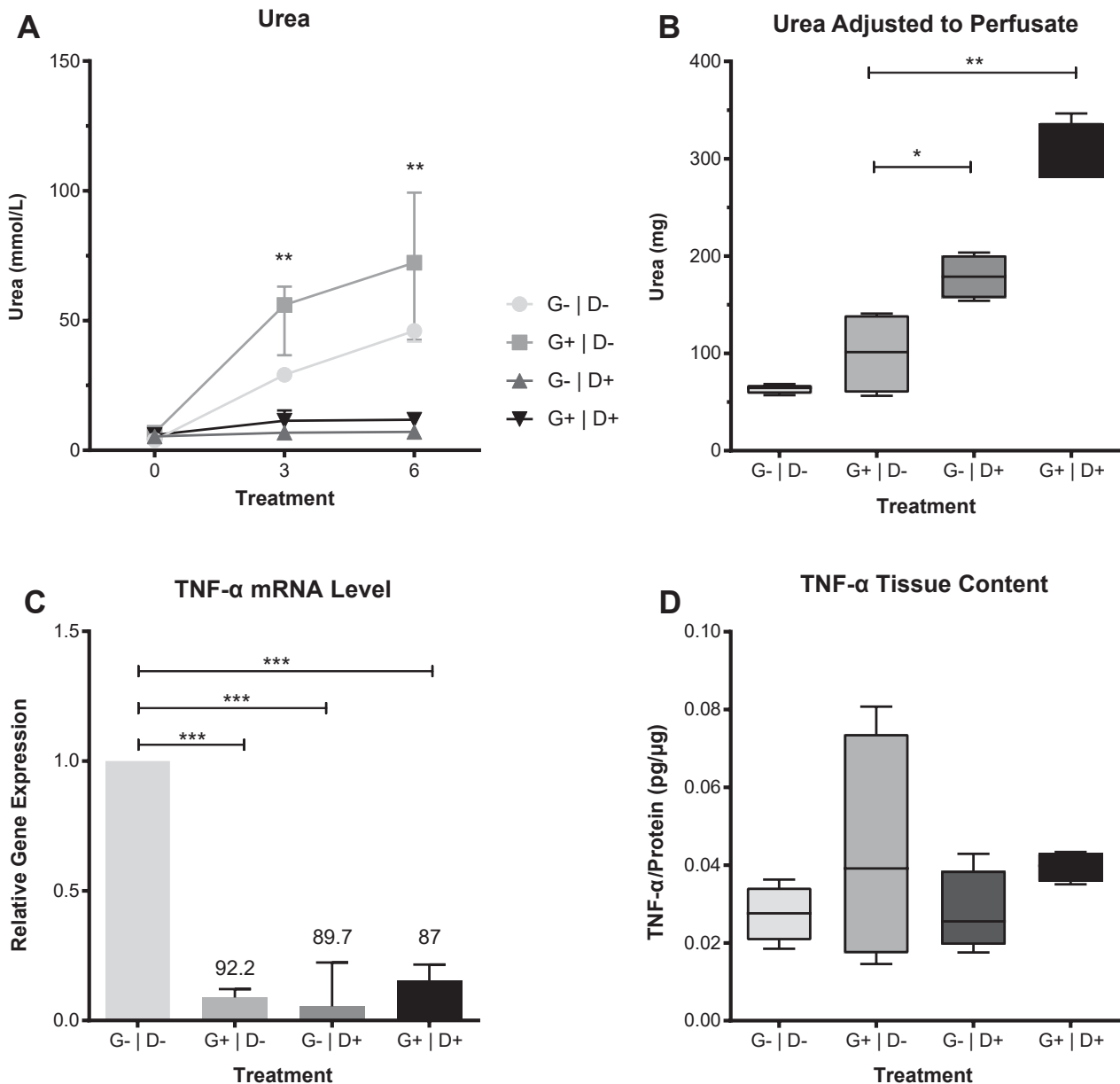


FIG. 3. (A) Urea concentration in the perfusate during ex vivo machine perfusion. (B) Total urea content after 6 hours of ex vivo machine perfusion normalized against the perfusate volume. (C) TNF- α mRNA levels normalized to the control group without dialysis and without glycine treatment; (D) TNF- α ELISA results with TNF- α content normalized to protein content. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; data are shown as median and interquartile range.

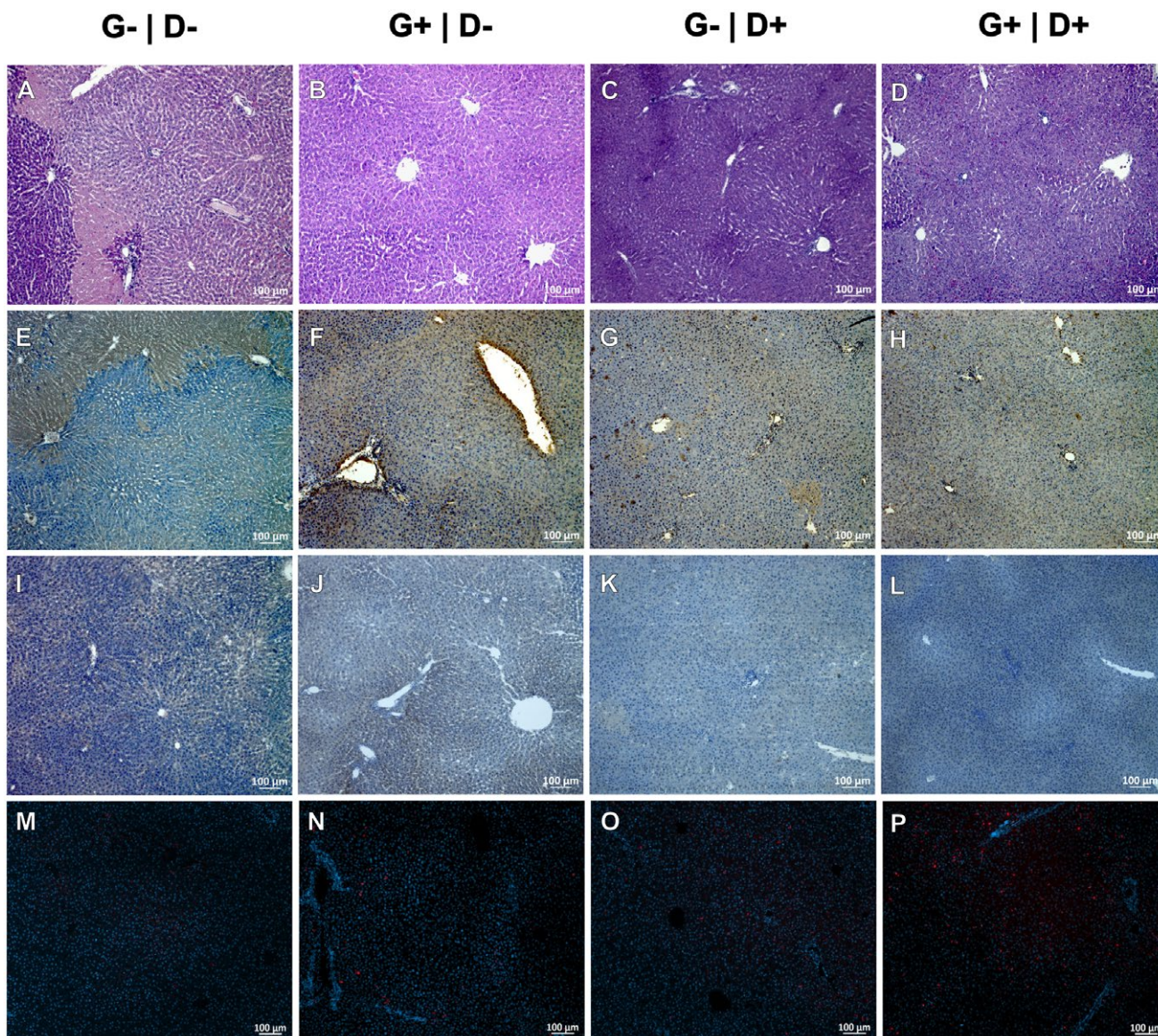


FIG. 4. Historical characterization of liver tissuesamplesafter 6 hours of NEVLP (A-D) H & E overview micrographs, (E-H) ssDNA breakage, and (I-L) activated caspase 3 immunohistochemistry staining for cell apoptosis. (M-P) CD68 and DAPI fluorescence staining for Kupffer cells.

cellular apoptosis and necrosis, as estimated by the revealed higher Kupffer cell counts in the G+|D+ pathologist, showed lower levels in the glycine and group compared to the control, which showed nearly dialysis group. Immunostaining for ssDNA breakage no positively stained cells (Fig. 4M-P). as well as activated caspase 3 revealed large patches of apoptosis in the perfusion group without dialysis compared with the groups with dialysis (Fig. 4E-L). It also confirmed the H & E results by showing only very limited positive staining in the glycine-treated group with dialysis but some positive patches in the group without glycine treatment. CD68 staining

TNF-α EXPRESSION AND RELEASE

RT-PCR revealed beta-2-microglobulin expression to be an effective endogenous control, whereas GAPDH was shown to be regulated by the addition of dialysis. TNF-α messenger RNA (mRNA) levels were 6-fold

higher in the control group compared with the treatment groups ($P < 0.001$; Fig. 3C), whereas the TNF- α protein content did not significantly differ between all other groups (Fig. 3D).

EX VIVO PERFUSION OF DCD RAT LIVERS

DCD rat liver grafts did not differ in rat age and weight, liver weight, or cold ischemia time compared

with normal livers, but they showed significantly impaired macroscopic flush ($P = 0.004$; data not shown). Perfusion pressure was significantly higher at the start of the perfusion compared with non-DCD livers ($P = 0.01$). DCD livers without glycine or dialysis treatment remained at higher portal pressures, whereas both treatments quickly normalized the perfusion pressure ($P_{PV6\text{ hours}} 8.95 \pm 3.5$ versus 6.1 ± 1.28 mm Hg; $P = 0.2$; Fig. 5A). Potassium (Fig. 5B), glucose, and urea levels in the perfusate were significantly improved

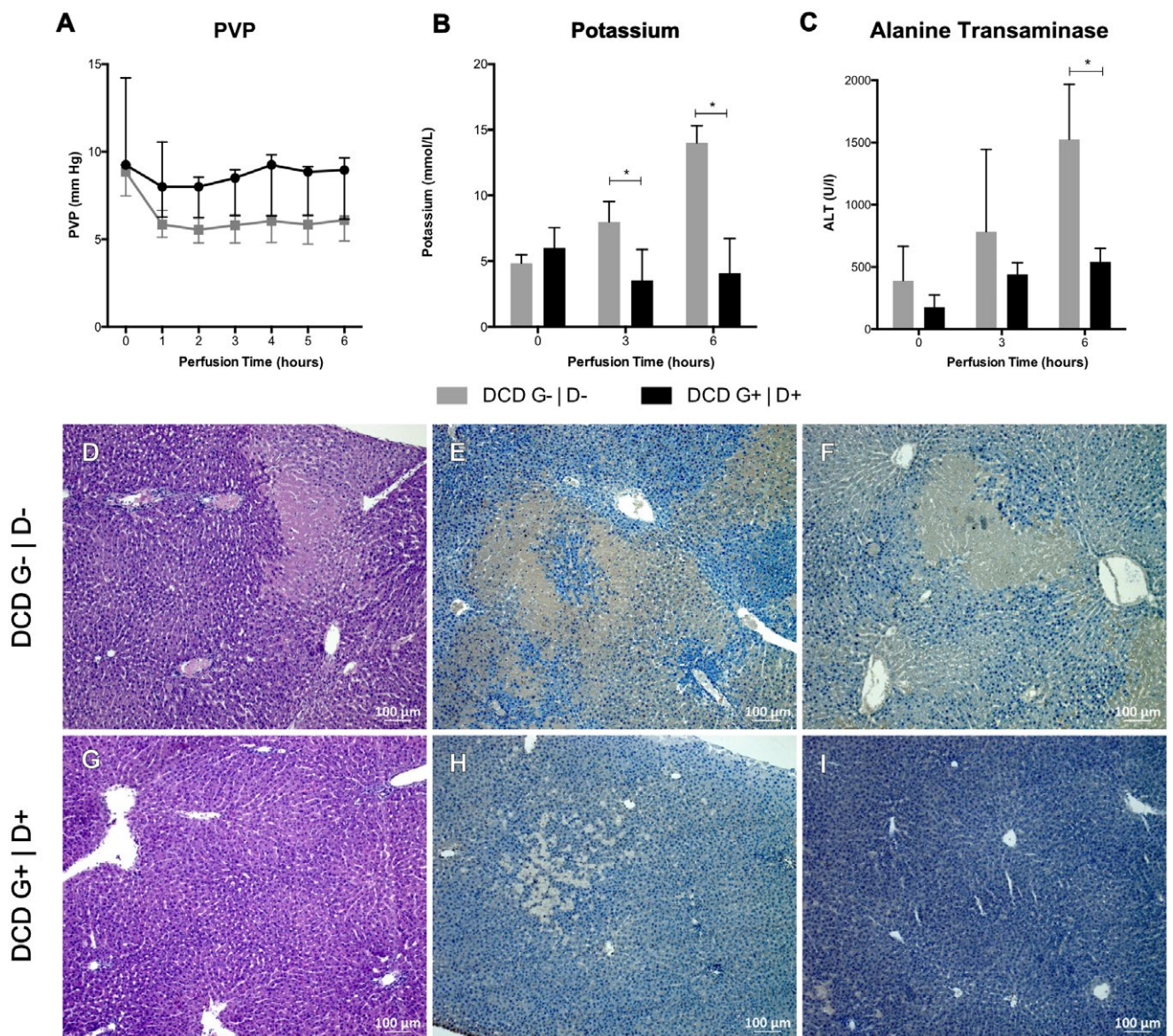


FIG. 5. (A) PVP, (B) potassium concentration, and (C) transaminase release into the perfusate during 6-hour normothermic perfusion of DCD liver grafts. Histologic comparison of (D and G) HE micrographs and immunohistochemistry stains against (E and H) ssDNA breakage as well as (F and I) activated caspase 3 as markers of apoptosis.



by glycine and dialysis (data not shown). The optimized perfusion protocol also significantly improved the liver damage parameters in DCD livers. Transaminase release was significantly reduced ($P = 0.03$; Fig. 5C), whereas histopathologic analysis with H & E staining revealed significantly reduced cell loss, supported by both ssDNA breakage and activated caspase 3 apoptosis marker stains (Fig. 5D-I).

Discussion

Ex vivo machine perfusion is currently being developed as an alternative to cold storage of liver grafts. NEVLP at 37°C, in contrast to perfusion at lower temperatures, necessitates the use of oxygen carriers, mainly red blood cells⁽²⁰⁾ but also possibly artificial substitutes.⁽²¹⁾ NEVLP aims to maintain the graft in a near-to-physiological state, which avoids the depletion of cellular energy storage and accumulation of waste products, and thus minimizes preservation injury. Ravikumar et al. and Goldaracena et al. demonstrated the safety and feasibility of NEVLP in phase 1 clinical trials in Europe and North America.^(22,23) A multicenter phase 3 randomized controlled clinical trial recently compared NEVLP to static cold storage.⁽²⁴⁾ Normothermic conditions offer the chance for pharmacologic interventions that are dependent on an active metabolism of the graft.⁽¹¹⁾ For example, Goldaracena et al. demonstrated the feasibility of anti-inflammatory treatment and inhibition of hepatitis C virus replication during NEVLP of porcine liver grafts.^(23,25) However, large animal models of NEVLP are cost intensive and comprise logistic implications. Standardized small animal models for basic research on machine perfusion of the liver and large sets of dose-response and timing studies on pharmacological conditioning are not available in the literature. Schlegel et al. compared hypothermic oxygenated perfusion versus 4 hours of dual-vessel normothermic perfusion of normal and DCD rat livers, with 7-day follow-up after transplantation,⁽²⁶⁾ and Op den Dries et al. recently reported on 3-hour dual normothermic perfusion followed by 2 hours of ex vivo reperfusion in rats.⁽²⁷⁾

Our aim was to establish a laboratory-scaled, portovenous NEVLP system that would allow manipulation of certain operation parameters to investigate optimal perfusion conditions. Our machine perfusion system is based on the setup described by Tolboom et al., which enabled successful transplantation with

28-day survival after 6 hours of normothermic portovenous perfusion including a dialysis circuit.⁽²⁸⁾ Single portovenous perfusion was chosen, which is technically less demanding than dual perfusion. A flow-controlled system was chosen over pressure-controlled perfusion during the establishment of our NEVLP system because of a steady decrease in perfusion flow in the pressure-controlled pump system (data not shown). NEVLP requires the use of erythrocytes to satisfy the higher oxygen demand. Greater metabolic function additionally leads to an accumulation of possibly damaging metabolites like potassium, glucose, and urea and a resulting deviation from homeostatic conditions. As shown by our results, the integration of a dialysis circuit was necessary to account for the metabolic activity. Because the dialysate was not exchanged at any time and thus no removal of components from the circuit was conducted, our dialysis unit is more precisely described as plasma volume expansion. The greater total plasma volume resulted in dilution of those metabolites, which become harmful at high concentrations, generating a low equilibrium. Because metabolites did not increase during the perfusion, no exchange of dialysate was required.

On the other hand, the volume of the graft circuit was small enough to enable a sufficient hematocrit, only requiring 10 mL of erythrocyte concentrate. Experiments without the dialysis circuit showed escalating potassium and higher glucose concentrations as well as a lower pH at the end of the perfusion. The potassium release is most likely a result of hemolysis because we observed a correlating increase of free hemoglobin in previous experiments (data not shown). It is notable that ALT release did not significantly differ between groups with or without dialysis despite the electrolyte imbalance and acidic conditions. The pH paradox may be a possible explanation because livers are more adapted to a low pH, which can be tolerated over a longer period.⁽²⁹⁾ In contrast, liver function, represented by bile and urea production, was greater in homeostatic conditions. The need of plasma volume expansion may be due to suboptimal perfusion conditions in our experimental setup because it is not integrated to most of the clinically used systems. However, Banan et al. used a dialyzer to maintain the perfusate pH and electrolyte profiles within physiologic ranges throughout the 8-hour NEVLP of human liver grafts.⁽³⁰⁾ Rigo et al. recently reported on escalating transaminase release during 4 hours of normothermic perfusion of rat livers

without dialysis, resulting in significant damage of the liver architecture.⁽³¹⁾

Kupffer cell–dependent signaling causes a hypermetabolic state with increased oxygen consumption and glycogen depletion in hepatocytes and reduced transplant survival in rats.^(32,33) These mechanisms may contribute to increased susceptibility to ischemia/reperfusion injury of ECD liver grafts because preexisting conditions have already aggravated microcirculation and energy expenditure. Kupffer cell inhibition can be achieved either by destruction through gadolinium chloride or by temporary hyperpolarization and effective attenuation by glycine.^(34,35) Hyperpolarization results in a decreased calcium influx, which impairs release of vacuoles and nuclear factor kappa B induced proinflammatory signaling. In vivo glycine treatment has either been performed by nutrition or short-term application. Our study is the first to show the effects of prolonged continuous glycine treatment during NEVLP. CD68 staining revealed more Kupffer cells in the liver tissue after 6 hours of ex vivo perfusion with glycine and dialysis, whereas livers perfused without dialysis or glycine showed nearly no CD68-positive cells. Because the replicating capacities of Kupffer cells are limited even under inducing influences,⁽³⁶⁾ we propose that this is mainly due to a greater survival of Kupffer cells during the optimized perfusion. TNF- α mRNA levels were significantly higher in normal livers after 6 hours of perfusion without both glycine and dialysis, presumably because of release from severely damaged Kupffer cells, whereas TNF- α protein levels were not different between all groups after perfusion. Attenuation of Kupffer cells during the retrieval of the organ leads to an enhanced microcirculatory reperfusion after cold ischemia by reducing sinusoidal cell stress. This leads to a more homogeneous reperfusion with less injury to the vascular system revealed by decreased sinusoidal dilation and indirectly by improved liver histology and decreased cell apoptosis in the glycine-treated groups. An added profit during the perfusion by continuous glycine supplementation to the perfusate was postulated based on the reported reduced vulnerability during a glycine-enriched diet.^(37,38) However, the effect of hyperpolarization on Kupffer cells may also be transient. The lack of a suitable control, which had only been treated with donor organ glycine application but not continuous perfusate supplementation, will be addressed in future studies. Moreover, thorough

evaluation of our NEVLP system in a rat liver transplantation model is necessary.

As proof of concept for the applicability of our rodent NEVLP system for perfusion of marginal liver grafts, a DCD model was chosen based on apnea and exsanguination since the blood collected was required for later use in the perfusion. As described in the literature, DCD livers showed signs of blood stasis, with large patches of blood still macroscopically visible after flushing, and perfusion pressure was significantly higher at the start of perfusion compared with livers without prolonged warm ischemia. In parallel to the effects observed by NEVLP of DCD grafts in large animal and clinical studies,^(39,40) our optimized perfusion protocol improved all aspects of the perfusion parameters as well as the integrity of the perfused livers. ALT release measured during NEVLP may be due to incompletely mirrored physiologic in situ conditions in the artificial environment. This is in line with our results because ALT seems to level out during perfusion of normal and DCD livers under optimized conditions with a more apparent effect in marginal grafts. This effect is also observed during clinical application of NEVLP.⁽²⁴⁾

In conclusion, NEVLP is a promising strategy for optimized preservation of liver grafts, especially from ECDs, requiring small animal experimental models to further foster this development. We present a laboratory-scaled portovenous NEVLP system for rat livers. We show that plasma volume expansion, in the form of an integrated dialysis circuit, is necessary to maintain near-homeostatic perfusion conditions. Glycine supplementation has a beneficiary effect on the perfusion outcome and may be considered as a possible standard ingredient in machine perfusion solutions. Our system has been shown to be effective in a DCD model of NEVLP and will be used in future studies on conditioning of liver grafts for transplantation.

Acknowledgments: We thank Dr. Anja Reutzel-Selke for her continuous advice and Steffen Lippert, Kirsten Führer, Dietrich Polenz, and Markus Güttler for their instruction and support in the methods.

REFERENCES

- 1) Pais R, Barritt AS 4th, Calmus Y, Scatton O, Runge T, Lebray P, et al. NAFLD and liver transplantation: current burden and expected challenges. *J Hepatol* 2016;65:1245-1257.

- 2) Tacke F, Kroy DC, Barreiros AP, Neumann UP. Liver transplantation in Germany. *Liver Transpl* 2016;22:1136-1142.
- 3) United Network for Organ Sharing. Donor data for age, BMI and donation mode. <http://optn.transplant.hrsa.gov>. Accessed November 2018.
- 4) LuéA, SolanasE, BaptistaP, LorenteS, Araiz JJ, Garcia-Gil A, Serrano MT. How important is donor age in liver transplantation? *World JGastroenterol* 2016;22:4966-4976.
- 5) de Graaf EL, Kench J, Dilworth P, Shackel NA, Strasser SI, Joseph D, et al. Grade of deceased donor liver macrovesicular steatosis impacts graft and recipient outcomes more than the Donor Risk Index. *JGastroenterol Hepatol* 2012;27:540-546.
- 6) O'Neill S, Roebuck A, Khoo E, Wigmore SJ, Harrison EM. A meta-analysis and meta-regression of outcomes including biliary complications in donation after cardiac death liver transplantation. *Transpl Int* 2014;27:1159-1174.
- 7) Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:79-89.
- 8) Bejaoui M, Pantazi E, Folch-Puy E, Baptista PM, García-Gil A, Adam R, Roselló-Catafau J. Emerging concepts in liver graft preservation. *World JGastroenterol* 2015;21:396-407.
- 9) Dutkowski P, Linecker M, DeOliveira ML, Müllhaupt B, Clavien PA. Challenges to liver transplantation and strategies to improve outcomes. *Gastroenterology* 2015;148:307-323.
- 10) Schlegel A, Kron P, Dutkowski P. Hypothermic machine perfusion in liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2016;21:308-314.
- 11) Kollmann D, Selzner M. Recent advances in the field of warm ex-vivo liver perfusion. *Curr Opin Organ Transplant* 2017;22:555-562.
- 12) Knaak JM, Spetzler VN, Goldaracena N, Louis KS, Selzner N, Selzner M. Technique of subnormothermic ex vivo liver perfusion for the storage, assessment, and repair of marginal liver grafts. *J Vis Exp* 2014;90:e51419.
- 13) Echeverri J, Goldaracena N, Kathis JM, Linares I, Roizales R, Kollmann D, et al. Comparison of BQ123, epoprostenol, and verapamil as vasodilators during normothermic ex vivo liver machine perfusion. *Transplantation* 2018;102:601-608.
- 14) Qu W, Ikejima K, Zhong Z, Waalkes MP, Thurman RG. Glycine blocks the increase in intracellular free Ca²⁺ due to vasoactive mediators in hepatic parenchymal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G1249-G1256.
- 15) Rentsch M, Puellmann K, Sirek S, Iesalnieks I, Kienle K, Mueller T, et al. Benefit of Kupffer cell modulation with glycine versus Kupffer cell depletion after liver transplantation in the rat: effects on posts ischemic reperfusion injury, apoptotic cell death graft regeneration and survival. *Transpl Int* 2005;18:1079-1089.
- 16) Schemmer P, Zhong Z, Galli U, Wheeler MD, Xiangli L, Bradford BU, et al. Glycine reduces platelet aggregation. *Amino Acids* 2013;44:925-931.
- 17) Schlegel A, Graf R, Clavien PA, Dutkowski P. Hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects from biliary injury in a rodent model of DCD liver transplantation. *J Hepatol* 2013;59:984-991.
- 18) Rohn S, Schroeder J, Riedel H, Polenz D, Stanko K, Reutzel-Selke A, et al. Allogeneic liver transplantation and subsequent syngeneic hepatocyte transplantation in a rat model: proof of concept for in vivo tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 2016;201:399-411.
- 19) Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405:458-462.
- 20) Barbas AS, Goldaracena N, Dib MJ, Selzner M. Ex-vivo liver perfusion for organ preservation: recent advances in the field. *Transplant Rev (Orlando)* 2016;30:154-160.
- 21) Matton APM, Burlage LC, van Rijn R, de Vries Y, Karangwa SA, Nijsten MW, et al. Normothermic machine perfusion of donor livers without the need for human blood products. *Liver Transpl* 2018;24:528-538.
- 22) Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, Heaton N, Mirza D, Perera MT, et al. Liver transplantation after ex vivo normothermic machine preservation: a phase 1 (first-in-man) clinical trial. *Am J Transplant* 2016;16:1779-1787.
- 23) Goldaracena N, Echeverri J, Spetzler VN, Kathis JM, Barbas AS, Louis KS, et al. Anti-inflammatory signaling during ex vivo liver perfusion improves the preservation of pig liver grafts before transplantation. *Liver Transpl* 2016;22:1573-1583.
- 24) Nasralla D, Coussios CC, Mergental H, Akhtar MZ, Butler AJ, Ceresa CDL, et al. A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature* 2018;557:50-56.
- 25) Goldaracena N, Spetzler VN, Echeverri J, Kathis JM, Cherepanov V, Persson R, et al. Inducing hepatitis C virus resistance after pig liver transplantation—a proof of concept of liver graft modification using warm ex vivo perfusion. *Am J Transplant* 2017;17:970-978.
- 26) Schlegel A, Kron P, Graf R, Dutkowski P, Clavien PA. Warm vs. cold perfusion techniques to rescue rodent liver grafts. *JHepatol* 2014;61:1267-1275.
- 27) Op den Dries S, Karimian N, Westerkamp AC, Sutton ME, Kuipers M, Wiersema-Buist J, et al. Normothermic machine perfusion reduces bile duct injury and improves biliary epithelial function in rat donor livers. *Liver Transpl* 2016;22:994-1005.
- 28) Tolboom H, Pouw R, Uygun K, Tanimura Y, Izamis ML, Berthiaume F, Yarmush ML. A model for normothermic preservation of the rat liver. *Tissue Eng* 2007;13:2143-2151.
- 29) Currin RT, Gores GJ, Thurman RG, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a pH paradox. *FASEB J* 1991;5:207-210.
- 30) Banan B, Watson R, Xu M, Lin Y, Chapman W. Development of a normothermic extracorporeal liver perfusion system toward improving viability and function of human extended criteria donor livers. *Liver Transpl* 2016;22:979-993.
- 31) Rigo F, De Stefano N, Navarro-Tableros V, David E, Rizza G, Catalano G, et al. Extracellular vesicles from human liver stem cells reduce injury in an ex vivo normothermic hypoxic rat liver perfusion model. *Transplantation* 2018;102:e205-e210.
- 32) Schemmer P, Mehrabi A, Kraus T, Sauer P, Gutt C, Uhl W, Büchler MW. New aspects on reperfusion injury to liver—impact of organ harvest. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19(suppl 4):iv26-35.
- 33) Schemmer P, Enomoto N, Bradford BU, Bunzendahl H, Raleigh JA, Lemasters JJ, Thurman RG. Activated Kupffer cells cause a hypermetabolic state after gentle in situ manipulation of liver in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G1076-G1082.
- 34) Wheeler M, Stachlewitz RF, Yamashina S, Ikejima K, Morrow AL, Thurman RG. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FASEB J* 2000;14:476-484.
- 35) Froh M, Thurman RG, Wheeler MD. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages

- and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G856-G863.
- 36) Bouwens L, Baekeland M, DeZanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 1986;6:718-722.
- 37) Froh M, Zhong Z, Walbrun P, Lehnert M, Netter S, Wiest R, et al. Dietary glycine blunts liver injury after bile duct ligation in rats. *World J Gastroenterol* 2008;14:5996-6003.
- 38) Mikalauskas S, Mikalauskiene L, Bruns H, Nickkholgh A, Hoffmann K, Longerich T, et al. Dietary glycine protects from chemotherapy-induced hepatotoxicity. *Amino Acids* 2011;40:1139-1150.
- 39) Boehnert MU, Yeung JC, Bazerbachi F, Knaak JM, Selzner N, McGilvray ID, et al. Normothermic acellular ex vivo liver perfusion reduces liver and bile duct injury of pig livers retrieved after cardiac death. *Am J Transplant* 2013;13:1441-1449.
- 40) Pavel MC, Reyner E, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC. Liver transplantation from type II donation after cardiac death donor with normothermic regional perfusion and normothermic machine perfusion. *Cir Esp* 2018;96:508-513.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der öffentlich zugängigen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Joseph Gaßner

Publikationsliste

Publikation	Impact factor
1. <i>“Macrosteatosis is a huge problem in liver transplantation-however, not the only one we face.”</i> Moosburner S, Sauer IM, Gassner JMGV , Schleicher C, Bösebeck D, Rahmel A, Pratschke J, Raschzok N. Am J Transplant. 2019 May 6. doi: 10.1111/ajt.15418. PMID: 31062467	7,163*
2. <i>“Impact of Percoll purification on isolation of primary human hepatocytes.”</i> Horner R, Gassner JGMV , Kluge M, Tang P, Lippert S, Hillebrandt KH, Moosburner S, Reutzel-Selke A, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Sci Rep. 2019 Apr 25;9(1):6542. doi: 10.1038/s41598-019-43042-8. PMID: 31024069	4,122*
3. <i>“High donor age for liver transplantation: Tackling organ scarcity in Germany.”</i> Moosburner S, Ritschl PV, Wiering L, Gassner JMGV , Öllinger R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Chirurg. 2019 Feb 1. doi: 10.1007/s00104-019-0801- z. German. PMID:30707248	0,669*
4. <i>“Prevalence of Steatosis Hepatis in the Eurotransplant Region: Impact on Graft Acceptance Rates.”</i> Moosburner S, Gassner JMGV , Nösser M, Pohl J, Wyrwal D, Claussen F, Ritschl PV, Dragun D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. HPB Surg. 2018 Nov 1;2018:6094936. doi:10.1155/2018/6094936. eCollection 2018. PMID: 30515073	3,047
5. <i>“Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine.”</i> Gassner JMGV , Nösser M, Moosburner S, Horner R, Tang P, Wegener L, Wyrwal D, Claussen F, Arsenic R, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Liver Transpl. 2019 Feb;25(2):275-287. doi: 10.1002/lt.25360. PMID: 30341973	4,159
6. <i>“The Predictive Value of the Maximal Liver Function Capacity Test for the Isolation of Primary Human Hepatocytes.”</i> Major RD, Kluge M, Jara M, Nösser M, Horner R, Gassner J , Struecker B, Tang P, Lippert S, Reutzel-Selke A, Geisel D, Denecke T, Stockmann M, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part C Methods. 2018 Mar;24(3):179-186. doi:10.1089/ten.TEC.2017.0369. Epub 2018 Feb 27. PMID:29382276	2,638
7. <i>“Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans.”</i> Napierala H, Hillebrandt KH, Haep N, Tang P, Tintemann M, Gassner J , Noesser M, Everwien H, Seiffert N, Kluge M, Teegen E, Polenz D, Lippert S, Geisel D, Reutzel Selke A, Raschzok N, Andreou A, Pratschke J, Sauer IM, Struecker B. Sci Rep. 2017 Feb 2;7:41777. doi: 10.1038/srep41777. PMID: 28150744	4,122
8. <i>“Computed tomography-based survey of the vascular anatomy of the juvenile Göttingen minipig.”</i> Siefert J, Hillebrandt KH, Kluge M, Geisel D, Podrabsky P, Denecke T, Nösser M, Gassner J , Reutzel-Selke A, Strücker B, Morgul MH, Guel-Klein S, Unger JK, Reske A, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Lab Anim. 2017 Aug;51(4):388-396. doi: 10.1177/0023677216680238. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27932686	0,833
9. <i>“Hepatocyte Isolation After Laparoscopic Liver Resection.”</i> Horner R, Kluge M, Gassner J , Nösser M, Major RD, Reutzel-Selke A, Leder AK, Struecker B, Morgul MH, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Tissue Eng Part C Methods. 2016 Sep;22(9):839-46. doi: 10.1089/ten.TEC.2016.0187. Epub 2016 Aug 23. PMID: 27481660	2,638

* → Impactfaktoren des Jahres 2018

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Nathanael Raschzok und Prof. Dr. Igor Sauer für die Überlassung dieser Forschungsarbeit bedanken. Nur durch die unerschöpfliche Betreuung und Leitung durch Nathanael Raschzok war es mir möglich diese Forschungsarbeit zu erstellen und ich hoffe, dass diese Kooperation noch lange bestehen bleibt.

Als nächstes möchte ich Maximilian Nösser, Simon Moosburner und Rosa Horner danken, deren ständige Kameradschaft die Forschungsarbeit auch außerhalb des Labors immer wieder befruchtet hat.

Auch Dr. Reutzel-Selke und Peter Tang und muss ich meinen herzlichen Dank ausdrücken, da ihre Unterstützung im Labor unersetzlich für mein erfolgreiches Vorankommen war.

In einer persönlichen Note möchte ich mich bei Carla Hornberg bedanken, die mich immer wieder ermutigt hat und ohne deren Verständnis die langen Stunden nicht zu ertragen gewesen wären.

Anhang

	G- D-	G+ D-	G- D+	G+ D+	p-Wert
Ratengewicht [g]	280 (26,5)	317 (28,13)	312,5 (41,25)	304,5 (61,25)	0,19
Lebergewicht [g]	12,2 (2,7)	14,75 (5,5)	13,75 (0,62)	13,6 (1,28)	0,16
Kaltischämiezeit [min]	62,5 (20)	62,5 (14)	72,5 (30)	57,5 (38,75)	0,61
Makroskopische Spülung	9,5 (1)	9 (1,5)	9,5 (1,75)	9 (0,75)	0,47
ALT [U/l]					
T0	16 (8)	46,5 (42,25)	41 (63,75)	20,5 (38,5)	0,046
T3	163 (236,5)	193 (202,75)	130,5 (775,25)	71 (38,5)	0,1
T6	946 (1121)	419 (3755,75)	298,5 (1350,75)	221 (129,5)	0,1
Harnstoff [mmol/l]					
T0	3,93 (1,96)	6,78 (1,34)	5,36 (2,68)	5,89 (2,86)	0,07
T3	29,1 (3,48)	56,05 (26,42)	6,78 (2,77)	11,42 (4,64)	0,003
T6	46,05 (6,52)	72,29 (56,72)	7,14 (2,5)	11,78 (3,57)	0,005
Kalium [mmol/l]					
T0	5,25 (1,25)	5,35 (0,63)	4,35 (0,78)	4,35 (0,88)	0,01
T3	8,85 (8,1)	11,15 (4,9)	3,65 (1,35)	3,85 (1,5)	0,046
T6	16,15 (5,08)	18,3 (5,98)	4,25 (0,88)	4,45 (1)	0,009
Glukose [mmol/l]					
T0	7,92 (4,94)	27,03 (18,06)	25,5 (11,13)	21,45 (8,52)	0,02
T3	18,75 (6,51)	18,42 (5,61)	13,68 (1,31)	12,15 (1,67)	0,007
T6	24,12 (11,45)	24,24 (19,59)	13,68 (3,11)	11,7 (1,1)	0,006
Laktat [mmol/l]					
T0	3,05 (1,33)	5,38 (3,05)	5,5 (1,89)	5 (2,86)	0,03
T3	2,83 (0,75)	1,89 (2,69)	2,83 (0,67)	2,17 (1)	0,42
T6	2,33 (0,56)	1,56 (4,39)	2,83 (1,25)	2,61 (1,61)	0,52
Galleproduction [mg]					
T1	497 (104)	391,5 (214,5)	605 (175,5)	581 (391,5)	0,05
T2	564 (159,25)	407 (483,75)	465 (119)	574 (64,5)	0,19
T3	385,5 (72)	326,5 (387,5)	432 (80)	667 (708)	0,29
T4	266 (160,5)	240,5 (324,25)	364,5 (127,25)	394 (210,5)	0,27
T5	248 (130,75)	251 (241,5)	338 (133,25)	321 (151,25)	0,14
T6	219,5 (104,75)	138,5 (211,25)	296 (162)	317,5 (118)	0,11
pH					
T0	7,59 (0,22)	7,33 (0,25)	7,35 (0,12)	7,4 (0,13)	0,08
T3	7,2 (0,18)	7,12 (0,34)	7,22 (0,22)	7,24 (0,13)	0,65
T6	7,03 (0,17)	6,94 (0,33)	7,16 (0,13)	7,17 (0,25)	0,05
Portalvenöser Druck [mmHg]					
T0	7,4 (2,55)	6,5 (4,38)	5,5 (1,03)	6,15 (2,1)	0,19
T1	6,35 (2,28)	8 (4,28)	5,15 (1,7)	6,4 (2,18)	0,16
T2	6,75 (1,45)	8,15 (4,53)	5,2 (1,45)	6,35 (2,33)	0,12
T3	8,2 (0,35)	8,1 (5,13)	5,15 (1,78)	6,7 (2,75)	0,07
T4	8,75 (1,35)	6,45 (4,5)	5,25 (2,2)	7,35 (4,38)	0,2
T5	8,6 (1,75)	6,15 (4,13)	5,2 (2,3)	6,75 (4,63)	0,18
T6	8,2 (1,95)	7,4 (8,98)	5,4 (2,38)	6,15 (1,475)	0,15

Anhang 1: Quantitative Ergebnisse der nicht vorgeschädigten Organe der Gruppen 1 bis 4

	DCD G- D-	DCD G+ D+	p-Wert
Rattengewicht [g]	279 (24,25)	271 (27,75)	0,49
Lebergewicht [g]	14 (3,25)	12,05 (1,5)	0,06
Kaltischämiezeit [min]	56 (9,5)	58,5 (5,5)	0,69
Makroskopische Spülung	6,5 (1)	7 (0,75)	0,69
ALT [U/l]			
T0	390,5 (541,75)	178,5 (111)	0,69
T3	783,5 (988,25)	440 (178)	0,2
T6	1525,5 (960,25)	541,5 (172)	0,03
Harnstoff [mmol/l]			
T0	4,11 (0,89)	5,28 (0,36)	0,03
T3	28,35 (4,37)	11,96 (10,35)	0,03
T6	46,05 (8,93)	13,03 (11,33)	0,03
Kalium [mmol/l]			
T0	4,85 (0,85)	6 (2,65)	0,2
T3	8 (2,2)	3,55 (2,68)	0,03
T6	14 (2,45)	4,1 (3,08)	0,03
Glukose [mmol/l]			
T0	8,16 (1,49)	12,15 (8,61)	0,03
T3	17,04 (9,51)	11,94 (5,51)	0,11
T6	22,35 (6,36)	11,4 (3,78)	0,03
Laktat [mmol/l]			
T0	2,11 (2,66)	3,17 (1,67)	0,49
T3	1,78 (2,22)	2,67 (1,08)	0,49
T6	1,17 (1,72)	2,83 (1,17)	0,11
Galleproduktion [mg]			
T1	163,5 (304,75)	274 (143)	0,49
T2	313 (173,25)	370 (196,25)	1,0
T3	281 (118)	316,5 (225,75)	1,0
T4	223,5 (160,5)	237,5 (119,75)	0,699
T5	195 (109,75)	222,5 (113,25)	0,69
T6	168 (160,25)	196 (126,5)	0,34
pH			
T0	7,65 (0,38)	7,56 (0,19)	0,34
T3	7,1 (0,09)	7,23 (0,18)	0,03
T6	6,91 (0,09)	7,19 (0,26)	0,03
Portalvenöser Druck [mmHg]			
T0	9,25 (5,18)	8,85 (1,78)	0,2
T1	8 (4,28)	5,85 (1,53)	0,11
T2	8 (2,3)	5,5 (1,43)	0,11
T3	8,5 (2,6)	5,8 (1,55)	0,11
T4	9,25 (3,48)	6,05 (1,55)	0,2
T5	8,85 (2,78)	5,85 (1,65)	0,2
T6	8,95 (3,5)	6,1 (1,28)	0,2

Anhang 2: Quantitative Ergebnisse der nicht vorgeschädigten Organe der Gruppen 5 und 6

	G- D-	G+ D-	G- D+	G+ D+	DCD G- D-	DCD D+ G+	p-Wert
Rattengewicht [g]	280 (26,5)	317 (28,13)	312,5 (41,25)	304,5 (61,25)	279 (24,25)	271 (27,75)	0,05
Lebergewicht [g]	12,2 (2,7)	14,75 (5,5)	13,75 (0,62)	13,6 (1,28)	14 (3,25)	12,05 (1,5)	0,11
Kaltischämiezeit [min]	62,5 (20)	62,5 (14)	72,5 (30)	57,5 (38,75)	56 (9,5)	58,5 (5,5)	0,53
Makroskopische Spülung	9,5 (1)	9 (1,5)	9,5 (1,75)	9 (0,75)	6,5 (1)	7 (0,75)	0,004
ALT [U/l]							
T0	16 (8)	46,5 (42,25)	41 (63,75)	20,5 (38,5)	390,5 (541,75)	178,5 (111)	0,002
T3	163 (236,5)	193 (202,75)	130,5 (775,25)	71 (38,5)	783,5 (988,25)	440 (178)	0,009
T6	946 (1121)	419 (3755,75)	298,5 (1350,75)	221 (129,5)	1525,5 (960,25)	541,5 (172)	0,04
Harnstoff [mmol/l]							
T0	3,93 (1,96)	6,78 (1,34)	5,36 (2,68)	5,89 (2,86)	4,11 (0,89)	5,28 (0,36)	0,02
T3	29,1 (3,48)	56,05 (26,42)	6,78 (2,77)	11,42 (4,64)	28,35 (4,37)	11,96 (10,35)	0,001
T6	46,05 (6,52)	72,29 (56,72)	7,14 (2,5)	11,78 (3,57)	46,05 (8,93)	13,03 (11,33)	0,003
Kalium [mmol/l]							
T0	5,25 (1,25)	5,35 (0,63)	4,35 (0,78)	4,35 (0,88)	4,85 (0,85)	6 (2,65)	0,01
T3	8,85 (8,1)	11,15 (4,9)	3,65 (1,35)	3,85 (1,5)	8 (2,2)	3,55 (2,68)	0,01
T6	16,15 (5,08)	18,3 (5,98)	4,25 (0,88)	4,45 (1)	14 (2,45)	4,1 (3,08)	0,002
Glukose [mmol/l]							
T0	7,92 (4,94)	27,03 (18,06)	25,5 (11,13)	21,45 (8,52)	8,16 (1,49)	12,15 (8,61)	0,002
T3	18,75 (6,51)	18,42 (5,61)	13,68 (1,31)	12,15 (1,67)	17,04 (9,51)	11,94 (5,51)	0,008
T6	24,12 (11,45)	24,24 (19,59)	13,68 (3,11)	11,7 (1,1)	22,35 (6,36)	11,4 (3,78)	0,003
Laktat [mmol/l]							
T0	3,05 (1,33)	5,38 (3,05)	5,5 (1,89)	5 (2,86)	2,11 (2,66)	3,17 (1,67)	0,006
T3	2,83 (0,75)	1,89 (2,69)	2,83 (0,67)	2,17 (1)	1,78 (2,22)	2,67 (1,08)	0,53
T6	2,33 (0,56)	1,56 (4,39)	2,83 (1,25)	2,61 (1,61)	1,17 (1,72)	2,83 (1,17)	0,30
Galleproduktion [mg]							
T1	497 (104)	391,5 (214,5)	605 (175,5)	581 (391,5)	163,5 (304,75)	274 (143)	0,006
T2	564 (159,25)	407 (483,75)	465 (119)	574 (64,5)	313 (173,25)	370 (196,25)	0,04
T3	385,5 (72)	326,5 (387,5)	432 (80)	667 (708)	281 (118)	316,5 (225,75)	0,11
T4	266 (160,5)	240,5 (324,25)	364,5 (127,25)	394 (210,5)	223,5 (160,5)	237,5 (119,75)	0,12
T5	248 (130,75)	251 (241,5)	338 (133,25)	321 (151,25)	195 (109,75)	222,5 (113,25)	0,07
T6	219,5 (104,75)	138,5 (211,25)	296 (162)	317,5 (118)	168 (160,25)	196 (126,5)	0,06

Fortsetzung nächste Seite

pH	
T0	7,59 (0,22)
T3	7,2 (0,18)
T6	7,03 (0,17)
Portalvenöser Druck [mmHg]	
T0	7,4 (2,55)
T1	6,35 (2,28)
T2	6,75 (1,45)
T3	8,2 (0,35)
T4	8,75 (1,35)
T5	8,6 (1,75)
T6	8,2 (1,95)
pH	
T0	7,33 (0,25)
T3	7,12 (0,34)
T6	6,94 (0,33)
T0	7,35 (0,12)
T3	7,22 (0,22)
T6	7,16 (0,13)
T0	7,4 (0,13)
T3	7,24 (0,13)
T6	7,17 (0,25)
T0	7,65 (0,38)
T3	7,1 (0,09)
T6	6,91 (0,09)
T0	7,56 (0,19)
T3	7,23 (0,18)
T6	7,19 (0,26)
T0	9,25 (5,18)
T3	8 (4,28)
T6	8 (2,3)
T0	8,85 (1,78)
T3	5,85 (1,53)
T6	5,5 (1,43)
T0	0,11
T3	0,07
T6	0,51
T0	0,16
T3	0,18
T6	0,16

Anhang 3: Quantitative Ergebnisse aller Gruppen